

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 4, 2022

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

ОБЗОРЫ

Особенности каротиноидов черноморских двустворчатых моллюсков

А. В. Бородина

257

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Морфофункциональные особенности двух типов фагоцитов голотурии
Eupentacta fraudatrix (Djakonov et Varanova, 1958)

Л. С. Долматова, Т. П. Смолина

269

Ферментативное звено глутатионовой системы крови у женщин
русской и бурятской этнических групп в зависимости от фазы менопаузы

Н. В. Семёнова, А. С. Бричагина, И. М. Мадаева, Л. И. Колесникова

284

Сенсорный гейтинг у мышей нокаутных по гену рецептора
следовых аминов первого типа (TAAR1)

*А. А. Александров, Е. С. Дмитриева, В. М. Князева, Ю. А. Симон,
Н. В. Полякова, Л. Н. Станкевич, А. Ю. Александров*

291

Взаимосвязь содержания нейротрофинов и кишечного микробиома
при различных метаболических типах ожирения

*И. М. Колесникова, А. М. Гапонов, С. А. Румянцев, Л. А. Ганенко,
Н. И. Волкова, Т. В. Григорьева, А. В. Лайков, В. В. Макаров,
С. М. Юдин, А. В. Шестопалов*

298

фМРТ исследования оппонентных взаимодействий
между областями головного мозга обезьян *Macaca mulatta*

А. К. Хараузов, Л. Е. Иванова, П. П. Васильев, Д. Н. Подвигина

311

Фенотипически обусловленная дисфункция печени крыс Вистар при моделировании
посттравматического стрессового расстройства

*М. В. Кондашевская, К. А. Артемьева, В. В. Алексанкина,
Д. А. Арешидзе, М. А. Козлова, Л. А. Макарецва*

323

Гены γ М-кристаллинов в хрусталике молодых *Cyprinus carpio*:
уровни транскрипции и филогенетический аспект

А. И. Капитунова, И. Н. Доминова, В. В. Жуков

333

Contents

Vol. 58, No. 4, 2022

REVIEWS

Features of the Accumulation of Carotenoids in the Black Sea Bivalve Mollusks

A. V. Borodina

257

EXPERIMENTAL ARTICLES

Morphofunctional Features of Two Types of Phagocytes
in the Holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958)

L. S. Dolmatova and T. P. Smolina

269

Enzymatic Component of the Glutathione System in Russian and Buryat Women Depends
on the Menopausal Phase

N. V. Semenova, A. S. Brichagina, I. M. Madaeva, and L. I. Kolesnikova

284

Sensory Gating in TAAR1 Knockout Mice

*A. A. Aleksandrov, E. S. Dmitrieva, V. M. Knyazeva, Y. A. Simon, N. V. Polyakova,
L. N. Stankevich, and A. Y. Aleksandrov*

291

Relationship between Neutrophins and Gut Microbiome in Various Metabolic Types of Obesity

*I. M. Kolesnikova, A. M. Gaponov, S. A. Roumiantsev, L. A. Ganenko, N. I. Volkova,
T. V. Grigoryeva, A. V. Laikov, V. V. Makarov, S. M. Yudin, and A. V. Shestopalov*

298

fMRI Studies of Opponent Interregional Interactions in the *Macaca mulatta* Brain

A. K. Harauzov, L. E. Ivanova, P. P. Vasiliev, and D. N. Podvigina

291

Phenotypically Determined Dysfunction of Liver Wistar Rats in Modeling
of Post-traumatic Stress Disorder

*M. V. Kondashevskaya, K. A. Artem'yeva, V. V. Aleksankina,
D. A. Areshidze, M. A. Kozlova, and L. A. Makartseva*

323

γ M-Crystallin Genes in the Eye Lens of a Common Carp *Cyprinus carpio*:
Transcription Levels and Phylogenetic Aspect

A. I. Kapitonova, I. N. Dominova, and V. V. Zhukov

333

ОСОБЕННОСТИ КАРОТИНОИДОВ ЧЕРНОМОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

© 2022 г. А. В. Бородина

Институт биологии южных морей РАН, Севастополь, Россия

e-mail: Borodinaav@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 15.05.2022 г.

Принята к публикации 16.05.2022 г.

В работе обобщены результаты исследований состава каротиноидов моллюсков-фильтраторов: *Mytilus galoprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Anadara kagoshimensis*, *Cerastoderma glaucum*, *Chamelea gallina* и *Polititapes aureus*, обитающих в Черном море. Представленные данные продемонстрировали изменения в составе каротиноидов у всех вышеперечисленных видов (или близких им по виду моллюсков), в зависимости от места обитания в Мировом Океане (М.О.). Наиболее очевидные отличия в составе каротиноидов отмечены между черноморскими моллюсками и их видовыми аналогами из других регионов М.О.

Обитание моллюсков *C. glaucum*, *Ch. gallina* и *P. aureus* в одном экотопе показало как видовую специфичность в накоплении каротиноидов, так и существенные отличия каротиноидов от их видовых аналогов из других регионов М.О. Отмеченные изменения относятся только к накоплению каротиноидов из пищи или сокращению известных по литературным данным путей метаболизма каротиноидов. У черноморских моллюсков новых метаболических реакций и путей пока не обнаружено.

Ключевые слова: моллюски-фильтраторы, каротиноиды, метаболизм, пути трансформации каротиноидов, Черное море

DOI: 10.31857/S0044452922040039

Каротиноиды — тетратерпеновые природные пигменты, которые синтезируются в растениях, некоторых грибах и микроорганизмах. Во все остальные организмы каротиноиды попадают через пищу, накапливаются и подвергаются метаболической трансформации в соответствии с особенностями вида. Изучение закономерностей в накоплении каротиноидов у разных видов гидробионтов привело к появлению в прошлом столетии хемосистематики [1]. Хемосистематика каротиноидов определяет связи между химической структурой и биологическим происхождением этих соединений. Благодаря этому подходу было открыто, что наиболее разнообразными по химической структуре являются каротиноиды преимущественно морских гидробионтов, таких как микроводоросли, рыбы, животные [1]. К настоящему времени обнаружено и изучено более 850 соединений каротиноидного ряда, из них большинство природных соединений имеют морское происхождение [1–3]. Несмотря на интенсивное развитие химии каротиноидов, их метаболизм и функции в организмах животных остаются наименее изученными [3, 4]. Известно, что в организме они защищают мембраны клеток от разрушения активными формами кислорода и свободными радикалами при окислительном стрессе. В роли антиоксидантов каротиноиды повышают

адаптационные возможности животных, способствуют нормализации физиологических процессов в организме [5]. Регуляторные эффекты каротиноидов обусловлены их способностью встраиваться в мембранные фосфолипидно-белковые структуры и тем изменять их текучесть. Это может сопровождаться как изменениями взаимодействий между липидами и белками, так и существенно влиять на антиоксидантную активность каротиноидов. При этом чем длиннее полиеновая цепочка каротиноида, тем выше антиоксидантная активность молекулы [6]. Известны метаболические пути преобразований многих растительных каротиноидов, характерные в целом для класса *Bivalvia*, изученные на примерах отдельных видов двустворок [7]. Обитая в разных морских акваториях, одни и те же виды моллюсков-фильтраторов имеют различный спектр питания, подвергаются разным гидрохимическим и экологическим воздействиям. Эти и другие факторы способствуют возникновению новых для организма адаптационных механизмов с участием каротиноидов [8, 9], что часто приводит к появлению новых соединений каротиноидного ряда [10]. В научной литературе можно встретить как полную, так и неполную информацию о составе каротиноидов одного и того же вида моллюска-фильтратора из разных регионов Миро-

вого Океана (М.О.) [10–14]. Улучшение методов идентификации каротиноидов, начиная с 90-х годов прошлого века, способствовало росту открытий новых каротиноидов и установлению их строения [3, 15]. На крымском побережье с 2007 г. ведутся исследовательские работы по изучению каротиноидов двустворчатых моллюсков и других гидробионтов Черного моря современными методами [17, 18]. За 14 лет на крымском побережье Черного моря были исследованы каротиноиды и особенности их накопления у 6 видов двустворчатых моллюсков-фильтраторов: *M. galoprovincialis*, *G. gigas*, *A. kagoshimensis*, *C. glaucum*, *Ch. galina* и *Politiitapes aureus* [17–30]. Эти исследования охватывают основные изменения, происходящие в организме каждого изученного вида моллюска-фильтратора в течение его жизненного цикла: генеративный процесс, смена спектра питания вследствие сезонных сукцессий фитопланктона, влияние циклических сезонных изменений в окружающей среде или возможных экстремальных состояний, вызванных гипоксией.

Целью этой работы было обобщение исследований по накоплению каротиноидов у черноморских двустворчатых моллюсков и их аналогов (видов, близких по роду) из других регионов М.О. по имеющимся литературным источникам.

Общие положения методов проведения пробоподготовки и определения каротиноидов в животной ткани подробно изложены как в отечественной, так и в зарубежной литературе [15, 16, 31, 32]. Особенности определения каротиноидов черноморских моллюсков методами ВЭЖХ, МС, Н-NMR, CD были рассмотрены в наших более ранних работах [10, 16, 21, 23, 28]. Эти особенности животной ткани вообще и вида гидробионта в частности являются самыми главными факторами в трудоемкости и длительности работы по идентификации каротиноидов. В решении многих вопросов, связанных с идентификацией фракций, помогают международные электронные базы по физико-химическим характеристикам каротиноидов: <http://www.massbank.jp/>; <https://massbank.eu/MassBank/>; <http://www.lipidbank.jp/cgi-bin/main.cgi?id=VCA>; <https://www.lipidmaps.org/>; <http://carotenoiddb.jp/>. Наши исследования имели методическую поддержку со стороны зарубежных коллег [3], специализирующихся в области идентификации природных каротиноидов, что нашло отражение в ряде совместных работ [10, 20–22]. На основании опубликованных результатов была составлена таблица, обобщающая всю известную информацию по составу каротиноидов моллюсков-фильтраторов: *M. galoprovincialis*, *G. gigas*, *A. kagoshimensis*, *C. glaucum*, *Ch. galina* и *P. aureus* (табл. 1). Все 6 видов двустворчатых моллюсков относят к подклассу Autobranchia, три вида *Mytilus galoprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Anadara kagoshimensis* относятся к одному инфраклассу Pteriomorpha и разделяются

на уровне разных порядков: Mytilida, Ostreida, Arcida соответственно. Другие три вида: *Cerastoderma glaucum*, *Chamelea gallina* и *Politiitapes aureus* относятся к инфраклассу Heterosconchia и имеют разное систематическое положение относительно друг друга. Так, например, вид *Cerastoderma glaucum* принадлежит порядку Cardida, а оба вида *Chamelea gallina* и *Politiitapes aureus* относятся к одному семейству Veneridae и разделяются по данным WORMS (World Register of Marine Species) только на уровне подсемейств Venerinae и Tarpetinae соответственно. Все эти виды являются широко распространенными как в черноморском регионе, так и в различных регионах М.О. Во многих странах Средиземного моря и Тихоокеанского региона они относятся к промысловым [48, 51, 52, 54]. К особенностям обитания *M. galoprovincialis*, *C. gigas*, *A. kagoshimensis* относятся их искусственное выращивание и содержание в садках на морских фермах, в то время как *C. glaucum*, *Ch. galina* и *P. aureus* относятся к видам, обитающим на песочно-иловом субстрате [48, 49]. Они широко распространены в смешанных донных сообществах на Российском побережье Черного моря, однако там их промышленная добыча не производится [48], в отличие от многих стран, чье побережье выходит на Средиземное море, а также других стран тихоокеанского региона М.О. [48, 51, 52, 54].

Каротиноиды и их метаболизм у мидий из разных регионов Мирового Океана

Одним из широко распространенных и культивируемых видов моллюсков на Черном море являются мидии *M. galoprovincialis*. На севавтопольском побережье на морских фермах мидии могут накапливать до 22 различных каротиноидов [10] (табл. 1). Из этого состава каротиноидов можно выделить 4 растительных каротиноида: диатоксантин, фукоксантин, перидинин и 19'-гексаноилоксифукоксантин, от которых берут начало пути трансформации этих соединений, за исключением группы каротинов (рис. 1). При исследовании черноморской мидии *M. galoprovincialis* на севавтопольском побережье были открыты новые каротиноиды (из группы 19'-гексаноилоксикаротиноидов), которые позволили уточнить полный цикл трансформации растительного 19'-гексаноилоксифукоксантина до 19'-гексаноилоксимитилоксантина [10]. У мидии *M. galoprovincialis*, обитающей на западном побережье Черного моря, в составе каротиноидов был обнаружен астаксантин, который в тканях севавтопольской мидии не встречался [33]. Из-за неполной информации по составу каротиноидов *M. galoprovincialis* из других регионов М.О. [11, 12] проследить пути метаболизма каротиноидов и сравнить их с черноморской мидией крайне сложно. В табл. 1 показана разница в составе каротиноидов

Таблица 1. Состав каротиноидов двустворчатых моллюсков *M. galatrinensis*, *G. gigas*, *A. kagoshimensis*, *C. glaucum*, *Ch. galina* и *P. aureus* из разных регионов Мирового Океана

Название вида	Состав каротиноидов	Регион М.О., где проводились исследования	Литературный источник (ссылка)
<i>Mytilus galatrinensis</i>	1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 23, 28, 35, 37, 39, 40, 42, 45, 46	Черное море	[10]
<i>Mytilus galatrinensis</i>	24, 33, 35	Другие регионы М.О.	[11]
<i>Mytilus edulis</i>	3, 6, 7, 12, 13, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 31, 35, 37, 40, 41, 42, 45, 46, 47 12, 17, 24, 25, 33, 35 12, 13, 17, 24, 25, 35	Другие регионы М.О.	[13, 14] [11, 12]
<i>Mytilus coruscus</i>	8, 9, 10, 11, 13, 17, 19, 20, 23, 29, 35, 37, 38, 39, 41, 42	Тихий Океан (Японское море)	[35, 36]
<i>Anadara kagoshimensis</i> (<i>Anadara inaequivalvis</i>)	12, 13, 23, 24, 37, 39	Черное море	[18, 24]
<i>Anadara kagoshimensis</i> (<i>Scapharca subcrenata</i> <i>Scapharca</i> sp.)	12, 13, 23, 37, 39 13 12, 13, 23, 37, 39	Тихий Океан (Японское море) Другие регионы М.О.	[43] [11, 12]
<i>Anadara broughtoni</i>	12, 13, 23, 37, 39	Тихий Океан (Японское море)	[43, 44]
<i>Crassostrea gigas</i>	12, 13, 19, 23, 28, 29, 37	Другие регионы М.О.	[11, 12]
<i>Crassostrea gigas</i>	11, 12, 13, 19, 23, 28, 29, 35, 37, 40, 41, 42, 45, 46, 48, 49...	Черное море	[18, 38]
<i>Cerastoderma glaucum</i> (<i>Cardium glaucum</i>)	12, 13, 18, 20, 22, 23, 24, 33, 34, 36, 45	Тихий Океан (Японское море)	[39–41]
<i>Cerastoderma glaucum</i> (<i>Cardium glaucum</i>)	12, 17, 18, 22, 26, 32, 36, 44	Черное море	[23, 29, 30]
<i>Cardium tuberculatum</i>	13, 23, 45, 46	Североатлантический регион	[51]
<i>Polytapes aureus</i> (<i>Paphia aurea</i>)	12, 13, 14, 20, 24, 33, 34, 45, 47	Средиземное море	[53]
<i>Paphia amabilis</i> (<i>Venus amabilis</i>)	14, 40, 41, 42, 43, 46, 48, 49	Черное море	[30]
<i>Chamelea gallina</i> (<i>Venus gallina</i>)	12, 13, 14, 19, 20, 22, 23, 24, 33, 34, 45	Тихий Океан (Японское море)	[50, 52, 7]
<i>Chamelea gallina</i> (<i>Venus gallina</i>)	12 12	Черное море	[28]
<i>Venus chione</i> (<i>Callista chione</i>)	12, 17, 24, 27, 30, 33	Другие регионы М.О.	[11] [56]
		Другие регионы М.О.	[55]

Таблица 1. Окончание

Примечание к таблице 1		
1	19'-Гексаноилоксиалленикмитилоксантин	Изофукоксантин
2	19'-Гексаноилоксигалоцинтиаксантин	Кантаксантин
3	19'-Гексаноилоксиизоимитилоксантин	Крассостреаксантин А
4	19'-Гексаноилоксикрассостреаксантин А	Крассостреаксантин В
5	19'-Гексаноилоксимитилоксантин	Криптоксантин
6	19'-Гексаноилоксифукоксантин	Крококсантин
7	19'-Гексаноилоксифукоксантинол	Крустоксантин
8	4-гидрокси-аллоксантин	Лютеин
9	4-кето-аллоксантин	Мактраксантин
10	7,8-дигидроагстаксантин	Митилоксантин
11	8'-Апоаллоксантинол	Неоксантин
12	β, β -каротин	Пектенол А
13	Аллоксантин	Пектенол В
14	Амароциаксантин А	Пектенолон
15	Амароциаксантин В	Перидинин
16	Ангидро-амароциаксантин В	Перидининол
17	Астаксантин	Пирроксантинол
18	Виолаксантин	Пирроксантин
19	Галацтиниаксантин	Сифоноксантин
20	Гетероксантин	Фукоксантин
21	Гидрат-пирроксантинол	Фукоксантинол
22	Дианоноксантин	Эхиненон
23	Диатоксантин	Циклопирроксантин
24	Зеаксантин	Циклопирроксантинол
25	Изоимитилоксантин	

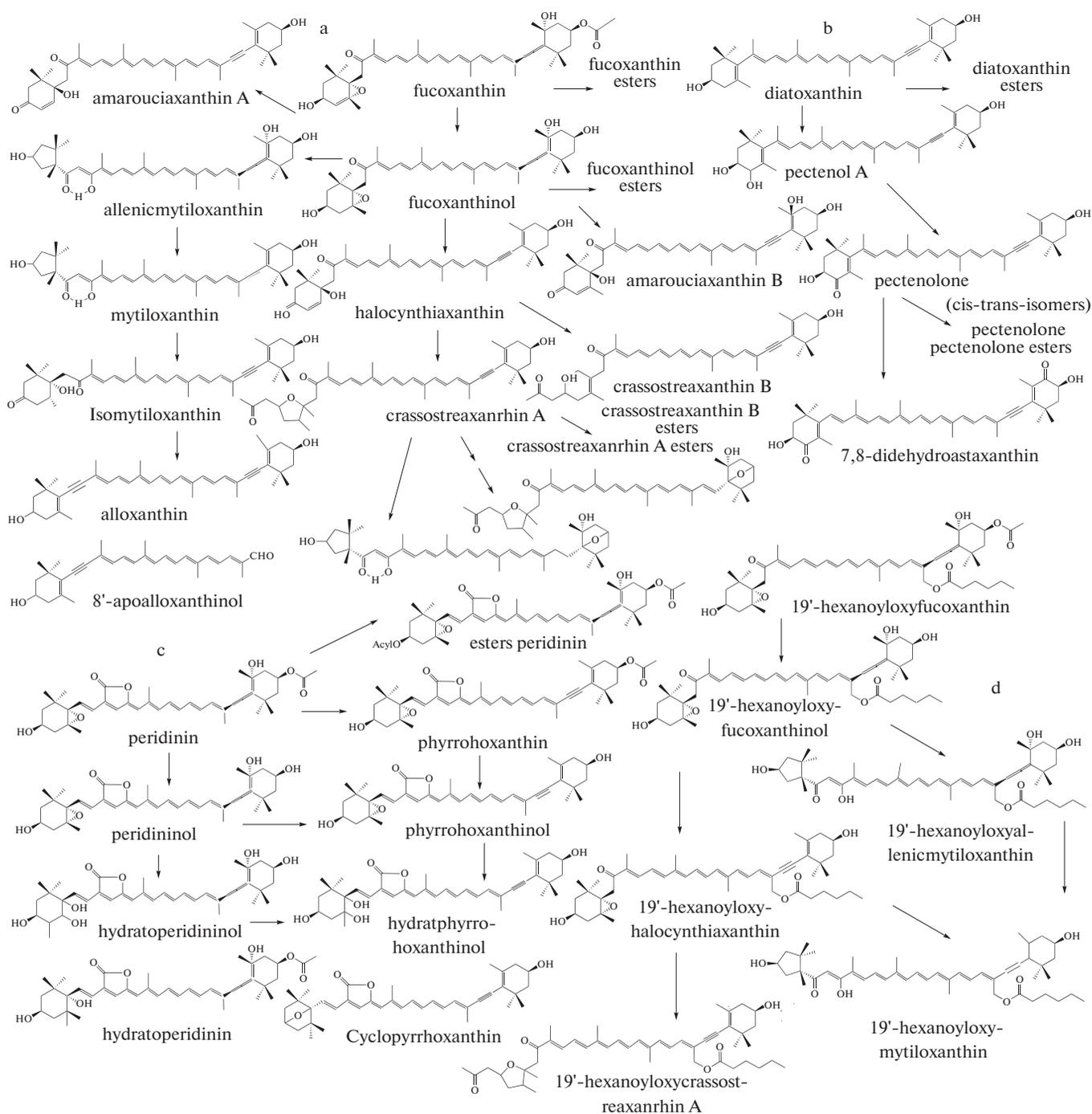


Рис. 1. Пути основных метаболических преобразований в тканях *Bivalvia* от растительных каротиноидов: фукоксантина (а), диатоксантина (b), перидинина (c) и 19'-гексаноилоксифукоксантина (d) [4, 7, 10, 14, 18].

M. galloprovincialis из разных регионов М.О., а также *Mytilus edulis* и *Mytilus coruscus* [34–36].

В конце 80-х норвежскими учеными Hertzberg и соавт., Partali и соавт. были хорошо изучены пищевые цепи, по которым происходила ассимиляция каротиноидов из фитопланктона мидиями *Mytilus edulis* [13, 14]. У этого вида мидий было идентифицировано 20 каротиноидов. Впервые наиболее

полно были описаны основные пути метаболических трансформаций каротиноидов: диатоксантин, фукоксантин, перидинин и 19'-гексаноилоксифукоксантин и характерные метаболические реакции [14]. У мидий закономерно накопление ацетиленовых каротиноидов с 3-гидрокси-7,8-дидегидро-концевой группой в молекуле и наблюдаются 3 наиболее важные метаболические

реакции: гидролиз ацетата до каротенола (фукоксантин → фукоксантинол), превращение алленовой связи в ацетиленовую (фукоксантинол → галоцинтиаксантин), окислительное расщепление эпоксидной группы (диатиноксантин → гетероксантин; пирроксантинол → гидратпирроксантинол). По мере изучения каротиноидов других гидробионтов эти три реакции в литературе отмечены как характерные для *Bivalvia* и оболочников [4, 14, 37].

Каротиноиды и их метаболизм у Crassostrea gigas из разных регионов Мирового Океана

Исследование черноморского интродуцента-устрицы *Crassostrea gigas* было ограничено только основным составом каротиноидов (83%), который был представлен 6 каротиноидами: крассостреаксантин *A* и *B*, аллоксантин, галоцинтиаксантин, диатоксантин, пектенол *A* [18, 38] (табл. 1). Ранее японскими учеными Fujiwara и соавт., Маока и соавт. было подробно изучено состав каротиноидов тихоокеанской устрицы *G. gigas* [39–41]; он был представлен 22 каротиноидами, при этом основу составляли: галоцинтиаксантин, митилоксантин и крассостреаксантин *A* и *B* (более 50%). Состав каротиноидов устриц *G. gigas*, в целом, очень близок к каротиноидам, которые образуются путем метаболических преобразований растительных диатоксантина, фукоксантина и перидинина, ранее открытых у мидий [14, 18]. Однако схема метаболизма от фукоксантина до аллоксантина дополнена образованием крассостреаксантинов (*A* и *B*, а также их эфиров), открытых впервые у этого вида моллюсков [7, 37, 39]. Путь преобразования диатоксантина ограничен только пектенолом *A*, в отличие от мидий. Трансформация в тканях перидинина, полученного через усвоение динофлагеллят, происходит наиболее полно и доходит до образования циклопирроксантина [7, 37]. Присутствуют все три метаболические реакции, характерные для большинства морских двустворчатых моллюсков-фильтраторов и оболочников [4, 7, 37]. В черноморском интродуценте можно предполагать некоторое укорочение путей трансформации каротиноидов за счет увеличения концентрации шести вышеуказанных. Эти шесть каротиноидов являются продуктами метаболических трансформаций 2 растительных: фукоксантина и диатоксантина. Несмотря на изменения в характерных цепочках преобразований каротиноидов, наличие 3 наиболее важных метаболических реакций у черноморского интродуцента остается неизменным [4, 7].

Каротиноиды и их метаболизм у Anadara sp. из разных регионов Мирового Океана

Интересным, с точки зрения адаптационных возможностей, широко распространенным и культивируемым моллюском на Крымском побережье стал моллюск-вселенец *A. kagoshimensis* (*A. inaequivalvis*; *Scapharca subcrenata*) [25]. Особенности состава каротиноидов черноморской анадары *A. kagoshimensis* (*A. inaequivalvis*) под действием различных факторов изучались на протяжении многих лет [17–19, 24–27]. Подробный анализ состава каротиноидов анадары в естественных природных условиях на черноморском побережье показал наличие в ее тканях β-каротина, пектенола *A*, пектенолона (цис- и трансизомеров), аллоксантина, диатоксантина, зеаксантина и эфиров последних четырех каротиноидов (табл. 1). Все ткани моллюска содержали одинаковый набор каротиноидов, который практически не подвергался сезонным изменениям [24]. Особенностью этого моллюска является хорошо развитая нога, которая имеет наиболее высокий соматический индекс (около 40%) относительно других тканей, что отражается в самом высоком содержании каротиноидов (45.8%) в этом органе [18]. Процесс созревания гонад сопровождается снижением суммарных каротиноидов в других тканях, однако лидером по содержанию суммарных каротиноидов, по-прежнему, остается нога моллюска. Рост генеративной ткани не влияет на изменение качественного состава каротиноидов других тканей, однако в самих гонадах отмечено повышенное содержание пектенолона и аллоксантина [27]. Моллюск способен выдерживать длительные гипоксические состояния, при этом в тканях возрастает концентрация пектенолона, как в свободном состоянии, так и в эфирных фракциях [25]. Его накопление в тканях *A. kagoshimensis* может быть связано с наличием процесса цис-транс-изомеризации этого каротиноида. Этот процесс протекает в присутствии акцепторов или доноров электрона через стадию одноэлектронного переноса, что способствует увеличению антиоксидантной активности этого каротиноида [42].

Наиболее полные первые сведения о составе каротиноидов *Scapharca subcrenata*, видового аналога *A. kagoshimensis* из тихоокеанского региона, были опубликованы в 1981 г. [43]. Упоминания о составе каротиноидов этого вида и его близкородственных видов можно встретить в ряде публикаций прошлого века [11, 12, 44]. Состав каротиноидов тихоокеанской анадары представлен: β-каротином, аллоксантином и диатоксантином (и их эфирами), пектенолоном и пектенолом *A*, по некоторым данным у *A. broutoni* может накапливаться 7,8-дигидроаэксантин, который является продуктом окисления пектенолона [7]. Исходя из состава каротиноидов и известных для *Bivalvia* путей метаболических трансформаций растительных каротиноидов, для анадар характерен

метаболизм по окислительному пути от диатоксантина до 7,8-дидегидроастаксантина [7]. Эта метаболическая трансформация встречается у многих двустворчатых моллюсков с разными дополнениями или сокращениями [16]. Отличием черноморской анадары *A. kagoshimensis* являлось: с одной стороны, дополнение эфирами диатоксантина и пектенолона, а также изомеризацией последнего, а с другой, укорачивание пути преобразования диатоксантина лишь до изомеров пектенолона. В качественном составе черноморской *A. kagoshimensis* присутствует зеаксантин, вместо его изомера – лютеина, и отсутствует митилоксантин, обнаруженный у некоторых анадар других регионов М.О. [11, 12] (табл. 1). Накопление зеаксантина и аллоксантина происходит непосредственно из пищевого спектра и не подлежит дальнейшей трансформации в тканях, кроме их этерификации. Вообще, черноморская *A. kagoshimensis* имеет более высокое содержание эфиров каротиноидов, чем ее видовой аналог из других регионов М.О. [18, 43, 44]. Причиной депонирования каротиноидов в эфирной форме может быть не только их перевод в свободную форму при необходимости, но и роль жирных кислот, входящих в состав этих эфиров, участвующих в процессе адаптации моллюска [45]. Относительно количественной оценки состава каротиноидов, в тихоокеанской *A. kagoshimensis* доминирует аллоксантин, а в черноморской – пектенолон. Очевидно, все эти изменения в составе каротиноидов тихоокеанского моллюска *A. kagoshimensis* возникли в результате длительной адаптации к черноморским, более пресным по сравнению с М.О. водам. Необходимо отметить, что экспериментальных научных исследований, подтверждающих влияние солёности на метаболизм каротиноидов, у двустворчатых моллюсков не обнаружено. Исследования фактора распреснения на адаптацию организмов и метаболизм каротиноидов во всем экотопе, в том числе на всю пищевую цепочку в среде обитания моллюсков, никто не проводил. Исходя из состава каротиноидов анадары, характерных для большинства *Bivalvia* 3 типов, метаболических реакций нет [4, 14]. В метаболических преобразованиях каротиноидов *A. kagoshimensis* присутствуют реакции гидроксирования (диатоксантин → пектенол) и дегидрирования с образованием кето-группы (пектенол → пектеолон; пектенолон → 7,8-дидегидроастаксантин).

Каротиноиды и их метаболизм у Cerastoderma glaucum, Chamelea gallina и Polititapes aureus из разных регионов М.О.

Последние 4 года были исследованы 3 вида моллюсков, обитающих в одном экотопе на песочно-иловом грунте в зоне заплеска воды: *C. glaucum*, *Ch. galina* и *P. aureus* [23, 28–30, 46]. Эти три вида моллюсков-фильтраторов относятся к массовым

видам и являются аборигенами Черного моря, подробно изучаемыми с прошлого века, особенно в глубоководной части шельфовой зоны (от 20 до 50 м) [47, 48]. Со временем эти виды стали распространяться на мелководье и их стали встречать в верховьях бухт, в зоне заплеска воды [49], где они приобретали свои адаптационные морфометрические особенности [46]. Виды, обитающие в таких экотопах, в верховьях бухт, должны приобретать некоторую устойчивость к перепадам температур, солёности, сгонно-нагонных явлений. Морские отливы в таких местах могут почти полностью обнажать рыхлый песчаный грунт, в котором находятся эти моллюски. Такие моллюски вызывают интерес с точки зрения их адаптационных возможностей и участия в этом их каротиноидов.

В 2018–2019 гг. были подробно изучены состав каротиноидов черноморского аборигена *C. glaucum* и влияние сезонных факторов на изменения этого состава [23]. Выяснено, что состав каротиноидов представлен 11 свободными и 4 этерифицированными каротиноидами (табл. 1). Основной орган накапливающий каротиноиды, – это гепатопанкреас (более 55% от суммы каротиноидов), вторым по количеству этих пигментов является нога (около 25%). В годовом цикле накопление каротиноидов имеет два максимума: весной (7.1 ± 2.1 мг 100 г⁻¹) и ранней осенью (3.1 ± 1.1 мг 100 г⁻¹) [23]. В качественном отношении около 40% этих соединений *C. glaucum* подвержено сезонным изменениям, постоянно присутствующими являлись: β-каротин, гетероксантин, мактраксантин, а также эфиры двух последних (суммарная доля 50–65%) [23]. Исходя из состава каротиноидов, у черноморского моллюска *C. glaucum* присутствуют следующие метаболические трансформации: фукоксантин → фукоксантинол; неоксантин → диадиноксантин → гетероксантин; видоспецифичным каротиноидом животного происхождения является мактраксантин [50]. Точный путь метаболических преобразований предшественников мактраксантина неизвестен, однако высказано предположение о получении его моллюском через окислительное расщепление двух эпоксигрупп виолоксантина [23, 29]. Таким образом, у черноморских церастодерм присутствуют все три метаболические реакции, описанные ранее для *Bivalvia*. Эти результаты были сопоставлены с исследованиями видовой аналога, обитающего в районе Британских островов в 70-х гг. прошлого века [51]. У *C. glaucum* североатлантического происхождения были обнаружены сложноэфирные фракции каротиноидов, β-каротин, лютеин, а также комплекс ксантофиллов неустановленного строения, среди которых в гепатопанкреасе моллюска был идентифицирован гетероксантин [11, 51]. При сравнении состава каротиноидов церастодерм из этих двух регионов М.О. можно отметить ряд отличий (табл. 1). Ряд каротиноидов у североатлантической *C. glaucum*

отсутствовали у черноморской *C. glaucum*. С другой стороны, состав каротиноидов черноморского аборигена *C. glaucum* содержал диатоксантин, аллоксантин, зеаксантин и мактраксантин, которые не были обнаружены ранее у видового аналога с Британского побережья (табл. 1). Отличительной особенностью черноморской церастодермы, как и в случае с анадарой, стоит отметить обилие эфиров каротиноидов. Несмотря на эти отличия в составе *C. glaucum* из разных регионов М.О., из-за недостатка исследований в этой области, утверждать наличие отличий в метаболических реакциях пока преждевременно.

Параллельно с исследованиями *C. glaucum*, в том же экотопе, нами проводились исследования состава каротиноидов *Ch. galina*. Динамика суммарных каротиноидов в течение года показала два выраженных максимума: весенний ($1.5 \pm 0.5 \text{ мг} \times 100 \text{ г}^{-1}$) и осенний ($0.5 \pm 0.2 \text{ мг} \times 100 \text{ г}^{-1}$) [28]. В эти периоды был изучен состав каротиноидов до 90%, (11 свободных каротиноидов и 7 эфиров): β -каротин, диатоксантин, галоцинтиаксантин, амароциаксантин А, гетероксантин, мактраксантин, аллоксантин, лютеин, зеаксантин, диатиноксантин, фукоксантин и эфиры 7 последних каротиноидов [28]. Отмечены следующие пути трансформации: фукоксантин \rightarrow фукоксантинол \rightarrow амаруциаксантин А; фукоксантин \rightarrow фукоксантинол \rightarrow галацинтиаксантин (рис. 1); диатиноксантин \rightarrow гетероксантин, а также трансформация каротиноидов до мактраксантина. Видоспецифичным каротиноидом является амаруциаксантин А [52]. В метаболической трансформации каротиноидов у черноморской *Ch. galina* можно отметить все три метаболические реакции, о которых говорилось ранее [4]. Этот вид моллюска, относящийся к аборигенам Черного моря, имеет видовой аналог из Средиземного моря, между которыми имеется ряд морфометрических отличий [48, 54]. Первые сведения о составе каротиноидов *Chamelea galina* (*Venus gallina*) из других регионов М.О. встречаются в ряде работ 80-х – 90-х годов [11, 12]. В работах последних десятилетий чаще всего можно встретить анализ липидов и каротинов *Ch. gallina* как более коммерчески важных показателей ценности моллюсков [33, 56]. Таким образом, результаты исследований *Ch. galina* из других регионов М.О. ограничены каротиноидами: β -каротин, лютеин, флавоксантин и группа неопределенных ксантофиллов [11, 12, 55]. Наиболее подробный анализ состава каротиноидов можно встретить у близкородственных видов хамелии – это *Paphia amabilis* и *Callista chione* [52, 54]. Состав *Callista chione* представлен 6 каротиноидами: β -каротином, β -криптоксантином, лютеином, зеаксантином, астаксантином, кантаксантином [54]. Можно видеть очевидные отличия между представителями одного семейства [11]. Несмотря на малоизученность каротиноидов хамелии из других регионов М.О., можно отметить отличия в ка-

чественном составе между видовыми аналогами (табл. 1). Эти отличия могут быть связаны с наличием дополнительных путей трансформации каротиноидов у этого вида, обитающего в других регионах М.О., поэтому вопрос о метаболических реакциях остается все еще малоизученным.

Находящийся рядом в одном экотопе с *Ch. gallina* и *C. glaucum* третий вид: *Polittapes aureus* (Gmelin, 1791) (*Paphia aurea*), в годовой динамике суммарных каротиноидов имел один максимум – весной ($1.68 \pm 0.47 \text{ мг} \times 100 \text{ г}^{-1}$ сырого веса), в качественном составе содержал: каротины, эхиненон, зеаксантин, лютеин, аллоксантин, фукоксантин, амаруциаксантин А, гетероксантин, мактраксантин (табл. 1). У черноморского моллюска *P. aureus* были обнаружены пути трансформации каротиноидов: фукоксантин \rightarrow фукоксантинол \rightarrow амаруциаксантин А; фукоксантин \rightarrow фукоксантинол \rightarrow галацинтиаксантин; диатиноксантин \rightarrow гетероксантин [30]. Доминирующим в составе тканей *P. aureus* каротиноидом животного происхождения являлся амаруциаксантин А, характерный для всех Veneridae [52]. В метаболической трансформации каротиноидов у черноморского моллюска *P. aureus* присутствуют все три метаболические реакции, о которых говорилось ранее [4].

В 2008 г. был наиболее полно изучен вид *Paphia amabilis*, относящийся к семейству Veneridae (семейство), к *Paphia* (род), обитающий в Тихоокеанском регионе М.О. [52]. С одной стороны, этот вид близок по филогенетическому древу к *Polittapes aureus*, а с другой, он из одного семейства с *Ch. gallina*. У *Paphia amabilis*, обитающей в Тихоокеанском регионе, в составе его каротиноидов присутствуют: гидратпирроксантинол и амароциаксантин А (и их сложные 3-эфиры), эфиры фукоксантинола, перидинола [52]. Имея близкородственные отношения, но обитая в другом регионе, этот вид имеет только один общий каротиноид – амароциаксантин А [7, 52].

У *C. glaucum*, *Ch. galina* и *P. aureus*, как и у мидий и устриц из черноморского региона, одна из трансформаций каротиноидов происходит от растительного фукоксантина (рис. 1). Однако сам путь метаболической трансформации не полный (рис. 1, табл. 1). Эти виды, обитая в одном экотопе одной из бухт Черного моря, имея одинаковые экологические и пищевые условия, накапливали как общие каротиноиды, так и отличные (табл. 1, рис. 1). При сравнении по литературным данным состава каротиноидов этих видов с их аналогами из других регионов наблюдались отличия не только в составе каротиноидов, которые во многом зависят от пищевого спектра моллюсков, но и обнаружены изменения в самих путях метаболизма. У *P. aureus* отсутствовали каротиноиды, образующиеся от растительного перидина, тогда как у *Paphia amabilis* этот путь трансформации наиболее широко пред-

ставлен и включает в себя: перидиниол, перидиниол, пирроксантинол, пирроксантин, циклопирроксантин, циклопирроксантинол (табл. 1, рис. 1). Источником перидинина являются динофлагелляты, представители которых широко распространены в составе черноморского фитопланктона [57].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно утверждать, что изменения условий обитания у одного и того же вида моллюска-фильтратора приводят к реализации механизмов адаптации в организме, что может привести к изменениям в качественном составе каротиноидов, путей их трансформации, возникновению новых соединений каротиноидного ряда. Это напрямую связано с выполнением функций этих соединений в организме, что требует дальнейшего изучения и является основной целью наших исследований.

С другой стороны, обитая в одном экотопе на побережье Черного моря, в одинаковых условиях, имея один и тот же спектр питания, моллюски, относящиеся к *Imparidentia* (Superorder) (*P. aureus*, *Ch. gallina* и *C. glaucum*), накапливали только 6 видов общих каротиноидов (табл. 1), но еще меньше общих каротиноидов они имели со своими видовыми аналогами из других регионов М.О. Изучение причин этих изменений в метаболизме и накопления каротиноидов также требует дополнительных исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме государственного задания ФИЦ ИнБЮМ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”. Номер государственной регистрации темы: 121041400077-1.

ВКЛАД АВТОРОВ

Направление исследований на протяжении многих лет осуществляется автором. Вся работа по сбору материала, анализу научных публикаций, написанию и оформлению обзора осуществлялась автором.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liaaen-Jensen S* (1998) Carotenoids in chemosystematics. Carotenoids – Vol. 3: Biosynthesis and Metabolism. Eds.: G Britton, S Liaaen-Jensen, H Pfander. – Basel: Birkhauser Verlag. 217–247.

2. *Maoka T, Kawase N, Hironaka M, Nishida R* (2021) Carotenoids of hemipteran insects, from the perspective of chemo-systematic and chemical ecological studies. *Biochem System Ecol* 95: 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104241>
3. *Hashimoto Hideki, Landrum John, Miki Wataru* (2009). Recent Achievements of Carotenoid Science and Technology. *Arch Biochem Biophys* 483 (2): 145–246. <https://www.sciencedirect.com/journal/archives-of-biochemistry-and-biophysics/vol/483>
4. *Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H* (1998) (Eds). Vol. 3: Biosynthesis and Metabolism Basel: Birkhauser Verlag.
5. *Чистяков ВА* (2008) Неспецифические механизмы защиты от деструктивного действия активных форм кислорода. *Успехи соврем биол* 128 (3): 300–306. [Chistyakov VA (2008) Nonspecific defense mechanisms against the destructive action of reactive oxygen species. *Advanc Modern Biol* 128 (3): 300–306. (In Russ)].
6. *Моторя ЕС, Пивненко ТН, Гажа АК, Иванушко ЛА, Воронцов ВН, Санина НМ* (2009) Исследование иммуномодулирующей и мембранотропной активности каротиноидов из туники асцидии *Halocynthia aurantium*. *Тихоокеанск мед журн* 3:28–31. [Motorya ES, Pivnenko TN, Gazha AK, Ivanushko LA, Vorontsov VN, Sanina NM (2009) Study of the immunomodulatory and membranotropic activity of carotenoids from the tunic of the ascidian *Halocynthia aurantium*. *Pacific Med J* 3: 28–31. (In Russ)].
7. *Maoka T* (2011) Carotenoids in Marine Animals. *Mar Drugs* 9: 278–293. <https://doi.org/10.3390/md9020278>
8. *Меньщикова ЕБ, Ланкин ВЗ, Зенков НК, Бондарь ИА, Круговых НФ, Труфакин ВА* (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма “Слово”. [Menshchikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, Bondar IA, Circular NF, Trufakin VA (2006) Okislitelniy stress. Prooxidanti i antyoksidanti. [Oxidative stress. Prooxidants and Antioxidants]. М: Firma “slovo”. (In Russ)].
9. *Дейнека ВИ, Шапошников АА, Дейнека ЛА, Гусева ТС, Вострикова СМ, Шенцева ЕА, Закирова ЛР* (2008) Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения. Научн ведомости Белгородск гос универ. Серия: Медицина. Фармация 6–2 (46): 19–25. [Deineka VI, Shaposhnikov AA, Deineka LA, Guseva TS, Vostrikova SM, Shentseva EA, Zakirova LR (2008) Carotenoids: structure, biological functions and application prospects. *Scientif Bull Belgorod State Univer. Series: Medicine. Pharmacy* 6–2 (46): 19–25. (In Russ)]. <http://dspace.bsu.edu.ru/handle/123456789/10633>
10. *Maoka T, Etoh T, Borodina AV, Soldatov AA* (2011) A Series of 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin Derivatives from the Sea Mussel, *Mytilus galloprovincialis*, Grown in the Black Sea, Ukraine. *J Agric Food Chem* 59 (24): 13059–13064. <https://doi.org/10.1021/jf2035115>
11. *Goodwin TW* (1984) The biochemistry of the carotenoids: animals. London; New York: Chapman and Hall.

12. *Shahidi F, Brown JA* (1998) Carotenoid pigments in sea-foods and aquaculture. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38 (1): 1–67.
<https://doi.org/10.1080/10408699891274165>
13. *Hertzberg S, Portali V, Liaaen-Jensen S.* (1988) Animal Carotenoids. 32. Carotenoids of *Mytilus edulis* (Edible Mussel). *Acta Chem Scand* 42B: 495–503.
<http://actachemscand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.42b-0495>
14. *Partali V, Tangen K, Liaaen-Jensen S* (1989) Carotenoids in food chain studies – III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (Edible mussel). *Comp Biochem Physiol Part B: Comp Biochem* 92 (2): 239–246.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90272-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90272-1)
15. *Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H* (1995) (Eds). Carotenoids. Vol 1A: Isolation and Analysis. Basel: Birkhäuser Verlag.
16. *Karnaukhov VN, Milovidova NY, Kargopolova IN* (1977) On a role of carotenoids in tolerance of sea molluscs to environment pollution. *Comp Biochem Physiol. Part A: Physiology* 56 (2): 189–193.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(77\)90183-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(77)90183-9)
17. *Бородина АВ, Нехорошев МВ, Солдатов АА* (2008) Каротиноидный состав тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* – вселенца в Черное море. *Экология моря* 76: 34–39. [*Borodina AV, Nekhoroshev MV, Soldatov AA* (2008) Carotenoid composition of tissues of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis* - an invader to the Black Sea. *Ecology Sea* 76: 34–39. (In Russ)].
18. *Бородина АВ, Солдатов АА* (2014) Каротиноиды тканей массовых видов черноморских моллюсков. 87–168. В кн. Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии. Шульман ГЕ, Солдатов АА (ред.) Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. [*Borodina AV, Soldatov AA* (2014) Carotenoids of tissues of dominant species of Black Sea shellfish. p. 87–168; In *Black Sea clams: elements of comparative and ecological biochemistry*. Shulman GE, Soldatov AA (Eds.). Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. (In Russ)].
19. *Бородина АВ, Нехорошев МВ, Солдатов АА* (2009) Особенности состава каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Brugiere. *Доп. НАН України*. 5: 186–190. [*Borodina AV, Nekhoroshev MV, Soldatov AA* (2009) Features of the composition of carotenoids in tissues of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis* Brugiere. *Dopovedi NAS Ukraine*. 5: 186–190. (In Russ)].
20. *Бородина АВ, Нехорошев МВ, Маока Т, Солдатов АА* (2010) Состав каротиноидов гонад брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes). *Доп НАН України* 11: 136–142. [*Borodina AV, Nekhoroshev MV, Maoka T, Soldatov AA* (2010) Composition of carotenoids in the gonads of the gastropod mollusk *Rapana venosa* (Valenciennes). *Dopovedi NAS Ukraine* 11: 136–142. (In Russ)].
21. *Borodina AV, Maoka T* (2018) The Composition of Carotenoids in Tissues of the Ascidian *Botryllus schlosseri* (Pallas, 1766) from the Black Sea. *Russ J Mar Biol* 44 (3): 226–231.
<https://doi.org/10.1134/S1063074018030033>
22. *Borodina AV, Maoka T, Soldatov AA* (2013) Composition and content of carotenoids in body of the Black sea gastropod *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846). *J Evol Biochem Physiol* 49 (4): 255–263.
<https://doi.org/10.1134/S002209301303002X>
23. *Borodina AV, Zadorozhny PA* (2020) The Annual Dynamics of Tissue Carotenoids in a Bivalve Mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789). *J Evol Biochem Physiol* 56 (1): 1–10.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020010019>
24. *Borodina AV, Soldatov AA* (2016) The Qualitative Composition of Carotenoids and Their Seasonal Dynamics in Tissues of the Bivalve *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Russ J Marine Biol* 42 (2): 166–178.
<https://doi.org/10.1134/S1063074016020024>
25. *Borodina AV, Soldatov AA* (2019) The Effect of Anoxia on the Content and Composition of Carotenoids in the Tissues of the Bivalve Invader *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Russ J Biol Invas* 10(4)307–314.
<https://doi.org/10.1134/S2075111719040027>
26. *Borodina AV* (2016) Effect of food deprivation on transformation of carotenoids in the bivalve mollusc *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *J Evol Biochem Physiol* 52 (4): 282–291.
<http://link.springer.com/article/10.1134/S0022093016040025>
27. *Borodina AV* (2016) Carotenoids in the Gonads of the Bivalved Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *J Evol Biochem Physiol* 54 (4): 267–272.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018040026>
28. *Borodina AV, Zadorozhny PA* (2021) Seasonal Dynamics of Carotenoids in the Black Sea Bivalve Mollusk *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758). *J Evol Biochem Physiol* 57 (3): 503–510.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030054>
29. *Borodina AV, Zadorozhny PA* (2020) Transformation of carotenoids in the marine bivalve mollusk *Cerastoderma glaucum* (Brugiere, 1789) fed with green algae culture. *J Evol Biochem Physiol* 56 (6): 34–42.
<https://doi.org/10.31857/S0044452920060030>
30. *Borodina A, Zadorozhny P* (2021) Ecological features of the accumulation of carotenoids in the Black Sea molluscs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol 937. Article 022077 (6 p.).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022077>
31. *Карнаухов ВН* (1988) Биологические функции каротиноидов. М.: Наука. [*Karnaukhov VN* (1988) Biological functions of carotenoids. М.: Nauka. (In Russ)].
32. *Maoka T, Akimoto N* (2008) Natural Product Chemistry in Carotenoid, Some Experimental Techniques for Structural Elucidation and Analysis of Natural Carotenoids. *Carotenoid Sci (mini review)* 13: 10–17.
<https://doi.org/10.3390/md9020278>

33. Panayotova V, Merdzhanova A, Dobрева DA, Bratoeva K, Makedonski L (2020) Nutritional composition, bioactive compounds and health-beneficial properties of Black Sea shellfish. *J IMAB* 26 (3): 3293–3297. <https://doi.org/10.5272/jimab.2020263.3293>
34. Maoka T, Matsuno T (1988) Carotenoids of shellfishes. IX. Isolation and structural elucidation of three new acetylenic carotenoids from the Japanese sea mussel *Mytilus coruscus*. *J Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1443–1447. <https://doi.org/10.2331/suisan.54.1443>
35. Maoka T, Matsuno T (1988) Isolation and Structural Elucidation of Three New Acetylenic Carotenoids from the Japanese Sea Mussel *Mytilus coruscus*. *J Bull Jap Soc Sci Fish* 54: 1443–1447. (In Japan). <https://doi.org/10.2331/suisan.54.1443>
36. Maoka T (1997) A New Apocarotenoid from the Marine Shellfish *Mytilus coruscus*. *J Nat Prod* 60: 616–617. <https://doi.org/10.1021/np970039q>
37. Maoka T (2019) Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med* 74:1–16 <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
38. Бородина АВ (2009) Особенности состава каротиноидов гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg) в зависимости от плоидности и условий обитания. *Экология моря* 79: 31–36. [Borodina AV (2009) Features of the composition of carotenoids of the giant oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) depending on ploidy and habitat conditions. *Ekologiya moray* 79: 31–36. (In Russ)].
39. Fujiwara Y, Maoka T, Ookubo M, Matsuno T (1992) Crassostreaxanthin A and B, novel marine carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas*. *Tetrahedron Lett* 33: 4941–4944. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61240-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61240-6)
40. Maoka T, Hashimoto K, Akimoto N, Fujiwara Y (2001) Structures of five new carotenoids from the oyster *Crassostrea gigas*. *J Nat Prod* 64: 578–581. <https://doi.org/10.1021/np000476w>
41. Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K, Akimoto N (2005) Structures of new carotenoids with a 3,4-dihydroxy- β -end group from the oyster *Crassostrea gigas*. *J Chem Pharm Bull* 53 (9):1207–1209. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.1207>
42. Polyakov NE, Leshina TV (2006) Certain aspects of the reactivity of carotenoids. Redox processes and complexation. 75 (12): 1049–1064. <https://doi.org/10.1070/RC2006v075n12ABEH003640>
43. Matsuno T, Maoka T (1981) Isolation of diatoxanthin, pectenoxanthin, pectenolone, and a new carotenoid, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- β -carotene from arkshell and related three species of bivalves. *Bull Jap Soc Sci Fisher* 47 (4): 495–499. (In Japan). <https://doi.org/10.2331/suisan.47.495>
44. Ha BS, Kang DS, Kim YG, Kim KS (1989) Variation in carotenoid pigment and lipids of the arkshell, (*Anadara broughtonii*) according to the environmental factors of the growing area. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 18 (1): 71–92.
45. Фокина НН, Нефедова ЗА, Немова НН (2011) Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (обзор). Труды Карельского научного центра РАН 3: 121–130. [Fokina NN, Nefedova ZA, Nemova NN (2011) Biochemical adaptations of marine bivalve molluscs to anoxia (review). *Proceed Karelian Scient Center of the Russ Acad Sci* 3: 121–130. (In Russ)].
46. Бородина АВ (2019) Накопление каротиноидов и аллометрический рост моллюска *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789). *East European Scienta Journal* 50:4–8. [Borodina AV (2019) Accumulation of carotenoids and allometric growth of the mollusk *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789). *East Eur Sci J* 50: 4–8. (In Russ)].
47. Киселева МИ (1981) Бентос рыхлых грунтов Черного моря. Киев: Наук Думка. [Kiseleva MI (1981) Benthos rihlih gruntov Chornogo moray [Benthos of loose soils of the Black Sea. Kiev Nauk Dumka (In Russ)].
48. Еремеев ВН, Гаевская АВ, Шульман ГЕ, Загородняя ЮА (2011) (ред) Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей. Севастополь: ЭКОСИ–Гидрофизика. [Eremeev VN, Gaevskaya AV, Shulman GE, Zagorodnyaya YuA (2011) (red) Commercial biological resources of the Black and Azov seas. Sevastopol: EKOSI–Gidrofizika. (In Russ)].
49. Макаров МВ (2020) Современное состояние малакофауны рыхлых грунтов в вершинной части бухты Казачьей (Черное море). Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря 1: 119–130. [Makarov MV (2020) Current state of the malacofauna of loose soils in the summit of Kazachya Bay (Black Sea). *Environmental safety of the coastal and shelf zones of the sea* 1: 119–130. (In Russ)]. <https://doi.org/10.22449/2413-5577-2020-1-119-130>
50. Matsuno T, Sakaguchi S (1983) A novel marine carotenoid, mactraxanthin from the japanese edible surf clam. *Tetrahedron Letters* 24 (9): 911–912. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)81562-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)81562-2)
51. Boyden CR (1970) Comparative studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret): PhD thesis. Department of Zoology & Comparative Physiology, Queen Mary College. London.
52. Maoka T, Akimoto N, Yim MJ, Hosokawa M, Miyashita K (2008) New C37 skeletal carotenoid from the clam, *Paphia amabilis*. *J Agric Food Chem* 56 (24): 12069–12072. <https://doi.org/10.1021/jf802717b>
53. Bruno Stancher, Fabio Zonta, Luciana Gabrielli Favretto. (1988) High-performance liquid chromatography of carotenoids from some marine shellfish. *J Chromatography* 440 (1988) 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94508-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94508-4)
54. Pinello D, Dimech M, Megahed A, Gazzar EIH (2020) Assessment of the commercial chain of bivalves in Egypt. *FAO. Fish Aquacult Circular No. 1196*. Rome, FAO.
55. Papaioannou ChD, Sinanoglou VJ, Strati IF, Proestos Ch, Kyrana VR, Lougovois VP (2016) Impact of different preservation treatments on lipids of the smooth clam *Callista chione*. *Int J Food Sci Technol* 51: 325–332. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12972>
56. Orban Elena, Gabriella Di Lena, Teresina Nevigato, Irene Casinia, Roberto Capronia Generoso Santaroni Giuliana Giulini (2007) Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chem* 101 (3): 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.005>

57. Токорев ЮН, Финенко ЗЗ, Шадрин НВ (ред) (2008) Микроводоросли Черного моря: проблемы биоразнообразия, сохранения, биотехнологического использования. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика.

[Tokarev YuN, Finenko ZZ, Shadrin NV, Eds. (2008). Microalgae of the Black Sea: Problems of Biodiversity, Preservation and Biotechnological Use. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika. (In Russ)].

Features of the Accumulation of Carotenoids in the Black Sea Bivalve Mollusks

A. V. Borodina

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia
e-mail: borodinaav@mail.ru

Studies of the composition of carotenoids in the Black Sea bivalve mollusks *Mytilus galoprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Anadara kagoshimensis*, *Cerastoderma glaucum*, *Chamelea gallina*, *Politapes aureus* and their closely related species showed changes depending on their habitats in the World Ocean (W.O.). The most obvious differences were noted between the Black Sea mollusks and their species counterparts in other regions of the W.O. The clams *C. glaucum*, *Ch. gallina* and *P. aureus* sharing the same ecotope showed both species-specific features in the accumulation of carotenoids and significant differences between carotenoids compared to their species counterparts from other regions of the W.O. The noted changes concern only the accumulation of carotenoids from food or a reduction in the number of carotenoid metabolic pathways assigned to these species in the scientific publications. In the Black Sea mollusks, no new carotenoid metabolic reactions and pathways have yet been found.

Keywords: bivalve mollusks, carotenoids, carotenoid transformation pathways, Black Sea

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДВУХ ТИПОВ ФАГОЦИТОВ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX* (DJAKONOV ET BARANOVA, 1958)

© 2022 г. Л. С. Долматова^{1,*}, Т. П. Смолина²

¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева, Владивосток, Россия

² Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

*e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 18.04.2022 г.

Принята к публикации 18.04.2022 г.

Фагоциты дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* методом градиентного центрифугирования разделяются на две фракции (Ф1 и Ф2 фагоциты), имеющие различные функциональные маркеры. Целью работы явилось выявление морфологических особенностей клеток двух фракций, их базового оксидантно-антиоксидантного статуса и фенотипа. Различными методами, включая световую и флуоресцентную микроскопию, цитометрический анализ и визуализирующую цитометрию, выявлены морфологические различия между двумя типами фагоцитов голотурии *E. fraudatrix*. Фагоциты различаются по своим размерным характеристикам, гранулярности, ядерно-цитоплазменному соотношению, показателям, характеризующим округлость клеток. Полученные данные свидетельствуют в пользу представлений о разном уровне дифференциации Ф1 и Ф2 фагоцитов и являются морфологическим обоснованием ранее полученных данных о разной роли этих клеток в иммунном ответе. В пользу представлений о разной функциональной роли двух типов фагоцитов свидетельствует и различный характер изменения числа этих клеток в зависимости от сезона. Наибольшие изменения числа Ф1 фагоцитов отмечены в период температурно-зависимых изменений метаболической активности голотурии, а Ф2 фагоцитов – в периоды, соответствующие тканевым перестройкам. Исследование базовых параметров функциональной активности не выявило достоверных различий в уровнях активных форм кислорода в обоих типах фагоцитов, при этом имелась тенденция к превышению уровня восстановленного глутатиона в Ф1 фагоцитах по сравнению с таковым в Ф2 клетках, что свидетельствует в пользу представлений о более высокой антиоксидантной активности в Ф1 фагоцитах. Дексаметазон оказывал на уровень связывания растительных лектинов из *Canavalia ensiformis* и *Glycin max* поверхностными рецепторами разнонаправленное действие в двух типах фагоцитов, подтверждая предположение о разном уровне их дифференцированности/активности и различной функциональной роли этих клеток.

Ключевые слова: фагоциты, восстановленный глутатион, активные формы кислорода, лектины, дексаметазон, голотурии

DOI: 10.31857/S0044452922040040

Голотурии (Echinodermata, Holothuroidea) широко распространены в Мировом океане и вносят существенный вклад в биомассу макрозообентоса, оказывают существенное влияние на экологию своих мест обитания и являются ценным пищевым и фармакологическим сырьем [1]. Эволюционная близость этих беспозвоночных к позвоночным как вторичноротым [2] и необходимость защиты голотурий от инфекций вызвали значительный интерес к их иммунитету [3].

Большая часть иммунных клеток голотурий в норме находится в целомоческой жидкости, заполняющей полость тела [4]. К иммунным клеткам голотурий относят амёбоциты или фагоциты (анало-

ги макрофагов позвоночных), осуществляющие фагоцитоз и инкапсулирование чужеродных агентов, и морулоподобные клетки, участвующие в инкапсуляции бактерий [5]. У *Cucumaria japonica* и близкого ей вида *Eupentacta fraudatrix* эти два типа клеток вместе с ювенильными (лимфоцитоподобными) клетками составляют большую часть пула (99%) всех целомочитов – клеток целомоческой жидкости [6, 7]. Роль ювенильных клеток не вполне понятна, но они считаются стволовыми клетками для других типов целомочитов [6, 8].

Фагоциты являются наиболее постоянно встречающимся типом клеток у иглокожих. Ранее фагоциты голотурий и морских ежей методом градиент-

ного центрифугирования в растворах различной плотности были разделены на два и более типа [5]. Эти клетки, по данным Edds [9], отличались как по количественным, так и по морфологическим (различались по плотности и наличию гранул) и метаболическим (отличались по белкам цитоскелетона) признакам. Однако функциональные различия между двумя субпопуляциями долго оставались неизученными [10].

Известно, что у позвоночных макрофаги в ответ на различные сигналы среды в процессе так называемой поляризации макрофагов могут трансформироваться в два функционально различных типа: провоспалительный (M1 макрофаги, “классически” активированные), играет ключевую роль в защите от бактериальных инфекций, и противовоспалительный (M2 макрофаги, “альтернативно” активированные), вовлечен в восстановление тканей. Маркером M1 макрофагов является оксид азота (NO), а M2-макрофагов – высокая активность аргиназы. Эти два типа макрофагов также используют разные метаболические пути для производства энергии и различаются по содержанию восстановленного глутатиона (GSH), поверхностными маркерами, спектром синтезируемых цитокинов. Одним из часто используемых модуляторов поляризации макрофагов по M2 пути является дексаметазон [11].

В последнее десятилетие происходит накопление данных, свидетельствующих о наличии функциональных различий и между отдельными типами фагоцитов иглокожих. В частности, выявлено различие в их антиоксидантной активности [12, 13]. Также было показано, что два типа фагоцитов голотурии (Ф1 и Ф2) *E. fraudatrix* имеют разные функциональные маркеры, подобно макрофагам [12], кроме того, выявлено наличие разных поверхностных рецепторов у двух субпопуляций фагоцитов морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* [10] и двух типов фагоцитов *E. fraudatrix* [14].

В настоящей работе поставлена цель морфологической идентификации двух фракций фагоцитов голотурии *E. fraudatrix*, выявления особенностей их функциональной активности у интактных животных, а также исследование пластичности фенотипа клеток под влиянием дексаметазона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Голотурии *E. fraudatrix* (с длиной тела 4–6 см), собирали в бухте Восток (зал. Петра Великого Японского моря) зимой, а также в бухте Алексева (залив Петра Великого Японского моря) на базе морской экспериментальной станции “о. Попова” ТОИ ДВО РАН весной и осенью (для определения временных изменений в концентрации фагоцитов) с использованием легководолазного снаряжения. До начала экспериментов животные находились в

аквариуме с проточной аэрируемой морской водой в течение двух недель.

Образцы целомической жидкости с добавлением антикоагулирующего раствора от одной, в ряде случаев, от 3–4 (при проведении функциональных исследований) или 15 (эксперименты *in vitro*) особей, объединяли и наслаивали на двухступенчатый градиент фиколл-верографина для выделения фагоцитов, как описано ранее [15]. Полученные после центрифугирования суспензии фагоцитов Ф1 (выделенных в интерфазе между образцом и фиколл-верографинном, разведенным антикоагулирующим раствором в соотношении 1 : 4, объем/объем) и Ф2 (концентрирующихся в интерфазе между слоями фиколл-верографина, разведенного антикоагулирующим раствором в 2 и 4 раза) дважды отмывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 36 г/л хлорида натрия (ФСБН) [5] и ресуспендировали в среде 199 с добавками (модификация метода Одинцовой [16]), как описано ранее [17].

При расчете количества клеток на одно животное в каждый временной период использовали четыре экземпляра голотурии. Концентрацию клеток определяли с использованием камеры Горяева в двух повторностях. Во всех случаях измеряли объем добавляемого к целомической жидкости антикоагулирующего раствора и суммарный объем целомической жидкости и антикоагулирующего раствора; объем целомической жидкости определяли по разнице между этими значениями. Количество клеток целомической жидкости на одну голотурию определяли как произведение концентрации клеток в целомической жидкости на объем последней.

Исследования проводили в свежeweделенных клетках, за исключением цитохимического анализа. В этом случае порцию клеток предварительно фиксировали 1%-ным глутаральдегидом в ФСБН и хранили при 4°C.

Цитометрический анализ фагоцитов проводили на проточном цитометре FACScan BD FACS Calibur (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, США) по параметрам бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния, используя программу CellQuest Pro.

Диаметры клеток и ядер определяли с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM 4500 (Wetzlar, Германия), с предварительным окрашиванием ядер DAPI (Merck, Германия). Определение проводили в шести экземплярах голотурии. В каждом случае исследовали не менее 20 клеток.

Кроме того, для анализа изображений и характеристики морфологических параметров использовали проточный визуализирующий цитометр (микроскоп) FlowCam 8400 (Fluid Imaging Technologies, Scarborough, США) и программное обеспечение VisualSpreadsheet 5 (version A 2020). Перед началом измерений суспензию клеток, предварительно разведенную в 4 раза, фильтровали ($d = 35$ мкм). Измерения образца в объеме 100 мкл

проводили при скорости потока 0.030 мл/мин. Использовали увеличение в 20 раз. Применяли заводские установки. При анализе изображений устанавливали два фильтра по параметрам ABD (Area based diameter, диаметр, основанный на площади) – различные для двух клеточных фракций, а также по симметрии (Sym, в диапазоне 0.5–1 ед.), соответствию округлости (отклонение края частицы от круга наилучшего соответствия, CF, в диапазоне 0.7–1 ед.), прозрачности (Transparency, диапазон 0–0.5 ед.), а также по циркулярности (параметр формы, вычисляемый по периметру, Cir, в диапазоне 0.6–1 ед.) – общие для двух типов фракций. Диапазон изменений морфологических параметров клеток был определен в предварительных экспериментах. В выделенных диапазонах определяли величины указанных выше параметров, а также ECD (эквивалентный циркулярный диаметр), AR (соотношение длин осей (сторон), и Cir(Hu)- (альтернативная мера округлости). Для каждого типа фракций проведено 4 независимых измерения.

Для определения влияния 100 мкМ дексаметазона (KRKA, Novo mesto, Словения) на фенотип фагоцитов клетки инкубировали 24 ч в круглодонных планшетах (1 млн клеток в лунке) при комнатной температуре. К контрольным клеткам добавляли равный объем ФСБН. Каждое воздействие производилось в двух независимых экспериментах и в двух повторностях.

Уровень активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью флуоресцентного красителя 2'-7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) в ФСБН (10 мкмоль/л), обрабатывая клетки в течение 15 мин (*n* = 3). Последующий цитометрический анализ живых клеток [18] проводили, используя цитометр CytoFLEX (Beckman Coulter, Inc. 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821, США) и программное обеспечение CytExpert.

Анализ содержания восстановленного глутатиона (*n* = 3) проводили с использованием в качестве дериватизационного реагента реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), ДТНБ) (Sigma-Aldrich) по модифицированному методу Fraternali и соавт. [19], как описано ранее [14]. Измерение оптической плотности растворов проводили на планшетном спектрофотометре STAT Fax 2100 (Awarner Technology Inc.,

США) при 402 нм. Концентрацию GSH в пробе определяли по калибровочной кривой со стандартом GSH (Sigma-Aldrich). Концентрацию белка в пробах измеряли с использованием красителя Ку-масси G-250 (Sigma-Aldrich).

Экспрессию поверхностных рецепторов фагоцитов изучали методом окрашивания [20] отмытых от глутаральдегида клеток ФИТЦ-конъюгированными растительными лектинами (ICN Biomedicals, Германия) из *Canavalia ensiformis* (con A) и из *Glycin max* (SBA), связывающихся с GalNAc α 1–3GalR и α -D-маннопиранозидами соответственно [21]. Связывание лектинов с поверхностными рецепторами оценивали по процентному содержанию клеток с зонами яркой зеленой флуоресценции. Ядра фагоцитов окрашивали DAPI (Merck, Германия). Для анализа флуоресценции использовали микроскоп Leica DM 4500 (Wetzlar, Германия). В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

Статистическую обработку данных (среднее значение \pm SEM) проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, США). Для определения нормальности распределения данных использовали тест Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Разницу между группами считали достоверной при *p* < 0.05.

Работа частично выполнена с использованием оборудования Дальневосточного Центра электронной микроскопии Национального научного центра морской биологии ДВО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические особенности двух типов фагоцитов. Данные цитометрического анализа, основанного на параметрах прямого и бокового светорассеяния, выявили, что целомциты распределяются по двум областям, обозначенным R1 и R2 (рис. 1a), со значительно более высокой концентрацией клеток в R1. Разделенные в градиенте плотности фагоциты (рис. 1b) находились в области, соответствующей R1, и показали близкие, частично перекрывающиеся, параметры распределения. Вместе с тем величины прямого и бокового светорассеяния для Ф1 превышали таковые для Ф2 фагоцитов, что указывает на имеющиеся различия

Таблица 1. Размерные показатели фагоцитов

Тип фагоцитов	Диаметр клеток (мкм)	Диаметр ядра (мкм)	Ядерно-плазменное отношение
Ф1	9.27 \pm 0.37	3.46 \pm 0.20	0.44 \pm 0.02
Ф2	7.23 \pm 0.32**	3.31 \pm 0.29	0.53 \pm 0.04*

Примечание: * – различия по сравнению с Ф1 фагоцитами значимы при *p* < 0.05, ** – различия по сравнению с Ф1 фагоцитами значимы при *p* < 0.001. Значения представлены как *M* \pm SEM, *n* = 6. У каждого экземпляра исследовали не менее 20 клеток.

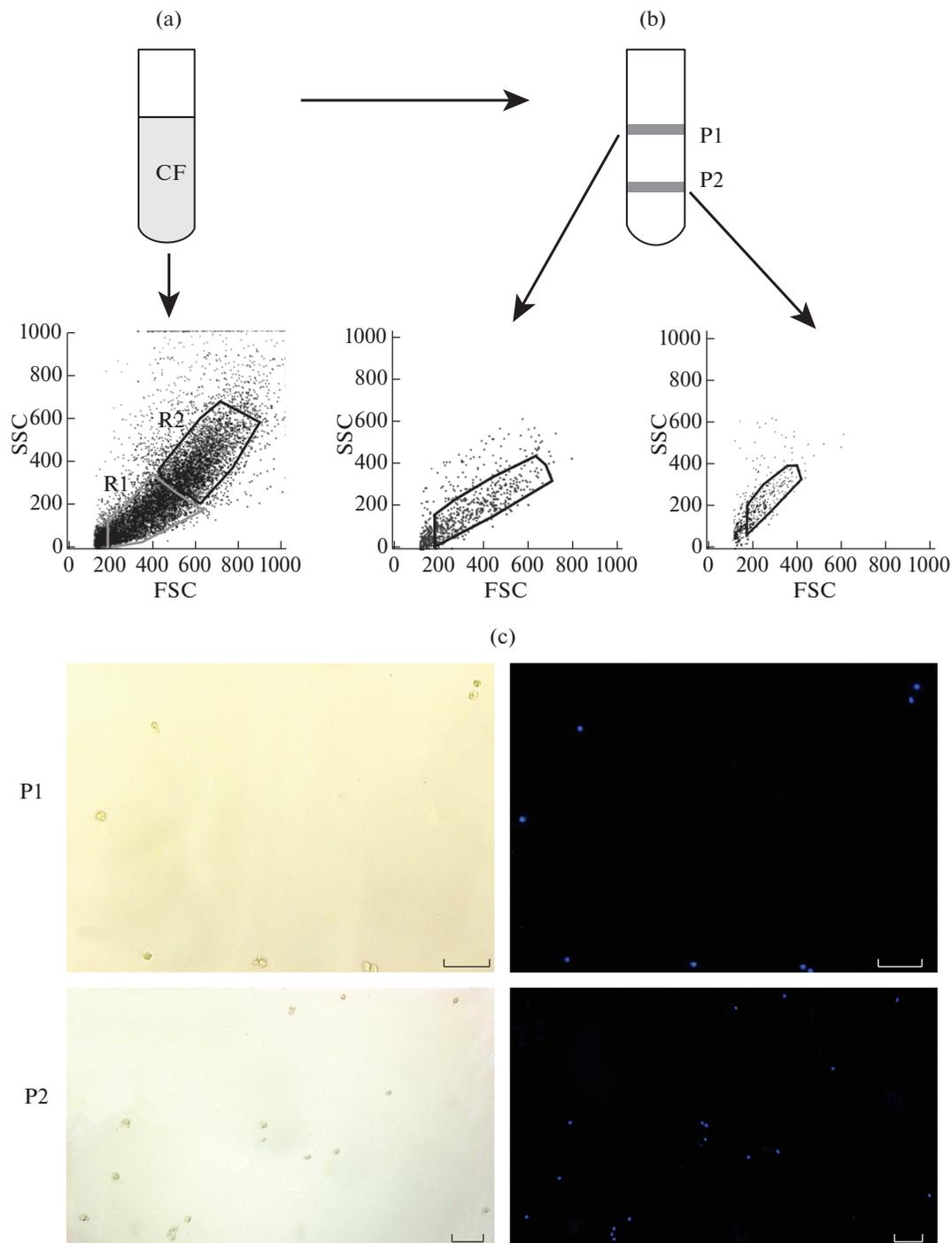


Рис. 1. Морфологическая идентификация фагоцитов голотурии *E. fraudatrix*. (a) Результаты цитометрического анализа клеток целомической жидкости (CF). (b) Результаты цитометрического анализа фагоцитов, полученных в результате центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина. По оси абсцисс: интенсивность прямого светорассеяния (FSC), по оси ординат: интенсивность бокового светорассеяния (SSC). (c) Микрофотографии фагоцитов Ф1 (P1) (верхняя панель) и Ф2 (P2) (нижняя панель). Левая панель – в проходящем свете, правая панель – окраска DAPI. Масштаб: 20 мкм.

в диаметре и гранулярности (наличии включений) этих двух типов клеток.

Микроскопическое исследование изолированных фракций фагоцитов (рис. 1с) выявило, что оба типа клеток имеют преимущественно округлую

форму. Размеры клеток (табл. 1), хотя и имеют частично перекрывающиеся диапазоны, достоверно отличаются, при этом диаметр Ф1 фагоцитов в среднем почти на 30% больше, чем у Ф2 фагоцитов ($p < 0.001$). Оба типа фагоцитов также имели ядра

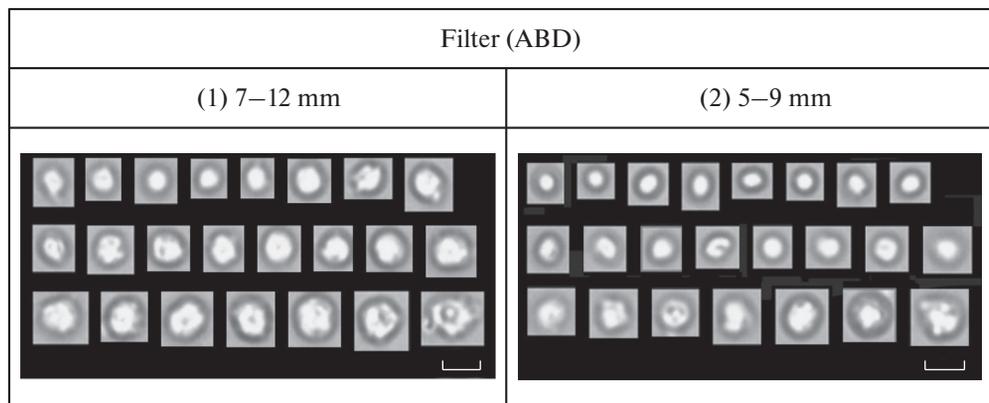


Рис. 2. Изображения клеток, полученных с помощью метода FlowCam, при использовании разных фильтров для ABD (7–12 и 5–9 мкм). Масштаб: 20 мкм.

одинакового диаметра, но различное ядерно-плазменное отношение, в Ф2 фагоцитах его значение больше, чем в Ф1 клетках.

Дальнейшие исследования морфологических параметров клеток были проведены с использованием метода проточной визуализирующей цитометрии FlowCam.

Выявленные ранее различия в размерности двух фракций послужили основанием для установки фильтров для получения изображений и характеристики клеток в диапазоне ABD 7–12 и 5–9 мкм для фракций Ф1 и Ф2 соответственно (рис. 2).

Установлено (табл. 2), что между фракциями, выделенными в соответствии с установленными фильтрами (1) и (2), представляющими фракции Ф1 и Ф2 фагоцитов соответственно, имеются различия только по параметрам размерности (ABD и ECD) и округлости (Cir и Cir(Hu)), которые в первой фракции выше, чем во второй. При этом значение параметра размерности ECD в среднем выше, чем значение ABD, и различия между фракциями по этому параметру более достоверны. Показатель Cir(Hu), который в большей мере характеризует степень округлости клеток по сравнению с таковым Cir, также в среднем выше, чем показатель Cir. Отмечена также тенденция к снижению AR в Ф2 клетках по сравнению с Ф1 фагоцитами.

Влияние сезонности на количество фагоцитов во фракциях. Проведенные в весенний и зимний периоды измерения содержания целомоцитов у голотурий не выявили временных различий (17.90 ± 4.38 и 17.58 ± 4.38 клеток на голотурию в марте и в декабре соответственно). Однако содержание фагоцитов в двух фракциях клеток в расчете на одну голотурию варьировало в зависимости от сезона. Так, количество фагоцитов Ф1 достоверно не менялось в период с февраля по апрель, но снижалось в период с октября по декабрь. Содержание же Ф2 фагоцитов, будучи максимальным в феврале, снижалось в последующие исследованные периоды, не

отличаясь существенно в периоды с марта по октябрь, но достигая минимального значения в декабре, как и Ф1 фагоциты (рис. 3). Концентрация Ф2 фагоцитов превышала таковую Ф1 в 4–3 раза в феврале и октябре соответственно, менее значительное превышение (в 1.6 раза) было в марте, но не выявлено достоверных различий в содержании двух типов клеток в декабре и апреле. Соответственно менялся и суммарный вклад обеих фракций фагоцитов в общее количество целомоцитов: в декабре он составил 14.6%, а в марте — 38%, при неизменности общего количества целомоцитов в эти месяцы.

Уровень АФК в фагоцитах. График для H₂DCFDA-зависимой флуоресценции Ф2 фагоцитов имел тенденцию к смещению правее относительно такового для Ф1 клеток (рис. 4), а интенсивность флуоресценции в Ф2 фагоцитах имела тенденцию к превышению таковой в Ф1 фагоцитах. Тем не менее

Таблица 2. Морфологические параметры двух фракций фагоцитов, полученные с использованием метода FlowCam

Морфологические параметры	Фильтр ABD	
	(1) 7–12 мкм	(2) 5–9 мкм
ABD	8.11 ± 0.11*	5.4 ± 0.47
ECD	12.10 ± 0.50**	7.02 ± 0.97
Sym	0.79 ± 0.05	0.77 ± 0.48
AR	0.92 ± 0.02	0.85 ± 0.06
CF	0.88 ± 0.01	0.84 ± 0.02
Cir	0.82 ± 0.01*	0.72 ± 0.02
Cir(Hu)	0.96 ± 0.03*	0.83 ± 0.02
Transparency	0.31 ± 0.008	0.30 ± 0.03

Примечание: * – различия по сравнению с группой (2) значимы при $p < 0.05$, ** – различия по сравнению с группой (2) значимы при $p < 0.01$. Значения представлены, как $M \pm SEM$, $n = 4$.

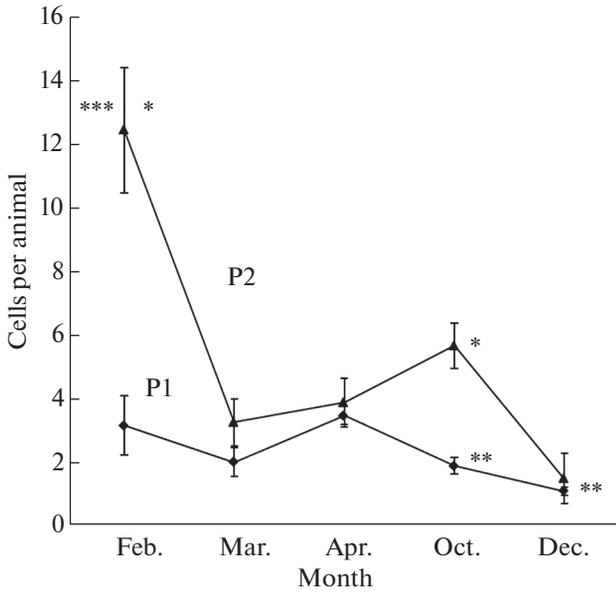


Рис. 3. Содержание фагоцитов Ф1 (P1) и Ф2 (P2) в отдельные месяцы. * – различия по сравнению с Ф1 фагоцитами статистически значимы при $p < 0.05$; ** – различия по сравнению с апрелем статистически значимы при $p < 0.05$; *** – различия по сравнению с другими периодами (март–декабрь) статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 4$.

эти параметры не отличались достоверно между двумя типами фагоцитов.

Содержание восстановленного глутатиона. Не выявлено достоверных различий и в содержании

GSH в двух типах фагоцитов (рис. 5), хотя отмечена тенденция к более низкой аккумуляции данного антиоксиданта в Ф2 фагоцитах по сравнению с Ф1 фагоцитами.

Влияние дексаметазона на связывание растительных лектинов с поверхностными рецепторами фагоцитов. Через 24 ч инкубации связывание поверхностных рецепторов с соп А в Ф1 и Ф2 фагоцитах достоверно не отличалось, а связывание с SBA было значительно выше в Ф2 фагоцитах по сравнению с Ф1 клетками (рис. 6а, с).

Дексаметазон в 2–4 раза стимулировал связывание соп А в Ф1, но не в Ф2 фагоцитах, через 24 ч инкубации (рис. 6б, с).

Связывание поверхностных рецепторов фагоцитов с SBA было значительно выше в Ф2 фагоцитах по сравнению с Ф1 клетками (рис. 7а, с). Связывание SBA с поверхностными рецепторами при воздействии дексаметазона изменялось в обоих типах фагоцитов, причем противоположным образом: в Ф1 фагоцитах возрастало в 2 раза, а в Ф2 снижалось в 3.2 раза (рис. 7б, с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитометрический анализ показал, что целомиты *E. fraudatrix* в целом разделяются на популяции сходно с описанными для других иглокожих. Так, у морской звезды *Marthasterias glacialis* целомиты представлены двумя популяциями, различающимися по морфологии и размерам клеток и относительным количеством клеток [22]. При этом

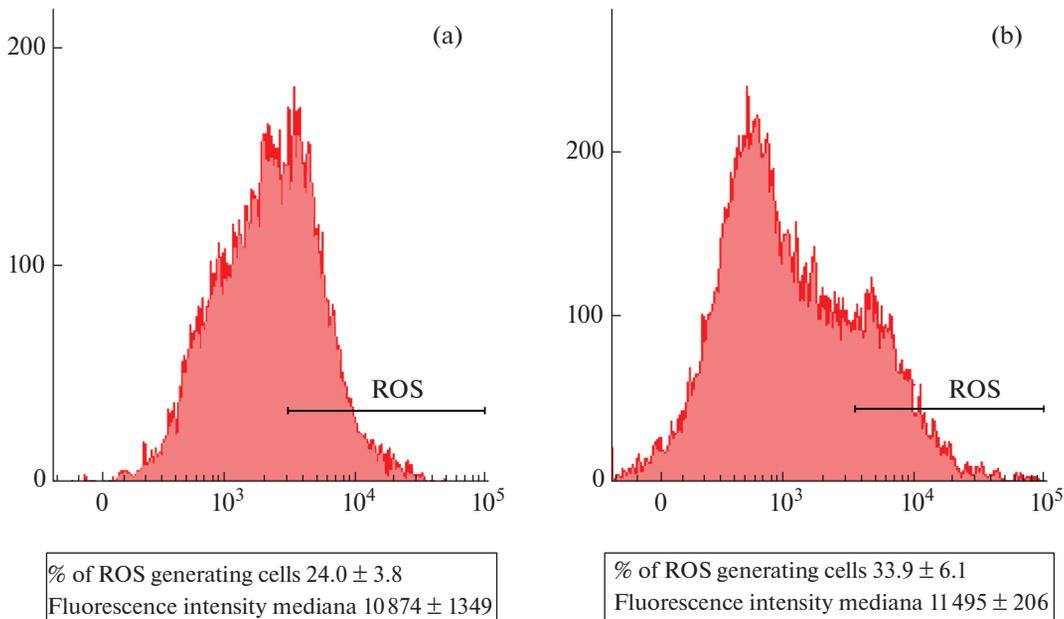


Рис. 4. Репрезентативная гистограмма уровня АФК (ROS) в фагоцитах. (а) Ф1 фагоциты. (б) Ф2 фагоциты. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции H₂DCFDA, по оси ординат – количество проанализированных клеток. Доля (%) клеток, продуцирующих АФК (ROS), и медиана интенсивности флуоресценции представлены в рамках. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 3$.

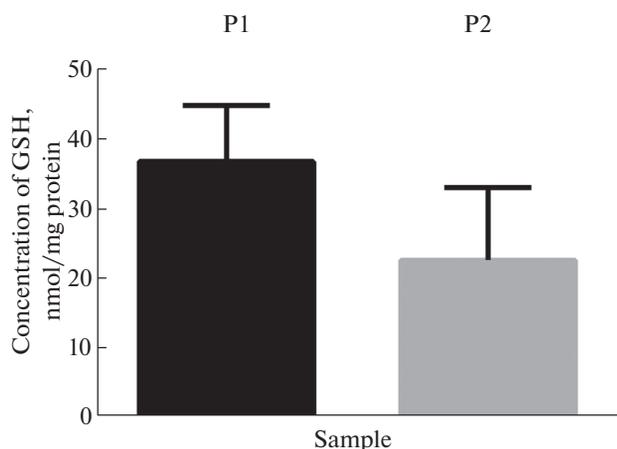


Рис. 5. Концентрация GSH в свежeweделенных фагоцитах Ф1 (P1) и Ф2 (P2). Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 3$.

лянии целомоцитов, различающиеся по гранулярности, размерности и численности, и третья, промежуточная, между ними [23].

В настоящей работе целомоциты *E. fraudatrix* разделялись на две популяции, значительно различающиеся как по размерности, так и по гранулярности. Как и для *A. japonicus* [23], популяция наиболее гранулярных клеток была наименее многочисленной. Цитометрический анализ двух выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина фракций фагоцитов показал, что обе фракции входят в популяцию менее гранулярных клеток и отличаются между собой как по размерам, так и по уровню гранулярности клеток.

Полученные микроскопическими методами данные о размере фагоцитов показали, что фагоциты *E. fraudatrix* разделяются в зависимости от диаметра на две группы, которые можно назвать большими (9.27 ± 0.37 мкм) и малыми (7.23 ± 0.32 мкм) фагоцитами на основе различий в размерах. Необходимо отметить, что диаметр фагоцитов иглокожих варьирует между 3 и 20 мкм [24] или, по другим данным, между 10 и 40 мкм [5], и различия выявля-

наиболее многочисленной была фракция, представленная фагоцитами, которые по морфофункциональным признакам делились на два подтипа, по-разному участвующих в фагоцитозе. У голотурии *Apostichopus japonicus* были выделены две попу-

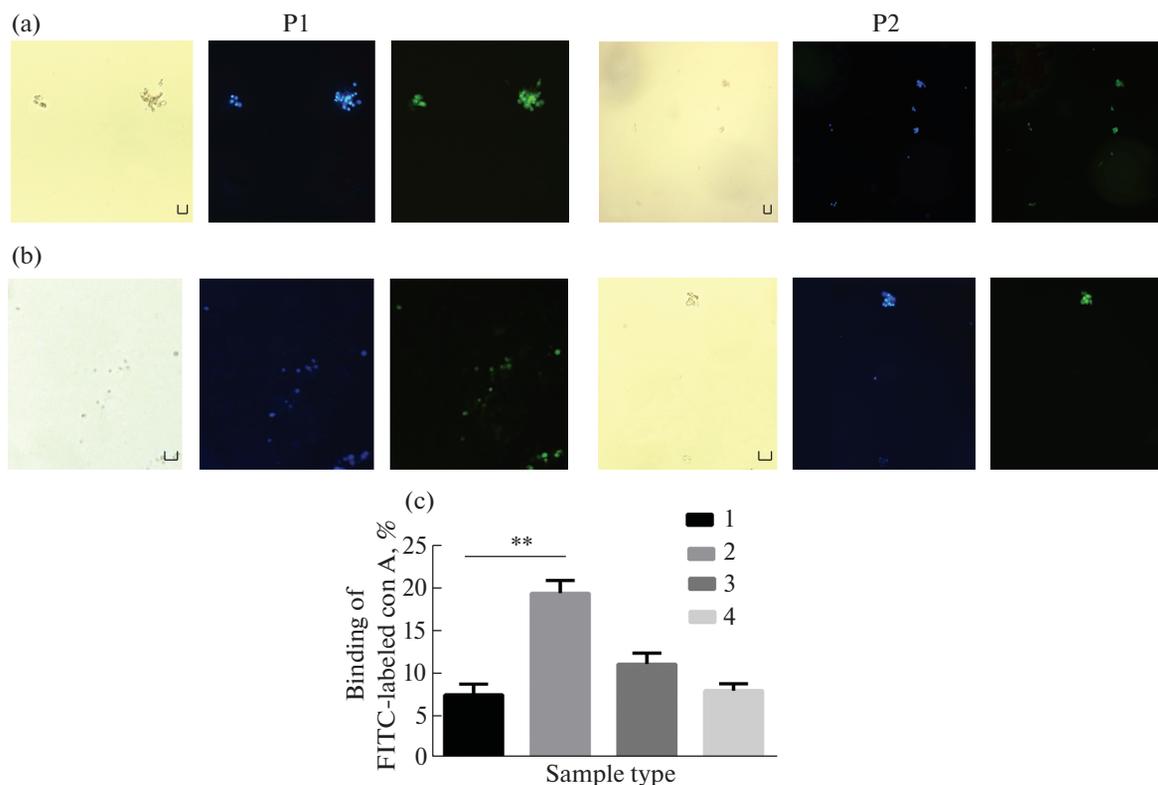


Рис. 6. Микрофотографии фагоцитов Ф1 (P1) и Ф2 (P2), проинкубированных 24 ч и окрашенных ФИТЦ-меченым con A. (a) Контроль (ФСБН). (b) Воздействие 100 мкМ дексаметазона. Здесь и на рис. 7 левая панель – клетки в проходящем свете, средняя панель – окраска ядер клеток DAPI (синяя флуоресценция), правая панель – ФИТЦ-окрашенные клетки (зеленая флуоресценция). Масштаб: 20 мкм. (c) Доля (%) фагоцитов, связывающих con A. 1 – Ф1 фагоциты, контроль; 2 – Ф1 фагоциты, воздействие дексаметазона; 3 – Ф2 фагоциты, контроль; 4 – Ф2 фагоциты, воздействие дексаметазона. ** – различия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы при $p < 0.01$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 2$. В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

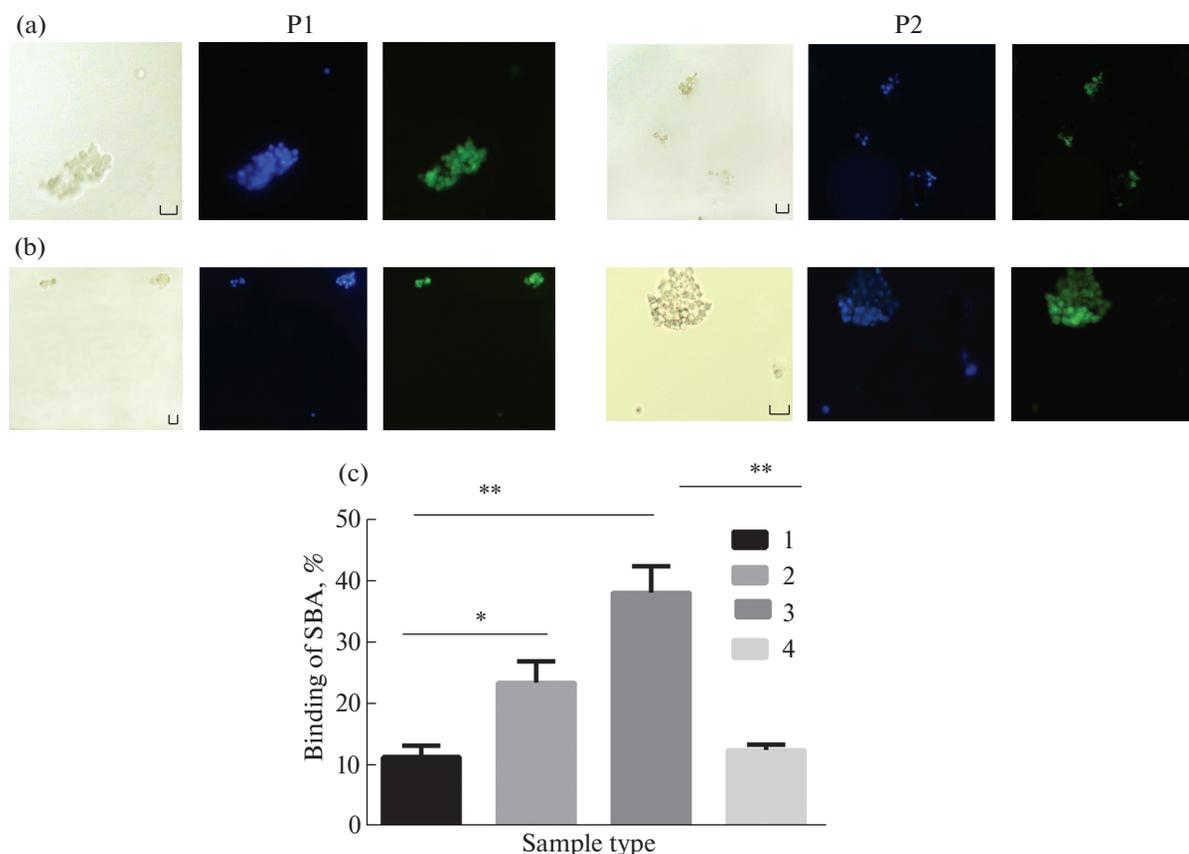


Рис. 7. Микрофотографии фагоцитов Ф1 (P1) и Ф2 (P2), проинкубированных 24 ч и окрашенных ФИТЦ-меченым SBA. (a) Контроль (ФСБН). (b) Воздействие 100 мкМ дексаметазона. (c) Доля (%) фагоцитов, связывающих SBA. 1 – Ф1 фагоциты, контроль; 2 – Ф1 фагоциты, воздействие дексаметазона; 3 – Ф2 фагоциты, контроль; 4 – Ф2 фагоциты, воздействие дексаметазона. * – различия между группами статистически достоверны при $p < 0.05$, ** – различия между группами статистически достоверны при $p < 0.01$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 2$. В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

ются как между разными классами иглокожих [8], так и между родственными видами [13]. Фагоциты были классифицированы по морфологическим признакам на субтипы, однако у авторов, описывающих фагоциты разных классов иглокожих, применяются различные подходы к классификации, что не всегда позволяет провести сравнительную идентификацию того или иного типа у разных классов [8]. Фагоциты разделяют, в частности, по диаметру клеток, на большие и маленькие [25]. Однако сами субпопуляции клеток даже внутри одного класса при делении по размеру могут накладываться друг на друга, что также затрудняет классификацию фагоцитов [8]. У голотурии *Holothuria glaberrima* наиболее часто встречаемым типом клеток являются лимфоцитоподобные клетки, имеющие маленький диаметр (4–6 мкм), большое ядро и маленький объем цитоплазмы [8]. У *E. fraudatrix* лимфоцитоподобные клетки могут иметь диаметр 2–6 мкм [26], у *Holothuria polii* самые немногочисленные и самые мелкие клетки имели диаметр 6–8 мкм [27]. Эти клетки обычно рассматриваются

как предшественники других клеток, но обладающие фагоцитарной активностью [4, 6, 8], хотя не всегда доказана возможность их дифференцировки в другие клетки [27]. Зрелые фагоциты у голотурии *H. glaberrima* имеют размер 10.8 ± 2.3 мкм [8], у *A. japonicus* – 3–5 мкм, у *C. japonica* – 5–10 мкм [7]. У *Holothuria scabra* мелкие клетки (4–5 мкм) названы лимфоцитами, доля которых в три раза меньше, чем доля фагоцитов диаметром 5–10 мкм [13].

Поскольку величины диаметров клеток двух фракций фагоцитов частично перекрываются, определение диаметра не достаточно для классификации выделенных типов фагоцитов. Полученные нами данные показывают, что клетки двух фракций отличаются и по ядерно-плазменному соотношению, что, по-видимому, обуславливает различную плотность этих клеток и приводит к соответствующим различиям в их распределении между ступенями градиента плотности, при котором клетки со сравнительно меньшим диаметром оказываются в более плотных слоях [28]. Сравнение с данными Завальной и соавт. [26] показывает, что

клетки Ф2 фракции нельзя отнести к описанным лимфоцитоподобным клеткам *E. fraudatrix*, однако на основании разной степени развитости цитоплазмы можно предположить, что Ф2 фагоциты являются менее зрелыми по сравнению с Ф1 клетками и близки по размерам лимфоцитам, описанным для ряда других голотурий [8, 13, 27].

С помощью визуализирующей проточной цитометрии в каждой из двух фракций на основании диапазона их диаметров, установленных с помощью световой микроскопии, были выделены фагоциты с размерами, в небольшой степени перекрывающимися с таковыми другой фракции. Было выявлено, что Ф1 и Ф2 фагоциты, размеры которых находились в пределах 7–12 и 5–9 мкм (по ABD), соответственно, различались не только по диаметрам, но и по степени округлости, которая у Ф1 была значительно выше, чем у Ф2. Имеется также тенденция к снижению AR в Ф2 по сравнению с Ф1 фагоцитами. Это свидетельствует о большей вытянутости клеток Ф2 фракции по сравнению с Ф1 клетками [29]. Вместе с тем известно, что форма макрофагов связана с их поляризационным статусом. В частности, М2 макрофаги имеют более вытянутую форму, что связано с их более организованным цитоскелетом [30]. На различия в свойствах цитоскелетона двух субпопуляций фагоцитов морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* указывал ранее Edds [9]. По-видимому, выявленные различия в форме Ф1 и Ф2 фагоцитов свидетельствуют в пользу их различной роли в клеточном ответе у голотурии.

Фагоциты играют важнейшую роль в защите иглокожих, в том числе голотурий, от патогенных факторов, и их число играет существенную роль в этой защите [31, 32]. У *E. fraudatrix* они составляют до 40% от общего числа целомацитов [6]. Однако голотурии, как и другие иглокожие, являясь обитателями шельфовых вод [1], подвергаются значительным колебаниям внешних воздействий, в том числе, сезонного характера, которые могут оказывать влияние на иммунитет [33]. При этом, по данным Brockton и др. [34], у морских ежей количество малых фагоцитов значительно изменяется у индивидуумов в зависимости от иммунного статуса. Однако данные о влиянии сезонности на количество фагоцитов и их отдельных фракций у голотурий практически отсутствуют.

Летний период связан со значительными вариациями в активности иммунной системы, вызванными, в первую очередь, стрессовыми температурами [33], кроме того, в этот же период происходит нерест у *E. fraudatrix* [35], что может снижать воспроизводимость результатов исследований интактных фагоцитов и экспериментальных воздействий, не связанных с изучением влияния факторов внешней среды.

В настоящей работе было проведено исследование количества целомацитов и фагоцитов в зимний, весенний и осенний периоды у *E. fraudatrix*. Общее содержание клеток целомацеллюлярной жидкости не изменялось в весенний и осенний сезоны, что соответствует данным литературы о достаточной резистентности этого параметра у иглокожих к внешним воздействиям, при том, что происходили изменения в соотношении отдельных типов клеток [36]. У *E. fraudatrix* сезонность также оказывала значительное влияние на количество фагоцитов в исследованных фракциях и/или соотношение клеток во фракциях. Зимнее снижение количества Ф1 фагоцитов может быть связано со снижением физиологической активности голотурий, в частности, постепенным снижением двигательной активности по аналогии с *A. japonicus*, для которого у берегов Приморья оно отмечено в зимний период [37]. Декабрьский минимум количества фагоцитов обеих фракций, по-видимому, связан с состоянием гипобиоза у голотурий, который был показан, в частности, у *A. japonicus* при температуре ниже 1°C [38]. *A. japonicus* и *E. fraudatrix* обитают в сходных условиях в заливе Петра Великого, и температура воды в нем в декабре достигает значений, близких к нулю, вновь начиная подниматься лишь в феврале [39].

Относительная стабильность содержания клеток Ф1 фракции, за исключением периода покоя, свидетельствует об их участии в поддержании гомеостаза организма. При этом значительное увеличение количества Ф2 фагоцитов по сравнению с Ф1 фагоцитами в отдельные периоды (февраль, октябрь) указывает на то, что функционально они отличаются от Ф1 фагоцитов. Указанные периоды совпадают со временем восстановления тканей гонад после зимнего гипобиоза у голотурий и в посленерестовый период, описанных у трепанга [40], и свидетельствуют о возможном участии Ф2 фагоцитов в регенеративных процессах.

Соответственно в период сниженной активности голотурий (декабрь) суммарный вклад обеих фракций фагоцитов в общее количество целомацитов значительно снижался по сравнению с таковым в период восстановительной активности в марте, когда он достигал значений, близких к описанным Eliseikina и Magarlamov [6]. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения в соотношении количества фагоцитов различных фракций голотурий сезонно-зависимы и, по-видимому, отражают различную роль этих клеток в организме. Значительные колебания в соотношении клеток разных фракций у иглокожих в зависимости от сезонных факторов должны приниматься во внимание при оценке данных, получаемых разными авторами.

Функциональная активность фагоцитов характеризуется прежде всего их фагоцитарной способ-

ностью, связанной с уровнем оксидантной активности в клетках [41]. Проведенное цитофлуориметрическое исследование показало, что в свежeweделенных фагоцитах $\Phi 1$ и $\Phi 2$ отмечен сходный высокий уровень продукции АФК. Полученные результаты соответствуют ранее полученным данным о высоком уровне АФК в фагоцитах голотурий по сравнению с лейкоцитами позвоночных [17] и об отсутствии различий в уровне супероксиданионрадикала между двумя фракциями свежeweделенных фагоцитов интактных животных [12].

Вместе с тем высокий уровень АФК обуславливает необходимость защиты клетки от поврежденных кислородными радикалами, что обеспечивает система антиоксидантной защиты [42]. В $\Phi 1$ клетках антиоксидантная ферментная система более эффективна, чем в $\Phi 2$ фагоцитах, о чем свидетельствует значительно более высокая активность супероксиддисмутазы (СОД), обезвреживающей супероксиданионрадикал, и глутатионтрансферазы (ГТ), детоксицирующей ксенобиотики и использующей в качестве косубстрата GSH [12]. Это свидетельствует в пользу предположения о том, что антиоксидантная ферментная система может обеспечивать сохранение оксидантно-антиоксидантного баланса даже на фоне более активной продукции АФК в $\Phi 1$ клетках. При этом в настоящей работе показано, что уровень GSH, неферментного компонента антиоксидантной системы, хотя и не отличался достоверно между двумя фракциями свежeweделенных фагоцитов голотурии, однако отмечена тенденция к его снижению в $\Phi 2$ фагоцитах по сравнению с $\Phi 1$ фагоцитами. Такая же тенденция отмечена при краткосрочной инкубации фагоцитов *in vitro* [43]. Выявленное ранее [12] снижение активности ГТ в $\Phi 2$ фагоцитах по сравнению с таковой в $\Phi 1$ фагоцитах при близких величинах активности глутатионредуктазы, которая обеспечивает восстановление окисленного глутатиона, также свидетельствует в пользу более значительного уровня продукции GSH в $\Phi 1$ фагоцитах.

Для макрофагов показано участие GSH в поляризации по M1-пути, обеспечивающему антиинфекционную защиту, и наличие более высокого значения соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона в M1 макрофагах по сравнению с M2 клетками [44]. $\Phi 1$ фагоциты, по-видимому, обладают более высокой обеспеченностью GSH по сравнению с $\Phi 2$ фагоцитами, что также может быть связано с различиями в их функциях, подобно функциональным различиям между M1 и M2 макрофагами.

Считается, что M1 макрофаги обладают более высоким уровнем продукции NO [11] и АФК [45] по сравнению с M2 макрофагами. В то же время отмечается, что вопрос о продукции АФК M2 макрофагами еще мало изучен [46], и АФК необходимы для поляризации макрофагов как по M1, так и по

M2 пути [47]. В последнее время появились данные о том, что продукция супероксиданиона может быть прерогативой обоих типов макрофагов в равной мере [48]. Ранее показано, что уровень NO также достоверно выше в $\Phi 1$ фагоцитах по сравнению с $\Phi 2$ фагоцитами [12]. Полученные же данные о сходном уровне АФК в двух типах фагоцитов аналогичны данным о сходстве этого параметра в двух типах макрофагов [48]. При этом можно предполагать, что продукция АФК в фагоцитах $\Phi 1$ может быть выше, чем в $\Phi 2$ фагоцитах, а отсутствие достоверной разницы в уровне АФК в этих клетках связано с более высоким уровнем активности СОД [12], обезвреживающей супероксиданионрадикал, относящийся к инициирующим АФК [49].

Изменения в оксидантно-антиоксидантном статусе тесно связаны с метаболическим репрограммированием иммунных клеток [50]. Различия между $\Phi 1$ и $\Phi 2$ фагоцитами в уровне антиоксидантной защиты, как ферментативной, так и неферментативной (продукция GSH), свидетельствуют в пользу представления о разных путях метаболизма в $\Phi 1$ и $\Phi 2$ фагоцитах интактных животных, основанном на наличии разных функциональных маркеров у $\Phi 1$ и $\Phi 2$ фагоцитов (уровень NO и активность аргиназы) [12], сходно с таковыми у M1 и M2 макрофагов [11]. В свою очередь, метаболический статус иммунных клеток влияет на их функции [51], и разница в метаболизме, по-видимому, лежит в основе различий ответов этих клеток, вплоть до противоположных, описанных при воздействии внешних стимулов (дексаметазон, термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis*) [12, 14].

Так, ранее было показано, что воздействие различных стрессовых факторов вызывает противоположные изменения в уровне АФК в $\Phi 1$ и $\Phi 2$ фагоцитах, что может приводить к трансформации фенотипов этих клеток. Способность к индукции изменений в функциональной активности $\Phi 1$ и $\Phi 2$ фагоцитов, сопровождающейся возрастанием продукции АФК в $\Phi 2$, но не $\Phi 1$ фагоцитах голотурии и приобретением $\Phi 1$ фагоцитами маркеров $\Phi 2$ типа, проявил, в частности, дексаметазон [12], имеющий свойство индуцировать поляризацию макрофагов по второму типу [11].

В связи с этим было предпринято также исследование возможности влияния дексаметазона на фенотип фагоцитов. Поскольку у беспозвоночных не выявлены поверхностные маркеры, схожие с таковыми у позвоночных, для фенотипирования клеток использовали один из наиболее общепотребительных методов окраски клеток растительными лектинами, связывающимися с определенными углеводными остатками белков, меченными флуоресцентным красителем [52]. В частности, окраска лектинами показала себя полезной для выявления разных стадий дифференцировки и смер-

ти макрофагов [28]. Так, *сop A* преимущественно связывается с маннанными остатками рецепторов на поверхности фагоцитов при развитии апоптоза или аутофагии [53]. По некоторым данным, связывание поверхностными рецепторами клеток SBA считается одним из наиболее надежных маркеров стадии дифференцировки макрофагов, с более высоким значением этого параметра в более зрелых тимоцитах [54] или клетках костного мозга [55]. Однако не отмечено различий в связывании SBA моноцитами и макрофагами [56]. При этом установлена положительная корреляция между связыванием SBA и апоптозом у позвоночных [57].

У *H. scabra* отмечается разница в связывании лектинов фагоцитами и лимфоцитами: первые связывались в большем количестве случаев с *сop A* и PNA (лектин из *Arachis hypogaea*), а также некоторыми другими лектинами, по сравнению с лимфоцитами [13]. При этом свежевыделенные Ф1 и Ф2 фагоциты *E. fraudatrix*, как было показано ранее, не отличаются достоверно между собой по интенсивности связывания *сop A* и PNA [14, 31]. Вместе с тем связывание SBA поверхностными рецепторами фагоцитов *E. fraudatrix*, по различным данным, могло быть как выше [31], так и ниже [14] в Ф1 фагоцитах по сравнению с Ф2 фагоцитами, что свидетельствует о том, что экспрессия соответствующего рецептора может зависеть от условий среды и сезонных факторов. В настоящей работе исследование связывания лектинов в зимний период, в отсутствие физиологической активности, связанной с репродукцией, показало, что и для контрольных фагоцитов, как и в свежевыделенных фагоцитах [14], уровень *сop A* не варьировал между фракциями. При этом уровень SBA был значительно выше в Ф2 фагоцитах по сравнению с Ф1 фагоцитами.

Дексаметазон через 24 ч инкубации индуцировал возрастание интенсивности связывания поверхностными рецепторами фагоцитов Ф1 как *сop A*, так и SBA, а в Ф2 фагоцитах — только снижение связывания SBA. Известно, что глюкокортикоиды влияют на клетки врожденного иммунитета позвоночных сложным образом. Они защищают naive моноциты от апоптоза, способствуя их дифференцировке в сторону М2 типа, в то же время индуцируют апоптоз в классически активированных моноцитах. Таким образом, действие дексаметазона зависит от типа клеток и степени их активации и направлено как на стимуляцию апоптоза в провоспалительных клетках, так и обеспечение дифференциации моноцитов в долгоживущий альтернативный тип, участвующий в восстановлении тканей [58]. Сходным образом, исследование эффектов дексаметазона на Ф1 и Ф2 фагоциты голотурии показало противоположную концентрационную зависимость апоптоза в этих клетках. В частности, дексаметазон в концентрации 100 мкМ стимулировал апоптоз в Ф1, но снижал в Ф2 фагоцитах [59]. По-видимому, противоположные или

различные изменения в связывании поверхностных рецепторов фагоцитов с SBA и *сop A* соответственно при воздействии дексаметазона в настоящей работе отражают изменения уровня апоптоза в клетках. Вместе с тем различный эффект дексаметазона на Ф1 и Ф2 фагоциты указывает, по аналогии с макрофагами, на различную степень дифференциации/активации этих клеток. Эти данные, наряду с приведенными выше данными о морфологических различиях двух типов фагоцитов (большие диаметр и плазменно-ядерное соотношение у Ф1 фагоцитов по сравнению с Ф2 клетками) свидетельствуют в пользу представлений о различной степени дифференцировки Ф1 и Ф2 фагоцитов. Об этом же свидетельствует соответствие размерности Ф1 и Ф2 фагоцитов, установленных в данной работе, значениям размерности для фагоцитов *E. fraudatrix* разной степени зрелости, представленным Завальной и соавт. [26].

В совокупности с результатами, полученными ранее о сдвигах в уровне внутриклеточных маркеров (NO и активности аргиназы) в Ф1 и Ф2 фагоцитах при действии дексаметазона в сторону преобладания Ф2 фенотипа [12], полученные данные свидетельствуют о том, что дексаметазон вызывает в Ф1 и Ф2 фагоцитах фенотипический и функциональный сдвиг, приводящий к превалированию фагоцитов второго типа, фенотипически и функционально подобных М2 макрофагам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленные различия в морфологии двух типов фагоцитов *E. fraudatrix* указывают на различную степень их зрелости. При этом фагоциты имеют различия в функциональной активности и фенотипах. Дексаметазон способен вызывать сдвиг в фенотипах обоих типов клеток, свидетельствующий о возможности сдвига в соотношении фагоцитов в пользу преобладания Ф2 клеток.

Выявленные морфофункциональные различия фагоцитов Ф1 и Ф2 лежат в основе противоположного характера изменений активности этих клеток при воздействии различных стрессовых факторов, описанных ранее, и свидетельствуют о сложном характере клеточного иммунитета у голотурий, в ряде случаев подобно таковому у позвоночных, включающему реализацию иммунного ответа по М1 или М2 пути. Дальнейшие исследования механизмов участия Ф1 и Ф2 фагоцитов в иммунном ответе как при инфекциях, так и при регенеративных процессах, позволят полнее представить эволюцию иммунитета у вторичноротых.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 121021500052-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Л.С.Д.: идея работы и планирование, проведение и анализ экспериментов, написание и редактирование манускрипта; Т.П.С.: проведение и анализ экспериментов, редактирование манускрипта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят заведующую лабораторией клеточных технологий Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН д.б.н. Н.А. Одинцову и сотрудника этой же лаборатории к.б.н. А.В. Бороду за помощь в анализе результатов цитометрических измерений, а также сотрудника лаборатории палеоокеанологии Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН к.б.н. С.П. Захаркова за помощь в получении цитометрических изображений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Granda V, Lovatelli A, Rome M (eds) (2008) Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO fisheries and aquaculture technical paper No. 516. Rome: FAO.
2. Dong Y, Sun H, Zhou Z, Yang A, Chen Z, Guan X, Gao S, Wang B, Jiang J (2014) Expression analysis of immune related genes identified from the coelomocytes of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in response to LPS challenge. *Int J Mol Sci* 15:19472–19486. <https://doi.org/10.3390/ijms151119472>
3. He L-S, Zhang P-W, Huang J-M, Zhu F-C, Danchin A, Wang Y (2018) The enigmatic genome of an obligate ancient *Spiroplasma* symbiont in a Hadal holothurian. *Appl Environ Microbiol* 84: e01965–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01965-17>
4. Li Q, Qi R, Wang Y, Ye S, Qiao G, Li H (2013) Comparison of cells free in coelomic and water-vascular system of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 35:1654–1657. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.020>
5. Chia F-S, Xing J (1996) Echinoderm coelomocytes. *Zool Stud* 35: 231–254.
6. Eliseikina MG, Magarlamov TY (2002) Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota, Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota, Cucumariidae). *Russ J Mar Biol* 28:197–202. <https://doi.org/10.1023/A:1016801521216>
7. Dolmatova LS, Eliseikina MG, Romashina VV (2004) Antioxidant enzymatic activity of coelomocytes of the Far East sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *J Evol Biochem Physiol* 40: 126–135.
8. Ramírez-Gómez F, Aponte-Rivera F, Méndez-Castaner L, García-Arrarás JE (2010) Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol* 29:175–185. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.013>
9. Edds KT (1977) Dynamic aspects of filopodial formation by reorganization of microfilaments. *J Cell Biol* 73:479–491. <https://doi.org/10.1083/jcb.73.2.479>
10. Liao W-Y, Fugmann SD (2017) Lectins identify distinct populations of coelomocytes in *Strongylocentrotus purpuratus*. *PLoS ONE* 12: e0187987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187987>
11. Dolmatova LS, Dolmatov IY (2020) Different macrophage type triggering as target of the action of biologically active substances from marine invertebrates. *Mar. Drugs* 18: 37. <https://doi.org/10.3390/md18010037>
12. Dolmatova LS., Ulanova OA, Timchenko NF (2019) *Yersinia pseudotuberculosis* thermostable toxin dysregulates the functional activity of two types of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *Biol Bull Russ Acad Sci* 46: 117–127. <https://doi.org/10.1134/S1062359019020043>
13. Prompoon Y, Weerachatanukul W, Withyachumnarnkul B, Vanichviriyakit R, Wongprasert K, Asuvapongpatana S (2015) Lectin-based profiling of coelomocytes in *Holothuria scabra* and expression of superoxide dismutase in purified coelomocytes. *Zoolog Sci* 32: 345–351. <https://doi.org/10.2108/zs140285>
14. Dolmatova LS, Ulanova OA, Timchenko NF (2021) Effect of a heat-stable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* on the functional and phenotypic traits of two types of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *Biol Bull Russ Acad Sci* 48 (4): 395–406. <https://doi.org/10.1134/S1062359021040051>
15. Dolmatova LS, Zaika OA (2007) Apoptosis-modulating effect of prostaglandin E₂ in coelomocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* depends on the cell antioxidant enzyme status. *Biol Bull Russ Acad Sci* 34: 221–229. <https://doi.org/10.1134/S1062359007030028>
16. Одинцова НА (2001) Основы культивирования морских беспозвоночных. Владивосток. Дальнаука. [Odintsova NA (2001) Bases of cultivation of marine invertebrate cells. Vladivostok. Dalnauka. (In Russ)].
17. Dolmatova LS, Eliseykina MG, Timchenko NF, Kovalova AL, Shitkova OA (2003) Generation of reactive oxygen species in the different fractions of the coelomocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* in response to the thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* in vitro. *Chinese J Oceanol Limnol* 21:293–304. <https://doi.org/10.1007/BF02860423>
18. Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 594:57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
19. Fraternali A, Crinelli R, Casabianca A, Paoletti M, Orlandi Ch, Carloni E, Smietana M, Palamara A (2013) Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF-κB and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages. *PLoS ONE* 8 (3): e57866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057866>
20. McKenzie ANJ, Preston TM (1992) Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined

- by lectin staining and density centrifugation. *Devel Comp Immunol* 16:19–30.
[https://doi.org/10.1016/0145-305x\(92\)90048-h](https://doi.org/10.1016/0145-305x(92)90048-h)
21. Гнедкова ИА, Лисяный НИ, Станецкая ДН, Розуменко ВД, Главацкий АЯ, Шмелева АА, Мальшева ТА, Черненко ОГ, Гнедкова МА (2015) Лектинсвязывающие и туморогенные свойства клеток глиомы С6. *Онкология* 17: 4–11. [Gnedkova IA, Lisyanyi NI, Stantskaya DN, Rozumenko VD, Glavatskii AY, Shmeleva AA, Malysheva TA, Chernenko OG, Gnedkova MA (2015) Lectinbinding and tumorigenic properties of C6 glioma cells. *Onkologiya* 17: 4–11. (In Russ)].
 22. Andrade C, Oliveira B, Guatelli S, Martinez P, Simões B, Bispo C, Ferrario C, Bonasoro F, Rino J, Sugni M, Gardner R, Zilhão R, Coelho AV (2021) Characterization of coelomic fluid cell types in the star fish *Marthasterias glacialis* using a flow cytometry/imaging combined approach. *Front Immunol* 12: 641–664.
<https://doi.org/10.3389/fimmu>
 23. Xing K, Yang HS, Chen MY (2008) Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquat Biol* 2: 85–92.
<https://doi.org/10.3354/ab00038>
 24. Endean R (1966) The coelomocytes and coelomic fluids. In: *Physiology of Echinodermata*. New York. Intersciences. 301–328.
 25. Henson JH, Nesbitt D, Wright BD, Scholey JM (1992) Immunolocalization of kinesin in sea urchin coelomocytes. Association of kinesin with intracellular organelles. *J Cell Sci* 103: 309–320.
<https://doi.org/10.1242/jcs.103.2.309>
 26. Zavalnaya EG, Shamshurina EV, Eliseikina MG (2020) The immunocytochemical identification of PIWI-positive cells during the recovery of a coelomocyte population after evisceration in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958) (Holothuroidea: Dendrochirota). *Russ J Mar Biol* 46: 97–104.
<https://doi.org/10.31857/S0134347520020114>
 27. Canicatti C, D'Ancona G, Farina-Lipari E (1989) The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). I. Light and electron microscopy. *Italian J Zool* 56: 29–36.
<https://doi.org/10.1080/11250008909355618>
 28. DaMatta RA, Araujo-Jorge T, de Souza W (1995) Subpopulations of mouse resident peritoneal macrophages fractionated on percoll gradients show differences in cell size, lectin binding and antigen expression suggestive of different stages of maturation. *Tissue and Cell* 27: 505–513.
[https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(05\)80059-X](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(05)80059-X)
 29. Sediq AS, Klem R, Nejadnik MR, Meij P, Jiskoo W (2018) Label-free, flow-imaging methods for determination of cell concentration and viability. *Pharm Res* 35: 150.
<https://doi.org/10.1007/s11095-018-2422-5>
 30. Luu TU, Gott SC, Woo BWK, Rao MP, Liu WF (2015) Micro and nano-patterned topographical cues for regulating macrophage cell shape and phenotype. *ACS Appl Mater Interfaces* 7 (51): 28665–28672.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b10589>
 31. Oweson C, Li C, Söderhäll I, Hernroth B (2010) Effects of manganese and hypoxia on coelomocyte renewal in the echinoderm *Asterias rubens* (L.). *Aquat Toxicol* 100:84–90.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.012>
 32. Dolmatova LS, Dolmatov IYu (2018) Lead induces different responses of two subpopulations of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. *J Ocean Univ China* 17: 1391–1403.
<https://doi.org/10.1007/s11802-018-3795-0>
 33. Li C, Fang H, Xu D (2019) Effect of seasonal high temperature on the immune response in *Apostichopus japonicus* by transcriptome analysis. *Fish Shellfish Immunol* 92: 765–771.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.012>
 34. Brockton V, Henson JH, Raftos DA, Majeske AJ, Kim Y-O, Smith LC (2008) Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin—unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. *J Cell Sci* 121: 339–348.
<https://doi.org/10.1242/jcs.012096>
 35. Долматова ЛС, Слинко ЕН, Колосова ЛФ (2018) Особенности накопления тяжелых металлов в тканях двух цветных форм голотурии *Eupentacta fraudatrix* в летне-осенний период. *Вестник ДВО РАН* 1: 71–78. [Dolmatova LS, Slinko EN, Kolosova LF (2018) Accumulation of heavy metals in tissues of two color forms of the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* in summer-autumn. *Vestn. Dal'nevost. Otd. Ross. Akad. Nauk* 1: 71–78. (In Russ)].
 36. Marčeta T, Matozzo V, Alban S, Badocco D, Pastore P, Marin MG (2020) Do males and females respond differently to ocean acidification? An experimental study with the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ Sci Pollut Res Int* 27: 39516–39530.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10040-7>
 37. Баранова ЗИ (1971) Иглокожие залива Посыета Японского моря. Исследования фауны морей 8 (16): 242–264. [Baranova ZI (1971) Echinoderms in Posyet Bay, Sea of Japan. *Studies Marine Fauna* 8 (16): 242–264. (In Russ)].
 38. Zhang L, Pan Y, Song H (2015) Chapter 9. Environmental drivers of behavior. In: *The sea cucumber *Apostichopus japonicus*. History, biology and aquaculture*. Amsterdam: Academic Press 133–152.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799953-1.00009-X>
 39. Лазарюк АЮ, Кильматов ТР, Марьина ЕН, Кустова ЕВ. (2021) Особенности сезонной изменчивости гидрологического режима бухты Новик (остров Русский, залив Петра Великого, Японское море). *Морской гидрофиз журн* 37 (6): 680–695. [Lazaryuk AYU, Kilmatov TR, Marina EN, Kustova EV (2021) Seasonal features of the Novik Bay hydrological regime (Russky Island, Peter the Great Bay, Sea of Japan). *Morsk Gidrofiz Zhurn* 37: 680–695. (In Russ)].
<https://doi.org/10.22449/0233-7584-2021-6-680-695>
 40. Левин ВС (1982) Дальневосточный трепанг. Владивосток. Дальневост кн изд [Levin VS (1982) Far-Eastern trepanng. Vladivostok. Far-East Publishers. (In Russ)].
 41. Menzel LP, Bigger CH (2015) Identification of unstimulated constitutive immunocytes, by enzyme histochemistry, in the coenenchyme of the octocoral *Swiftia exserta*. *Biol Bull* 229 (2): 199–208.
<https://doi.org/10.1086/BBLv229n2p199>
 42. Thiel M, Zourelidis C, Peter K (1996) Die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten in der Pathogenese des akuten Lungenversagens (ARDS). *Anaesthest* 45: 113–130.

43. *Morris D, Guerra C, Khurasany M, Guilford F, Saviola B, Huang Y, Venketaraman V* (2013) Glutathione supplementation improves macrophage functions in HIV. *J Interfer Cytokine Res* 33:270–279. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0103>
44. *Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C* (1998) Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3071–3076. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3071>
45. *Koren-Gluzer M, Rosenblat M, Hayek T* (2015) Paraoxonase 2 induces a phenotypic switch in macrophage polarization favoring an M2 anti-inflammatory state. *Int J Endocrinol* 2015: 915243. <https://doi.org/10.1155/2015/915243>
46. *Mendoza-Coronel E, Ortega E* (2017) Macrophage polarization modulates FcγR- and CD13-mediated phagocytosis and reactive oxygen species production, independently of receptor membrane. *Front Immunol* 8: 303. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00303>
47. *Tan H-Y, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y* (2016) The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 2795090. <https://doi.org/10.1155/2016/2795090>
48. *Lewis CV, Vinh A, Diep H, Samuel CS, Drummond GR, Kemp-Harper BK* (2019) Distinct redox signalling following macrophage activation influences profibrotic activity. *J Immunol Res* 2019: 1278301. <https://doi.org/10.1155/2019/1278301>
49. *Новиков ВЕ, Левченкова ОС, Пожилова ЕВ* (2014) Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 4: 13–21. [Novikov VE, Levchenkova OS, Pozhilova EV (2014) Role of reactive oxygen species in cell pathology and physiology and their pharmacological regulation. *Rev Clinic Pharmacol Drug Therapy* 4: 13–21. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF12413-21>
50. *Muri J, Kopf M* (2021) Redox regulation of immunometabolism. *Nat Rev Immunol* 21: 363–381. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00478-8>
51. *Fortuny L, Sebastián C* (2021) Sirtuins as metabolic regulators of immune cells phenotype and function. *Genes* 12: 1698. <https://doi.org/10.3390/genes12111698>
52. *Beri MM, Debray H, Dhainaut A, Porchet-Hennere E* (1988) Distribution and nature of membrane receptors for different plant lectins in the coelomocyte subpopulations of the Annelida *Nereis diversicolor*. *Dev Comp Immunol* 12: 1–15. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(88\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0145-305x(88)90020-1)
53. *Seco-Rovira V, Beltran-Frutos E, Ferrer C, Sanchez-Huertas MM, Madrid JF, Saez FJ, Pastor LM* (2013) Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod. *Reprod Domest Anim* 48:974–983. <https://doi.org/10.1111/rda.12196>
54. *Krugluger W, Gessl A, Boltz-Nitulescu G, Förster O* (1990) Lectin binding of rat bone marrow cells during colony-stimulating factor type 1-induced differentiation: soybean agglutinin as a marker of mature rat macrophages. *J Leukoc Biol* 48: 541–548. <https://doi.org/10.1002/jlb.48.6.541>
55. *Gengozian N, Reyes L, Pu R, Homer BL, Bova FJ, Yamamoto JK* (1997) Fractionation of feline bone marrow with the soybean agglutinin lectin yields populations enriched for erythroid and myeloid elements: transplantation of soybean agglutinin-negative cells into lethally irradiated recipients. *Transplantation* 64: 510–518. <https://doi.org/10.1097/00007890-199708150-00022>
56. *Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH* (2009) Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE* 4 (10): e7475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007475>
57. *Keppeler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M* (1999) Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology* 9:557–569. <https://doi.org/10.1093/glycob/9.6.557>
58. *Ehrchen JM, Roth J, Barczyk-Kahlert K* (2019) More than suppression: glucocorticoid action on monocytes and macrophages. *Front Immunol* 10: 2028. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02028>
59. *Dolmatov IYu, Dolmatova LS, Shitkova OA, Kovaleva AL* (2004) Dexamethasone-induced apoptosis in phagocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix*. In: *Echinoderms*. Leiden. A.A. Balkema Publ 105–119.

Morphofunctional Features of Two Types of Phagocytes in Holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958)

L. S. Dolmatova^{a,#}, and T. P. Smolina^b

^a Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

^b G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

[#]e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Phagocytes of the Far Eastern holothurian *Eupentacta fraudatrix* are separated by gradient centrifugation into two fractions (P1 and P2 phagocytes) having different functional markers. The aim of the work was to identify morphological features of P1 and P2 phagocytes, their basic oxidant/antioxidant status and phenotype. Phagocytes differ in their dimensional characteristics, granularity, nuclear/cytoplasmic ratio, and cell roundness indicators. The data obtained support both the idea that P1 and P2 phagocytes represent different levels of differentiation

and our previous findings on the different role of these cells in the immune response. Differential patterns of seasonal changes in the number of these cells also support the concept of different functional roles of the two types of phagocytes. The largest changes in the number of P1 phagocytes were detected during the period of temperature-dependent metabolic alterations in *E. fraudatrix*, while those in P2 phagocytes occurred during the periods corresponding to tissue rearrangements. The study of the basic parameters of functional activity revealed no significant differences in levels of reactive oxygen species in both P1 and P2 phagocytes, while there was a tendency toward a higher level of reduced glutathione in P1 compared to P2 phagocytes, suggesting a higher antioxidant activity in the former. Dexamethasone had a multidirectional effect on the level of binding of plant lectins derived from *Canavalia ensiformis* (con A) and *Glycin max* (SBA) by surface receptors in two types of phagocytes, further supporting the assumption of different differentiation/activity levels and functional roles of these cells.

Keywords: phagocytes, reduced glutathione, reactive oxygen species, lectins, dexamethasone, holothurians

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ЗВЕНО ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ У ЖЕНЩИН РУССКОЙ И БУРЯТСКОЙ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ МЕНОПАУЗЫ

© 2022 г. Н. В. Семёнова^{1,*}, А. С. Бричагина¹, И. М. Мадаева¹, Л. И. Колесникова¹

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

*e-mail: natkor_84@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2022 г.

После доработки 29.04.2022 г.

Принята к публикации 29.04.2022 г.

Целью исследования было оценить состояние ферментативного звена глутатионовой системы в крови у женщин русской и бурятской этнических групп в пери- и постменопаузе. В исследовании приняли участие 86 женщин европеоидной (этническая группа – русские, $n = 52$) и монголоидной (этническая группа – буряты, $n = 34$) рас в возрасте от 45 до 60 лет, имеющих пери- и постменопаузальный статус. Основанием исключения из исследования являлось применение заместительной гормонотерапии и препаратов антиоксидантного ряда, заболевания эндокринного генеза, обострение хронических заболеваний, преждевременная ранняя менопауза, а также хирургическая менопауза. Концентрацию глутатион S-трансферазы π и активность глутатионредуктазы определяли в сыворотке крови, а активность глутатионпероксидазы – в лизате эритроцитов. Выявлена более высокая активность глутатион S-трансферазы π как в перименопаузальном, так и в постменопаузальном периоде у женщин бурятской этнической группы по сравнению с представительницами русского этноса (2617.47 [2249.89; 3270.49] нг/мл и 2025.73 [1457.93; 2818.66] нг/мл соответственно в перименопаузе ($p = 0.034$) и 2815.92 [2235.68; 3065.02] нг/мл и 1931.75 [1468,17; 2932,54] нг/мл соответственно в постменопаузе ($p = 0.032$). Между фазами менопаузы выявлена более высокая активность глутатионредуктазы у женщин русской этнической группы в постменопаузе по сравнению с перименопаузой (83.9 [74.6; 90.7] Е/л и 75.5 [67.5; 80.2] Е/л соответственно ($p = 0.035$). Таким образом, ферментативное звено глутатионовой системы у менопаузальных женщин имеет этноспецифичность в отношении глутатион S-трансферазы π и глутатионредуктазы.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, глутатион S-трансфераза π , глутатионпероксидаза, менопауза, этнос

DOI: 10.31857/S004445292204009X

Начало возрастных нейроэндокринных изменений у женщин, в частности эстрогендефицит, свидетельствует о наступлении в организме менопаузального периода. Наступившая после 45 лет менопауза является возрастной физиологической и состоит из перименопаузы и постменопаузы [1]. Именно возрастной дефицит половых стероидов рассматривают в качестве одной из основных причин развития метаболических нарушений, включая развитие окислительного стресса, в данном периоде жизни [2, 3].

Большую роль в развитии дисбаланса между прооксидантами и антиоксидантами играют нарушения в работе глутатионовой системы. Глутатион является одним из наиболее важных гидрофильных антиоксидантов, чье действие реализуется как за счет участия в работе ферментативного звена, так и путем прямого взаимодействия со свободными радикалами. К настоящему времени показано,

что изменения клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза глутатиона в сторону повышенного образования его окисленной формы в течение нескольких минут после воздействия оксиданта предшествуют индуцированной оксидантом активации митохондриальной апоптотической передачи сигналов в различных типах клеток. Более того, обнаружено, что последующее восстановление окислительно-восстановительного статуса глутатиона в клетках не спасает их от исхода апоптоза [4]. Катализатором реакций конъюгации глутатиона с неполярными субстратами является фермент глутатион S-трансфераза, который состоит из трех суперсемейств: цитоплазматических, митохондриальных и микросомальных. Наиболее тесно связанными с развитием заболеваний человека являются цитоплазматические глутатион S-трансферазы, объединяющие разные классы в зависимости от их структуры, из которых наиболее часто изуча-

ют класс π [5, 6]. Образованная в результате реакции глутатиона с электрофилами окисленная его форма восстанавливается под действием глутатионредуктазы и системы тиоредоксина [7]. Таким образом, какое-либо нарушение работы ферментативного звена способствует изменению соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона, способствуя развитию в организме окислительного стресса.

К настоящему времени появляется все больше данных, свидетельствующих об этноспецифичности процессов свободнорадикального окисления и состояния антиоксидантной системы как у здоровых людей [8, 9], так и при различных патологических состояниях [10–12]. Кроме того, более раннее исследование с участием женщин русской и бурятской этнических групп в период менопаузы показало различия по параметрам процессов липопероксидации и некоторым показателям антиоксидантной системы, включая глутатион в восстановленной и окисленной форме [13], хотя различий по уровням общего холестерина и его фракций выявлено не было [14]. Встречаются исследования по изучению активности того или иного глутатионзависимого фермента при старении репродуктивной системы у женщин [15–17], однако нет работ, в которых были бы представлены результаты всего спектра ферментативного звена глутатионовой системы в зависимости от фазы менопаузы и этнической принадлежности. Учитывая вышеизложенное, была определена цель данной работы: оценить состояние ферментативного звена глутатионовой системы в крови у женщин русской и бурятской этнических групп в пери- и постменопаузе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняло участие 86 добровольцев – женщин европеоидной (этническая группа – русские, $n = 52$) и монголоидной (этническая группа – буряты, $n = 34$) рас в возрасте от 45 до 60 лет, имеющих менопаузальный статус. При формировании этнических групп учитывался генеалогический анамнез (представители, имеющие в двух поколениях родителей одной этнической группы) и самоидентификации с учетом элементов фенотипа. Исследование проведено на базе ФГБНУ “Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека” (г. Иркутск) в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г., последний пересмотр Форталеза, Бразилия, 2013 г.). Протокол исследования был одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (№ 8 от 15.12.2016 г.). Каждая женщина подписала информированное согласие на участие в исследовании.

Основанием исключения женщин из исследования явились применение заместительной гормонотерапии, применение препаратов антиоксидантного ряда, заболевания эндокринного генеза, обострение хронических заболеваний, преждевременная ранняя менопауза, хирургическая менопауза. После клинико-анамнестического обследования женщины были разделены на группы: перименопауза и постменопауза. Отнесение женщин в одну из групп климактерического периода осуществлялось согласно клиническим рекомендациям [18]. Таким образом, было сформировано 4 группы испытуемых:

– перименопауза, русская этническая группа ($n = 21$, средний возраст – 48 ± 2.81 лет, индекс массы тела (ИМТ) – 27.2 ± 4.55 кг/м²);

– постменопауза, русская этническая группа ($n = 31$, средний возраст – 55 ± 4.13 лет, ИМТ – 27.6 ± 4.81 кг/м²);

– перименопауза, бурятская этническая группа ($n = 18$, средний возраст – 49 ± 2.37 лет, ИМТ – 27.8 ± 6.14 кг/м²);

– постменопауза, бурятская этническая группа ($n = 16$, средний возраст – 55 ± 4.98 лет, ИМТ – 27.4 ± 3.49 кг/м²).

Для проведения исследований по оценке ферментативного звена системы глутатиона была использована венозная кровь, забор которой проводили с 8.00 до 9.00 ч натощак в соответствии с общепринятыми требованиями в две пробирки (с ЭДТА-К3 для получения лизата эритроцитов и clot-активатором для получения сыворотки). Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 g, сыворотку отбирали в эппендорф и замораживали. Эритроциты трижды промывали 0.9%-ным раствором NaCl, центрифугируя после каждой отмычки в течение 5 мин при 1500 g. После этого эритроциты ресуспендировали в би distilled water в соотношении 1:2, выдерживали 10 мин при $+2 - +8^{\circ}\text{C}$, после чего центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g, удаляли струму, готовый лизат в объеме 100 мкл смешивали с 1.9 мл 0.9%-ного раствора NaCl и замораживали. Сыворотку крови для определения активности глутатионредуктазы, концентрации глутатион S-трансферазы π и гемолизат для определения активности глутатионпероксидазы хранили при -40°C до проведения исследования.

Активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы определяли с использованием коммерческих наборов “Randox” (Великобритания) на автоматическом фотометре “BTS-330” (Польша). Глутатионредуктаза катализирует восстановление окисленного глутатиона в присутствии NADPH, который окисляется в NADP⁺. Глутатионпероксидаза с помощью гидроперекиси кумина катализирует окисление глутатиона, который сразу же восстанавливается с соответствующим окислением

Таблица 1. Активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и концентрация глутатион S-трансферазы π в крови женщин исследуемых групп

Показатель	Русская этническая группа		Бурятская этническая группа		<i>p</i>
	Перименопауза, <i>n</i> = 21	Постменопауза, <i>n</i> = 31	Перименопауза, <i>n</i> = 18	Постменопауза, <i>n</i> = 16	
	1	2	3	4	
Глутатионредуктаза, Е/л	75.5 [67.5; 80.2]	83.9 [74.6; 90.7]	74.7 [67.15; 88.7]	78.05 [71.8; 86.6]	0.174 ¹ (1)–(2) 0.035 ²
Глутатион S-трансфераза π , нг/мл	2025.73 [1457.93; 2818.66]	1931.75 [1468.17; 2932.54]	2617.47 [2249.89; 3270.49]	2815.92 [2235.68; 3065.02]	0.024 ¹ (1)–(2) 0.762 ² (3)–(4) 0.983 ² (1)–(3) 0.034 ² (2)–(4) 0.032 ²
Глутатионпероксидаза, Е/л	2075 [1890; 2368]	2014 [1800.10; 2526]	1952.5 [1692; 2367]	1834 [1569; 2209]	0.387 ¹

¹ Критерий Краскела–Уоллиса (ANOVA by Ranks).

² Критерий Манна–Уитни (U-Test).

NADPH в NADP⁺ в присутствии глутатионредуктазы и NADPH. Расчет результатов осуществляли согласно рекомендациям производителя. За единицу активности ферментов принимали то количество фермента, которое катализирует превращение 1.0 мкмоль субстрата в мин при 37°C. Изменения поглощения измеряли при $\lambda = 340$ нм для глутатионредуктазы с интервалом в 1 мин в течение 5 мин, для глутатионпероксидазы с интервалом в 1 мин в течение 3 мин. Активность ферментов выражали в условных единицах на 1 л сыворотки (для глутатионредуктазы) или гемолизата (для глутатионпероксидазы) (Е/л). Концентрацию глутатион S-трансферазы π (нг/мл сыворотки) определяли иммуноферментным анализом с использованием наборов “ImmunDiagnostik” (Германия) на анализаторе “BioTek EL × 808” (США) при $\lambda = 450$ нм.

Полученные данные обрабатывали в программе STATISTICA 10. Близость к нормальному закону распределения количественных признаков оценивалась визуально-графическим методом, а также критериями Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. Данные по возрасту, весу, росту и индексу массы тела имели распределение, близкое к нормальному, в связи с чем представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение ($m \pm \sigma$). Показатели ферментативного звена глутатионовой системы имели распределение, отличное от нормального, в связи с чем, представлены в виде медианы (*Me*) и интерквартильного размаха (*Q1*; *Q3*). Анализ межгрупповых различий для независимых выборок проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса и медианного теста с последующими апостериорными сравнениями с использованием кри-

терия Манна–Уитни. Критический уровень значимости принимался за 5% (0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке ферментативного звена системы глутатиона в исследуемых группах женщин выявлена более высокая концентрация глутатион S-трансферазы π как в перименопаузальном, так и в постменопаузальном периоде у женщин бурятской этнической группы по сравнению с представительницами русского этноса. Между фазами менопаузы выявлена более высокая активность глутатионредуктазы у женщин русской этнической группы в постменопаузе по сравнению с перименопаузой (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Принимая во внимание полученные нами ранее результаты, свидетельствующие о более низких концентрациях восстановленного глутатиона в обеих менопаузальных фазах у женщин бурятского этноса по сравнению с представительницами русской этнической группы (в 1.33 раза в перименопаузе и в 1.2 раза в постменопаузе) [13], выявленное различие по количеству глутатион S-трансферазы π объяснимо, поскольку данный фермент осуществляет конъюгацию глутатиона в восстановленной форме с электрофилами. Однако не было выявлено межэтнических различий по уровню окисленного глутатиона у женщин, что может свидетельствовать об отсутствии различий в активности глутатионредуктазы, подтверждаемое результатами настоящего исследования. В то же время необходимо учитывать то, что активность глутати-

он S-трансферазы π определяется полиморфными вариантами гена *GSTP1*, следовательно, в зависимости от характеристик генома разные люди могут иметь устойчивость или повышенную чувствительность к действию повреждающих факторов [19]. Можно предположить, что выявленные межэтнические различия по уровню фермента определены на генетическом уровне. В то же время результаты исследований по изучению полиморфных вариантов *GSTP1* в различных популяциях демонстрируют неоднозначные результаты. Так, при анализе распространенности гаплотипов гена *GSTP1* не выявлено каких-либо различий между популяциями русских и поляков [20], а также между этническими группами Китая [21]. Другое исследование показало значимые различия по их распространенности между турками и популяциями из Африки, Америки и Восточной Азии [22].

Результаты сравнительного анализа частоты генотипов *GSTP1* у подростков русской и бурятской этнических групп продемонстрировали превалирование аллеля “дикого” типа A, кодирующего вариант глутатион-S-трансферазы π с высокой активностью в этногруппе бурят, в то время как аллель B, продуктом которого является вариант фермента с низкой активностью, напротив, чаще встречался в русской этнической группе. Более того, было показано, что суммарная частота встречаемости аллелей B и C гена *GSTP1*, кодирующих варианты фермента с низкой активностью, выше у подростков русской этногруппы [23], что согласуется с результатами другого исследования, результаты которого демонстрируют их широкое варьирование в разных популяциях мира (у монголоидов – 21%, у европеоидов – 33%, у негроидов – 42%) [24].

В то же время результаты исследований с участием, в том числе, здоровых африканцев не продемонстрировали снижения активности глутатион S-трансферазы в плазме крови у испытуемых с полиморфизмом *Val105Val GSTP1* [25], хотя ранее другими исследователями были показаны сниженная ферментативная активность и сродство к электрофильным субстратам в тканях легких людей с данным полиморфным вариантом гена *GSTP1* [26]. Одной из причин результатов разнонаправленного характера может быть включение в исследуемые группы как мужчин, так и женщин, хотя уже показано влияние пола на метаболизм глутатиона и глутатионзависимые реакции [27, 28]. Другой причиной может быть отсутствие поправки на возраст, несмотря на то, что данный фактор является одним из ключевых, влияющих на экспрессию глутатион-S-трансферазы, что было продемонстрировано в экспериментальных исследованиях [28–30]. Согласно полученным нами результатам можно выдвинуть предположение о более раннем начале возрастного снижения экспрессии глутатион-S-трансферазы у женщин русской этнической груп-

пы по сравнению с представительницами бурятского этноса, что может быть связано с различиями гормонального статуса, поскольку роль гормонов в работе системы антиоксидантной защиты несомненна [31]. Согласно результатам проведенных ранее исследований по оценке нейроэндокринной системы у лиц женского пола русской и бурятской этнических групп второго периода зрелого возраста (средний возраст у русских 50.8 лет, у буряток – 45.1 год) выявлены более высокие уровни лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов и более низкое содержание тестостерона и эстрадиола у представительниц русской этнической группы [32]. Кроме того, у представительниц бурятского этноса в группе девушек-подростков повышен уровень активной свободной фракции трийодтиронина при более низких значениях тироксина, в группе репродуктивного возраста данная тенденция сохранена, а также отмечен более низкий уровень тиреотропного гормона [33]. К сожалению, в литературе нет аналогичных работ на выборке женщин данных этногрупп в зависимости от фазы менопаузы, а также в сравнении с репродуктивным периодом, что не позволяет оценить возрастные изменения нейроэндокринной системы в этническом аспекте интересующих нас групп. В то же время в экспериментальных работах было показано повышение активности глутатион-S-трансферазы при воздействии эстрадиолом [34, 35], а также непосредственное взаимодействие трийодтиронина и эстрадиола при регуляции экспрессии глутатион-S-трансферазы α у самок мышей [36]. Основываясь на этих результатах, можно предположить, что более высокая концентрация глутатион-S-трансферазы π у женщин бурятского этноса может быть связана с более высоким у них уровнем эстрадиола.

Принимая во внимание возрастные изменения в системе нейроэндокринной регуляции [37], мы предполагали выявить разную активность ферментативного звена глутатионовой системы в зависимости от фазы менопаузы. Действительно, у женщин русской этнической группы выявлено повышение активности глутатионредуктазы в постменопаузе, что, вероятно, связано с увеличением окислительной нагрузки на женский организм, результатом чего является повышение уровня малонового диальдегида, продемонстрированное в ряде исследований [38, 39]. Возможно, у представительниц русского этноса в постменопаузе происходит активная конъюгация глутатиона с электрофилами, вследствие чего происходит его окисление и отмечается закономерное повышение активности глутатионредуктазы для поддержания оптимального уровня трипептида в восстановленной форме. В проведенном нами ранее исследовании мы выявили, что у женщин русского этноса в постменопаузе уровень активных продуктов тиобарбитуровой кислоты, а также окисленного глутатиона ни-

же, чем в перименопаузальном периоде, а у представительниц бурятского этноса различий не было выявлено [13]. Учитывая предшествующие результаты, мы ожидали выявить у женщин русской этнической группы изменения по уровню глутатион S-трансферазы, поскольку реакция конъюгации-глутатиона с продуктами свободнорадикального окисления происходит с участием данного фермента, однако различий между фазами менопаузы мы не выявили. В недавнем экспериментальном исследовании был продемонстрирован физиологический характер изменения активности глутатионпероксидазы – фермента, восстанавливающего свободную перекись водорода до воды, а гидроперекиси до соответствующих им спиртов, прерывая цепочку перекиса липидов, тем самым не позволяя образовываться малоновому диальдегиду и 4-гидроксиноненалу, способных атаковать молекулы белков и нуклеиновых кислот: у крыс в молодом возрасте активность фермента высокая, во взрослом периоде значение практически не меняется и только при старении особей активность фермента снижается [40]. Можно предположить, что отсутствие различий в активности фермента в нашей работе связано с возрастом участниц исследования, который не превышает 60 лет.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют об этноспецифичности работы ферментативного звена глутатионовой системы у женщин с менопаузальным статусом, что по анализу доступной литературы может быть связано с возможными различиями в работе системы нейроэндокринной регуляции в исследуемых этнических группах. Для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования с участием женщин репродуктивного и пожилого возраста, в том числе с одновременным определением параметров гормонального статуса.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках НИР ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (121022500180-6) с использованием оборудования ЦКП “Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья” ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы (Н.В.С., Л.И.К.), сбор данных (Н.В.С., И.М.М.), обработка данных (Н.В.С., А.С.Б.), написание и редактирование манускрипта

(Н.В.С., И.М.М.), окончательное утверждение манускрипта (Л.И.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lumsden MA, Sassarini J* (2019) The evolution of the human menopause. *Climacteric* 22 (2): 111–116. <https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1547701>
2. *Cervellati C, Bergamini CM* (2016) Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. *Clin Chem Lab Med* 54 (5): 739–753. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0807>
3. *Taleb-Belkadi O, Chaib H, Zemour L, Azzedine F, Belkacem C, Khedidja M* (2016) Lipid profile, inflammation, and oxidative status in peri- and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 32 (12): 982–985. <https://doi.org/10.1080/09513590.2016.1214257>
4. *Circu M, Aw TY* (2012) Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1823 (10): 1767–1777. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.019>
5. *Wu B, Dong D* (2012) Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 33 (12): 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>
6. *Dong SC, Sha HH, Xu XY, Hu TM, Lou R, Li H, Wu JZ, Dan C, Feng J* (2018) Glutathione S-transferase π : potential role in antitumor therapy. *Drug Des Devel Ther* 12: 3535–3547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S169833>
7. *Scire A, Cianfruglia L, Minnelli C, Bartolini D, Torquato P, Principato G, Galli F, Armeni T* (2019) Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways. *Biofactors* 45 (2): 152–168. <https://doi.org/10.1002/biof.1476>
8. *Kolesnikova LI, Darenskaya MA, Grebenkina LA, Dolgikh MI, Astakhova TA, Semenova NV* (2014) Gender differences in parameters of lipid metabolism and of level of antioxidants in groups of juveniles – the Even and the Europeans. *J Evol Biochem Phys* 50 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1134/S0022093014010058>
9. *Lammertyn L, Mels CM, Pieters M, Schutte AE, Schutte R* (2015) Ethnic-specific relationships between haemostatic and oxidative stress markers in black and white South Africans: The SABPA study. *Clin Exp Hypertension* 37 (6): 511–517. <https://doi.org/10.3109/10641963.2015.1013123>
10. *Даренская МА, Колесникова ЛИ, Колесников СИ* (2020) Этнические аспекты метаболических реакций женщин при дисрегуляционной патологии. М Изд-во РАН: 186. [*Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI* (2020) Etnicheskie aspekty metabolicheskikh reakcij zhenshchin pri dizregulyacionnoj patologii. М Изд-во РАН: 186. (In Russ)].
11. *Mokhaneli MC, Fourie CM, Botha S, Mels CM* (2016) The association of oxidative stress with arterial compliance and vascular resistance in a bi-ethnic population: the SABPA study. *Free Rad Res* 50 (8): 920–928. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1201816>
12. *Morris AA, Zhao L, Patel RS, Jones DP, Ahmed Y, Stoyanova N, Gibbons GH, Vaccarino V, Din-Dzietham R,*

- Quyuyumi AA* (2012) Differences in systemic oxidative stress based on race and the metabolic syndrome: the morehouse and emory team up to eliminate health disparities (META-health) study. *Metabolic syndrome and related disorders* 10 (4): 252–259.
<https://doi.org/10.1089/met.2011.0117>
13. *Семенова НВ, Мадаева ИМ, Даренская МА, Колесникова ЛИ* (2019) Процессы липопероксидации и система антиоксидантной защиты у женщин в менопаузе в зависимости от этнической принадлежности. *Экология человека* 6: 30–38. [*Semenova NV, Madaeva IM, Darenskaya MA, Kolesnikova LI* (2019) Lipid peroxidation and antioxidant defense system in menopausal women of different ethnic groups. *Human Ecol* 6: 30–38. (In Russ)]
<https://doi.org/10.33396/1728-0869-2019-6-30-38>
 14. *Semenova NV, Madaeva IM, Darenskaya MA, Gavrilova OA, Zhambalova RM, Kolesnikova LI* (2018) Lipid profile in menopausal women of two ethnic groups. *Acta Biomed Scient* 3 (3): 93–98. (In Russ)].
<https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.3.14>
 15. *Ogunro PS, Bolarinde AA, Owa OO, Salawu AA, Oshodi AA* (2014) Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. *Afr J Med Med Sci* 43 (1): 49–57.
 16. *Kliscic A, Kotur-Stevuljevic J, Kavarić N, Martinovic M, Matic M* (2018) The association between follicle stimulating hormone and glutathione peroxidase activity is dependent on abdominal obesity in postmenopausal women. *Eat Weight Disord* 23 (1): 133–141.
<https://doi.org/10.1007/s40519-016-0325-1>
 17. *Ansar S, Alhefthi T, Aleem AM* (2015) Status of trace elements and antioxidants in premenopausal and postmenopausal phase of life: a comparative study. *Int J Clin Exp Med* 8 (10): 19486–19490.
 18. *Сухих ГТ, Сметник ВП, Юренева СВ, Ермакова ЕИ, Чернуха ГЕ, Якушевская ОВ* (2016) Менопауза и климатическое состояние у женщин. Клинические рекомендации. М. НМИЦ АГП им ВИ Кулакова: 38. [*Suhikh GT, Smetnik VP, Yureneva SV, Ermakova EI, Chernuha GE, Yakushevskaya OV* (2016) Menopauza i klimaktericheskoe sostoyanie u zhenshchin. *Klinicheskie rekomendacii*. М. NMIC AGP im VI Kulakova: 38. (In Russ)].
 19. *Deponte M* (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1830 (5): 3217–3266.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
 20. *Zarebska A, Jastrzebski Z, Ahmetov II, Zmijewski P, Cieszczyk P, Leonska-Duniec A, Sawczuk M, Leznicka K, Trybek G, Semenova EA, Maciejewska-Skrendo A* (2017) GSTP1 c.313A>G polymorphism in Russian and Polish athletes. *Physiol Genomics* 49 (3): 127–131.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00014.2016>
 21. *Qi G, Han C, Zhou Y, Wang X* (2022) Allele and genotype frequencies of CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, and GSTP1 gene polymorphisms among mainland Tibetan, Mongolian, Uyghur, and Han Chinese populations. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 49 (2): 219–227. Epub 2021 Nov 2.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13604>
 22. *Karaca S, Karaca M, Cesuroglu T, Erge S, Polimanti R* (2015) GSTM1, GSTP1, and GSTT1 genetic variability in Turkish and worldwide populations. *Am J Hum Biol* 27 (3): 310–316.
<https://doi.org/10.1002/ajhb.22671>
 23. *Беляева ЕВ, Ершова ОА, Астахова ТА, Бугун ОВ* (2017) Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в этнических группах, проживающих на территории Восточной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 21 (5): 576–580. [*Belyaeva EV, Ershova OA, Astakhova TA, Bugun OV* (2017) Polymorphism of glutathione-S-transferase genes in ethnic groups living in Eastern Siberia. *Vavilov J. Genetics Breeding* 21 (5): 576–580. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18699/VJ17.274>
 24. *Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E* (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (10): 1239–1248.
 25. *Lakhdar R, Denden S, Mouhamed MH, Chalgoum A, Leban N, Knani J, Lefranc G, Miled A, Chibani JB, Khelil AH* (2011) Correlation of EPHX1, GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms with anti-oxidative stress markers in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 37 (4): 195–204.
<https://doi.org/10.3109/01902148.2010.535093>
 26. *Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA* (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19 (2): 275–280.
<https://doi.org/10.1093/carcin/19.2.275>
 27. *Wang L, Ahn YJ, Asmis R* (2020) Sexual dimorphism in glutathione metabolism and glutathione-dependent responses. *Redox Biol* 31: 101410.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101410>
 28. *Fu ZD, Csanaky IL, Klaassen CD* (2021) Effects of aging on mRNA profiles for drug-metabolizing enzymes and transporters in livers of male and female mice. *Drug Metab Dispos* 40 (6): 1216–1225.
<https://doi.org/10.1124/dmd.111.044461>
 29. *Lu H, Gunewardena S, Cui JY, Yoo B, Zhong X, Klaassen CD* (2013) RNA-sequencing quantification of hepatic ontogeny and tissue distribution of mRNAs of phase II enzymes in mice. *Drug Metab Dispos* 41 (4): 844–857.
<https://doi.org/10.1124/dmd.112.050211>
 30. *Xu S, Hou D, Liu J, Ji L* (2018) Age-associated changes in GSH S-transferase gene/proteins in livers of rats. *Redox Rep* 23 (1): 213–218.
<https://doi.org/10.1080/13510002.2018.1546985>
 31. *Mancini A, Festa R, Di Donna V, Leone E, Littarru GP, Silvestrini A, Meucci E, Pontecorvi A* (2010) Hormones and antioxidant systems: role of pituitary and pituitary-

- dependent axes. *J Endocrinol Invest* 33 (6): 422–433. <https://doi.org/10.1007/BF03346615>
32. Писарева ЛФ, Одинцова ИИ, Ананина ОА, Стуканов СЛ, Столярова ВА, Павленко ОА, Самойлова ЮГ, Олейник ОА (2011) Этнические особенности антропометрических показателей гормонального статуса женщин, проживающих в Сибирском регионе. *Сибирский медицинский журнал* 26 (4–2): 222–226. [Pisareva LF, Odintsova IN, Ananina OA, Stukanov SL, Stolyarova VA, Pavlenko OA, SamoiloVA YuG, Oleinik OA Ethnic features of anthropometrical indicators of the hormonal status of women living in siberian region. *Sibirskij Med Zhurn* 26 (4–2): 222–226. (In Russ)].
 33. Kolesnikova LI, Darenskaya MA, Grebenkina LA, Sholokhov LF, Semenova NV, Osipova EV, Kolesnikov SI (2016) Indicators of pituitary-thyroid system and lipid metabolism in female representatives of the Buryat ethnos and Europeoids. *J Evol Biochem Phys* 52 (4): 299–304. <https://doi.org/10.1134/S0022093016040049>
 34. Sanchez RI, Mesia-Vela S, Kauffman FC (2003) Induction of NAD(P)H quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase activities in livers of female August-Copenhagen Irish rats treated chronically with estradiol: comparison with the Sprague-Dawley rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87 (2–3): 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.08.007>
 35. Pérez-Torres I, Guarner-Lans V, Zúñiga-Muñoz A, Velázquez Espejel R, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, Pavón N (2016) Effect of cross-sex hormonal replacement on antioxidant enzymes in rat retroperitoneal fat adipocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 1527873. <https://doi.org/10.1155/2016/1527873>
 36. Faustino LC, Almeida NA, Pereira GF, Ramos RG, Soares RM, Morales MM, Pazos-Moura CC, Ortiga-Carvalho TM (2012) Thyroid hormone and estradiol have overlapping effects on kidney glutathione S-transferase- α gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303 (6): E787–797. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00223.2012>
 37. van den Beld AW, Kaufman JM, Zillikens MC, Lamberts SWJ, Egan JM, van der Lely AJ. (2018) The physiology of endocrine systems with ageing. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6 (8): 647–658. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30026-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30026-3)
 38. Cakir T, Goktas B, Mutlu MF, Mutlu I, Bilgihan A, Erdem M, Erdem A (2016) Advanced oxidation protein products and malondialdehyde – the new biological markers of oxidative stress – are elevated in postmenopausal women. *Ginekol Pol* 87 (5): 321–325. <https://doi.org/10.5603/GP.2016.0001>
 39. Zovari F, Parsian H, Bijani A, Moslemnezhad A, Shirzad A (2020) Evaluation of Salivary and Serum Total Antioxidant Capacity and Lipid Peroxidation in Postmenopausal Women. *Int J Dent*: 8860467. <https://doi.org/10.1155/2020/8860467>
 40. Разыграев АВ, Петросян МА, Тумасова ЖН, Таборская КИ, Полянских ЛС, Базиян ЕВ, Балашова НН (2019) Изменение активности глутатионпероксидазы в плазме и сыворотке крови крыс при постнатальном развитии и старении. *Успехи геронтологии* 32 (1–2): 38–44. [Razygraev AV, Petrosyan MA, Tumasova ZhN, Taborskaya KI, Polyanskikh LS, Baziiian EV, Balashova NN. (2019) Activity of glutathione peroxidase in rat blood plasma and serum: postnatal and aging-associated alterations. *Advances Gerontology* 32 (1–2): 38–44. (In Russ)].

Enzymatic Component of the Glutathione System in Russian and Buryat Women Depends on the Menopausal Phase

N. V. Semenova^{a, #}, A. S. Brichagina^a, I. M. Madaeva^a, and L. I. Kolesnikova^a

^a *Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia*

[#] *e-mail: natkor_84@mail.ru*

The study aimed to evaluate the state of the enzymatic component of the glutathione system in peri- and postmenopausal women of the Russian and Buryat ethnic groups. The study involved 86 female volunteers of Caucasian (ethnic group Russians, $n = 52$) and Mongoloid (ethnic group Buryats, $n = 34$) races aged from 45 to 60 years, with a peri- or postmenopausal status. The exclusion criteria were the use of hormone replacement therapy and antioxidant drugs, diseases of endocrine genesis, exacerbation of chronic diseases, premature early menopause, and surgical menopause. Glutathione S-transferase π concentration and glutathione reductase activity were assayed in blood serum, while glutathione peroxidase activity was assayed in erythrocytes lysate. A higher glutathione S-transferase π activity was revealed both in the peri- and postmenopausal Buryat women compared to the Russian ethnic group: 2617.47 [2249.89; 3270.49] ng/mL vs. 2025.73 [1457.93; 2818.66] ng/mL, respectively, in perimenopause ($p = 0.034$) and 2815.92 [2235.68; 3065.02] ng/mL vs. 1931.75 [1468.17; 2932.54] ng/mL, respectively, in postmenopause ($p = 0.032$). Between the menopausal phases, A higher glutathione reductase activity was found in postmenopausal vs. perimenopausal Russian women: 83.9 [74.6; 90.7] U/L vs. 75.5 [67.5; 80.2] U/L, respectively ($p = 0.035$). Thus, the enzymatic component of the glutathione system in menopausal women reveals ethnospecificity toward glutathione S-transferase π and glutathione reductase.

Keywords: glutathione reductase, glutathione S-transferase π , glutathione peroxidase, menopause, ethnos

СЕНСОРНЫЙ ГЕЙТИНГ У МЫШЕЙ НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ РЕЦЕПТОРА СЛЕДОВЫХ АМИНОВ ПЕРВОГО ТИПА (TAAR1)

© 2022 г. А. А. Александров¹, Е. С. Дмитриева^{1,*}, В. М. Князева¹, Ю. А. Симон¹,
Н. В. Полякова¹, Л. Н. Станкевич¹, А. Ю. Александров¹

¹ Кафедра ВНД и психофизиологии Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: e.s.dmitrieva@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 26.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Следовые амины (СА) представляют собой семейство эндогенных соединений, присутствующих в центральной нервной системе животных в крайне низких концентрациях и структурно схожих с классическими биогенными аминами. В настоящее время идентифицировано семейство так называемых рецепторов следовых аминов (TAARs), функциональное значение которых во многом неясно. Целью данного исследования явилось изучение слуховых вызванных потенциалов (ВП) и определение показателей сенсорного гейтинга (СГ) у мышей нокаутных по гену рецептора TAAR1 (KO TAAR1) в хроническом эксперименте. В результате было обнаружено значительное снижение амплитуды компонента N40 в слуховых ВП у мышей KO TAAR1 по сравнению с мышами дикого типа. Абсолютный показатель СГ также был значительно меньше у мышей KO TAAR1, чем показатель СГ у мышей дикого типа, при этом относительный показатель СГ оставался неизменным. Таким образом, полученные данные показывают, что выключение рецепторов TAAR1 заметно сказывается на генерации слуховых ВП, что говорит о потенциально возможном вовлечении системы следовых аминов в процесс дозирования и фильтрации сенсорной информации.

Ключевые слова: рецепторы следовых аминов, TAAR1, сенсорный гейтинг, N40, слуховые ВП

DOI: 10.31857/S0044452922040027

Следовые амины (СА) представляют собой семейство эндогенных соединений, структурно сходных с классическими биогенными аминами; следовые амины обнаруживаются в тканях млекопитающих в наномолярных концентрациях и могут рассматриваться в качестве потенциальных нейромодуляторов [1, 2]. В частности, было показано влияние СА на дофаминергическую [3, 4], серотонинергическую [3] и глутаматергическую передачу [5, 6].

Наиболее изученным членом семейства рецепторов TAAR (trace amines associated receptors (TAARs)) является TAAR1 рецептор, который обнаруживается в центральной нервной системе и в периферических тканях [7]. TAAR1 рецептор в основном экспрессируется в наиболее значимой концентрации: в месте наибольшей плотности дофаминергических нейронов, а именно в области вентральной покрышки (VTA) и черной субстанции (SNc), в ядре дорсального шва (DRN), где наиболее представлены серотонинергические нейроны, а также в гиппокампе и амигдале [8]. Кроме того, экспрессия TAAR1 рецептора была обнаружена преимущественно в пирамидных нейронах V слоя коры

[5], подтверждая более ранние свидетельства присутствия мРНК TAAR1 рецептора во фронтальных отделах головного мозга мыши [9]. Рецепторы TAAR1 отвечают на воздействие ряда СА, таких как: β -фенилэтиламин, p-тирамин и октопамин (β -phenylethylamine, p-tyramine и octopamine).

На животных моделях [10] и в доклинических исследованиях [11] было продемонстрировано, что агонисты TAAR1 рецептора оказывают прокогнитивную [7], антипсихотическую и антидепрессивную активность [7], что позволяет рассматривать TAAR1 в качестве терапевтической мишени для лечения психических расстройств [2, 12].

В экспериментах *in vivo* было показано, что применение агонистов TAAR1 рецептора снижает гиперлокомоцию в фармакологических тестах с использованием кокаина и на нокаутных по транспортеру дофамина моделях гипердофаминергии, а также снижает частоту генерации потенциала действия в дофаминергических нейронах [3, 7]. Были получены доказательства гипочувствительности к амфетамину и базальной гиперактивности моноаминергических ядер на модели нокаутных мышей

сверхэкспрессирующих TAAR1 в головном мозге [13]. Кроме того, избирательная активация TAAR1 рецептора как парциальными, так и полными агонистами снижала импульсивное поведение у мышей линии C57Bl/6J и у мышей нокауты по NMDA рецептору [3, 5, 7, 13].

Несмотря на то, что функциональная значимость СА остается до конца не выясненной, было показано, что изменение их концентрации и/или нарушение функции рецепторов СА могут быть вовлечены в ряд нейropsychиатрических расстройств, связанных с моноаминергической дисфункцией, включая шизофрению, рекуррентное депрессивное расстройство, болезнь Паркинсона, синдром дефицита внимания и гиперактивности [2, 14]. Показано, что мыши, нокауты по TAAR1 рецептору, имеют сходные изменения поведения с наблюдаемыми при шизофрении: возрастание локомоторной активности при применении амфетамина и снижение стереотипных реакций, вызванных апоморфином [4], повышение плотности дофаминовых D2 рецепторов в полосатом теле [15], а также дефицит преимпульсного торможения стартл-реакции [16]. Мыши, нокауты по TAAR1 рецептору, демонстрируют нарушение регуляции синаптической функции, опосредованной NMDA рецептором в префронтальной коре, что выражалось в стереотипном и импульсивном поведении [5].

Сенсорный гейтинг (СГ) наряду с негативностью рассогласования (MMN) и преимпульсным торможением (PPI) является признанным нейрофизиологическим маркером шизофрении [17]. Сенсорный гейтинг (от англ. gate – ворота) – это процесс дозирования и фильтрации информации, поступающей из окружающей среды, при помощи которого мозг регулирует величину ответов на сенсорные стимулы [18]. СГ входит в группу процессов, предшествующих вниманию, которые осуществляют обработку сенсорной информации посредством соотношения и/или отбора сенсорных стимулов, не вовлекая механизмы осознанного внимания [19]. Показано, что СГ нарушается при различных психоневрологических патологиях, включая шизофрению, биполярное расстройство, посттравматическое стрессовое расстройство и т.д. [18, 20–22]. Стандартная экспериментальная парадигма изучения СГ включает в себя предъявление последовательности одинаковых коротких звуковых стимулов, которые сгруппированы в пары с фиксированным межстимульным интервалом внутри пары стимулов и большим интервалом между парами стимулов [23]. После регистрации слуховых вызванных потенциалов анализируется амплитуда компонента P50 в исследованиях, проводимых на людях, и компонент N40 в исследованиях на грызунах. Сенсорный гейтинг проявляется в подавлении компонента вызванного потенциала P50/ N40 в ответе на второй стимул в паре.

Ранее было показано [24], что агонист TAAR1 рецептора (RO 5263397) в дозировке 1 мг/кг способствует улучшению сенсорного гейтинга. Улучшение показателя сенсорного гейтинга происходило за счет увеличения амплитуды компонента N40 в ответ на первый стимул в паре (C1), по сравнению с ответом на второй стимул в паре (C2).

Поскольку агонисты TAAR1 рецептора оказывают весомое влияние на параметры сенсорного гейтинга, было принято решение изучить изменение сенсорного гейтинга у мышей нокаутных по гену рецептора TAAR1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка животных

Исследование проводилось на 3–5-месячных самцах мышей нокаутных (knockout, KO) по гену рецептора TAAR1 ($n = 11$), в качестве контроля использовались самцы дикого типа WT ($n = 11$), которые были получены при выведении нокаутных животных, средняя масса животных составила 28–30 г. Исходными линиями для получения мышей KO TAAR1 являлись 129S1/Sv и C57BL/6. Животные были получены из вивария Института трансляционной биомедицины (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия). Все животные содержались в стандартных условиях при доступе к пище и воде *ad libitum*, в помещении поддерживался 12-часовой цикл свет–темнота. Животные размещались в одиночных боксах (30 × 15 × 17 см). До начала проведения всех манипуляций с животными акклиматизация составляла 7 дней. Все опыты проводили в соответствии с международными нормами по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, 1986). Протокол эксперимента был одобрен Этическим комитетом биологического факультета СПбГУ.

Операция

В качестве наркоза использовались Золетил (70 мг/кг в/м) и Ксилазин (0.2 мг/кг в/м). Регистрирующие электроды располагались билатерально симметрично (–6 mm posterior, 3.5 mm lateral to the bregma); референтный электрод размещался в левом полушарии (–2.5 mm posterior, 3.5 mm lateral to the bregma); заземляющий электрод размещался в правом полушарии (–2.5 mm posterior, 3.5 mm lateral to the bregma); электроды фиксировались в костях черепа с помощью стоматологического пластика холодной полимеризации Акродент (АТ Стома, Украина). Операционное поле обрабатывалось Vaneocin® порошком. Внутримышечные инъекции Bicillin-5 (benzathine benzylpenicillin 100 мг/кг в/м) делались по окончании операции для профилак-

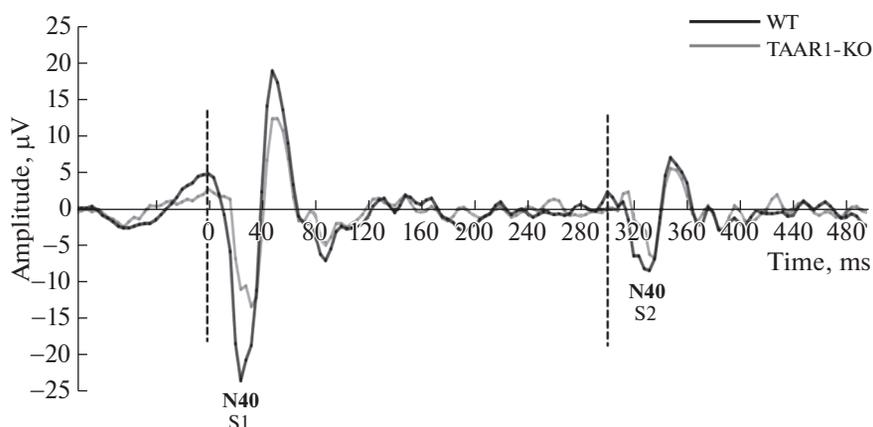


Рис. 1. Слуховые ВП возникающие при предъявлении пар стимулов.

По горизонтальной оси представлено время в мс, по вертикальной оси амплитуда в мкВ. Серая линия – ВП для группы мышей нокаутных по гену TAAR1, черная линия указывает на ВП для группы мышей дикого типа. Пунктирная линия – момент предъявления стимула. S1 и S2 – первый и второй стимул в паре соответственно.

ки инфекционных осложнений. Регистрация ЭЭГ и ВП проводились не ранее 5 дней после операции.

Процедура эксперимента

Эксперимент проводился на хронических животных в условиях свободного поведения. Животные размещались в экспериментальных боксах из плексигласа (30 × 15 × 17 см). В ходе эксперимента предъявлялись пары звуковых стимулов, длительностью 10 мс, частота заполнения 3000 Гц, интенсивность 85 дБ. Интервал между стимулами в паре был фиксирован и составлял 300 мс. Всего предъявлялось 100 пар стимулов, интервал между парами варьировал случайным образом в пределах 3–5 с. Звуки генерировались и предъявлялись через звуковые колонки, расположенные возле боксов при помощи программы Psytask v.2.4 software (Mitsar Inc.).

Запись электроэнцефалограммы (ЭЭГ) для регистрации и построения ВП проводилась на цифровом электроэнцефалографе Mitsar-EEG-05/70–201 (Mitsar Inc., St. Petersburg, Russia) при помощи программы WINEEG v.2.4 software (Mitsar Inc.). Обработка данных ЭЭГ для выделения и построения ВП, полученных в ходе эксперимента, включала удаление артефактов, связанных с грумингом (частота 100–200 Гц; амплитуда, превышающая ±500 мкВ на любом из каналов) [25]. ЭЭГ сигнал был отфильтрован в полосе 10–100 Гц. Такая фильтрация рекомендована для наилучшего выявления компонента P50/N40 на фоне более высокоамплитудных волн [26]. После выделения и построения ВП подсчитывали амплитуду компонента N40, который в слуховых ВП грызунов является аналогом компонента P50, традиционно используемого для изучения СГ у людей [27]. Амплитуда компонента N40 измерялась как среднее

значение амплитуды ВП на отрезке 20–40 мс от начала предъявления стимула. Параметры сенсорного гейтинга определялись при анализе соотношения амплитуд компонента N40 в ВП в ответах на первый и второй стимулы в паре. Показатель сенсорного гейтинга высчитывался двумя способами: абсолютный показатель СГ – определялся путем вычитания амплитуды компонента N40, полученного на второй стимул (С2) в паре из амплитуды компонента N40 полученного на первый стимул в паре (С1), и относительный показатель СГ – полученный методом деления амплитуды компонента N40 полученного в ответ на С2 на амплитуду компонента N40 полученного в ответ на С1 [28].

Статистический анализ

Все данные имели нормальное распределение согласно критерию Колмогорова–Смирнова. Статистическая оценка групповых ВП производилась с помощью методов дисперсионного анализа ANOVA по схеме повторных измерений с использованием программы IBM SPSS Statistic v. 21 (IBM Corporation, Нью-Йорк, США). Для общего анализа изменения амплитуд ответов на С1 и С2 был использован 2-факторный анализ с внутрigrupповыми факторами: “группа” (WT и KO TAAR1) и “стимул” (С1 и С2). Если в результате анализа обнаруживалось значимое влияние фактора или взаимодействие факторов, то проводился апостериорный анализ с помощью парного *t*-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные в результате исследования данные показывают, что амплитуда компонента N40 в ответ и на первый (С1), и на второй стимул в паре (С2) значительно меньше у мышей нокаутных по

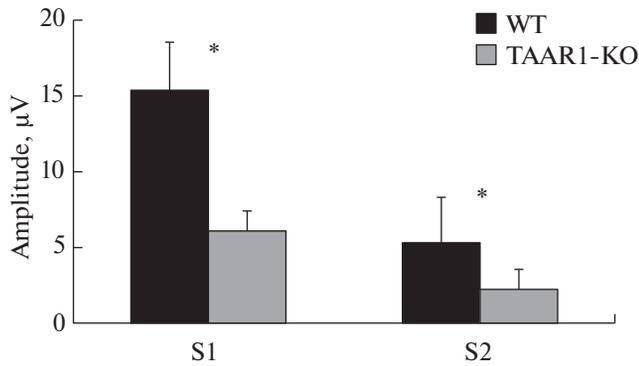


Рис. 2. Амплитуда компонента N40 слухового ВП полученного в ответ на первый (S1) и второй (S2) стимулы. По горизонтальной оси – показатели в ответ на первый (S1) и на второй (S2) стимулы в паре, по вертикальной оси – усредненные значения амплитуды компонента N40 в мкВ. Черные столбики (\pm SEM) – показатели мышей дикого типа, серые столбики (\pm SEM) – показатели мышей KoTAAR1. * – Различия достоверны $p \leq 0.05$.

гену *TAAR1*. На рисунке 1 представлены слуховые ВП для мышей нокаутных по гену *TAAR1*, в сравнении с мышами дикого типа (контрольной группы). На рисунке 2 представлены результаты подсчета амплитуды компонента N40 слуховых ВП для обеих групп мышей. Показатели амплитуды компонента N40 рассчитывались как среднее значение амплитуды ВП на промежутке 20–40 мс от начала предъявления стимула, (амплитуда компонента представлена по модулю). Двухфакторный дисперсионный анализ (фактор 1: группа (TAAR1_KO и WT), фактор 2: стимул (C1 и C2)) показал достоверное отличие обоих факторов. Фактор “группа” (TAAR1_KO и WT) $F(1, 10) = 11.28, p = 0.007$. Фактор “стимул” (C1 и C2) $F(1, 10) = 21.02, p < 0.001$. Также было выявлено достоверное взаимодей-

ствие факторов “группа” (TAAR1_KO и WT) и “стимул” (C1 и C2) $F(1, 10) = 7.28, p = 0.02$. В связи с выявлением достоверного взаимодействия факторов было проведено попарное сравнение показателей амплитуды N40, полученных в ответ на первый (C1) и второй (C2) стимул в паре. Данное сравнение показало значимое отличие амплитуды компонента N40, полученного в ответ на первый стимул в паре (C1), у нокаутных животных и животных дикого типа ($p = 0.009$) и значимое отличие амплитуды компонента N40, полученного в ответ на второй стимул в паре (C2), у нокаутных животных и животных дикого типа ($p = 0.02$).

Результаты подсчета показателей СГ показаны на рис. 3. Абсолютный показатель СГ, который определялся путём вычитания амплитуды компонента N40, полученного на второй стимул (C2) в паре из амплитуды компонента N40, полученного на первый стимул в паре (C1), достоверно снижался у мышей нокаутных по TAAR1 – $F(1, 10) = 7.3, p = 0.02$. Относительный показатель СГ, подсчитанный путем деления амплитуды компонента N40 в ответ на C2 на амплитуду компонента N40 полученного в ответ на C1, достоверно не отличался между изученными группами животных $F(1, 10) = 0.08, p = 0.78$.

Обнаружено значительное снижение амплитуды компонента N40 у мышей KO TAAR1 по сравнению с мышами дикого типа. Кроме того, абсолютное значение СГ, посчитанное методом (C1–C2), также было снижено, однако относительный показатель СГ, посчитанный методом (C1/C2), оставался неизменным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования продемонстрировали значительное ослабление компо-

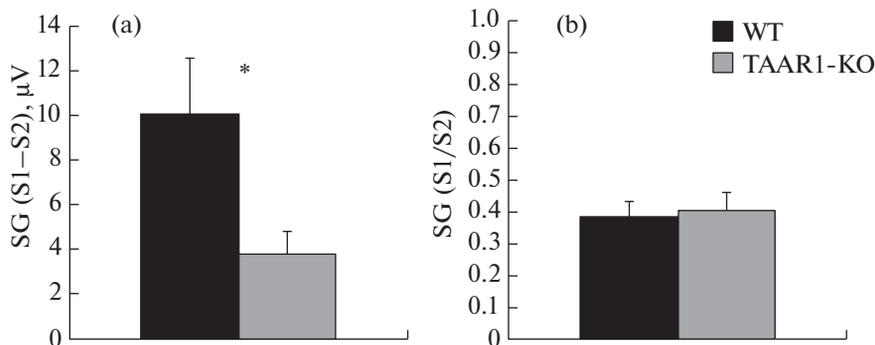


Рис. 3. Показатели сенсорного гейтинга.

а – абсолютное значение СГ (SG), посчитанное методом вычитания амплитуды компонента N40, полученного на второй стимул из амплитуды компонента N40 на первый стимул в паре (S1–S2); по вертикальной оси – значение разности амплитуд, компонента N40 в мкВ; б – коэффициент СГ, относительный показатель подавления величины компонента N40 в ответ на предъявление второго (S2) стимула в паре (S2/S1); серые столбики (\pm SEM) – показатель СГ у мышей KO TAAR1, чёрные столбики (\pm SEM) – показатель СГ у мышей дикого типа.

нента N40 слухового ВП у мышей нокаутных по гену *TAAR1* по сравнению с мышами дикого типа. Наблюдается снижение амплитуды N40 в ответ как на первый (С1), так и на второй (С2) стимул в паре. Это приводит к снижению абсолютных значений сенсорного гейтинга в группе мышей нокаутных по гену *TAAR1*. Однако коэффициент сенсорного гейтинга, показывающий относительную величину подавления ответа на второй стимул, остается неизменным.

Ранее было показано, что введение агониста *TAAR1* рецептора значительно улучшает индекс сенсорного гейтинга [24]. Причем увеличение индекса СГ происходило за счет увеличения амплитуды компонента слухового ВП N40 в ответ на первый стимул в паре (С1). Таким образом получается, что стимуляция *TAAR1* приводит к увеличению амплитуды компонента N40, тогда как отсутствие рецепторов *TAAR1* сопровождается значительным снижением компонента N40 в слуховых ВП.

Сенсорный гейтинг наряду с негативностью рассогласования (MMN) и преимпульсным торможением (PPI) является признанным нейрофизиологическим маркером шизофрении [17]. Сенсорный гейтинг по компоненту N40 у мышей рассматривается в качестве аналога сенсорного гейтинга компонента P50 у людей. Весьма интересно, что по данным ряда авторов ухудшение сенсорного гейтинга компонента P50 при шизофрении в основном связано со снижением амплитуды ответа на первый стимул в паре [18]. Наши данные указывают на возможное вовлечение системы *TAAR1* рецепторов при патологических изменениях сенсорного гейтинга при шизофрении. Следует отметить, что при этом данные по сенсорному гейтингу далеко не однородны. Наряду с этим имеются сведения об отсутствии зависимости коэффициента СГ от амплитуды первого стимула в паре (С1) [29], а классические экспериментальные работы Freedman и соавт. [23, 30, 31] связывали низкий коэффициент сенсорного гейтинга со слабой способностью к подавлению второго стимула в паре (С2).

Подавление ответа на второй стимул, с одной стороны, предположительно связывается с тормозными механизмами, лежащими в основе сенсорного гейтинга. В то же время снижение амплитуды может быть обусловлено увеличением рефрактерности нейрональных популяций, генерирующих соответствующие компоненты ВП. Поскольку в данной работе обнаружено заметное снижение электрогенеза компонента N40, окончательный вывод о природе изменения собственно сенсорного гейтинга при устранении рецепторов *TAAR1* пока делать преждевременно.

Целый ряд исследований показывает, что функциональная роль *TAAR1* может быть связана с модуляцией дофаминергической, серотонинергической и глутаматергической систем [3–5, 32]. Мы-

ши нокаутные по гену, кодирующему *TAAR1*, показывают увеличение активности дофаминергических нейронов в вентральной области покрышки [4], повышенную чувствительность D2 рецепторов в стриатуме [33], увеличение частоты спонтанной активности нейронов дорсального ядра шва [3], а также сниженную функциональную активность рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA) в префронтальной коре и стриатуме [5, 6]. Таким образом, у мышей линии *TAAR1*-КО наблюдается значительное изменение активности моноаминергических и глутаматергических нейронных систем, что, по всей вероятности, может оказать влияние на скорость и эффективность обработки сенсорной информации и сказаться на параметрах слуховых ВП.

Настоящее исследование показало, что рецепторы *TAAR1* играют важную роль в механизмах генерации слуховых ВП, поскольку у генномодифицированных животных существенно падает амплитуда компонента N40 слуховых ВП. Исследование роли системы следовых аминов и *TAAR1* в процессе дозирования и фильтрации информации представляет интерес для понимания патогенеза некоторых нейропсихиатрических расстройств.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, номер проекта 22-25-00006.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Millan MJ, Rivet JM, Gobert A (2016) The frontal cortex as a network hub controlling mood and cognition: Probing its neurochemical substrates for improved therapy of psychiatric and neurological disorders. *J Psychopharmacol* 30: 1099–1128. <https://doi.org/10.1177/0269881116672342>
2. Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M (2017) Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol Ther* 180: 161–180. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.002>
3. Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Bradaia A, Sotnikova TD, Mory R, Durkin S, Zbinden KG, Norcross R, Meyer CA, Metzler V, Chaboz S, Ozmen L, Trube G, Pou-

- zet B, Bettler B, Caron MG, Wettstein JG, Hoener MC (2011) TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 8485–8490.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103029108>
4. Lindemann L, Meyer CA, Jeanneau K, Bradaia A, Ozmen L, Bluethmann H, Bettler B, Wettstein JG, Borroni E, Moreau JL, Hoener MC (2008) Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 948–956.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.132647>
 5. Espinoza S, Lignani G, Caffino L, Maggi S, Sukhanov I, Leo D, Mus L, Emanuele M, Ronzitti G, Harmeier A, Medrihan L, Sotnikova TD, Chiergatti E, Hoener MC, Benfenati F, Tucci V, Fumagalli F, Gainetdinov RR (2015) TAAR1 Modulates Cortical Glutamate NMDA Receptor Function. *Neuropsychopharmacology* 40: 2217–2227.
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.65>
 6. Sukhanov I, Caffino L, Efimova E V., Espinoza S, Sotnikova TD, Cervo L, Fumagalli F, Gainetdinov RR (2016) Increased context-dependent conditioning to amphetamine in mice lacking TAAR1. *Pharmacol Res* 103: 206–214.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.11.002>
 7. Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, Mory R, Bradaia A, Buchy D, Metzler V, Chaboz S, Groebke Zbinden K, Galley G, Norcross RD, Tuerck D, Bruns A, Morairty SR, Kilduff TS, Wallace TL, Risterucci C, Wettstein JG, Hoener MC (2013) A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. *Mol Psychiatry* 18: 543–556.
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.57>
 8. John J, Kukshal P, Bhatia T, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Deshpande SN, Thelma BK (2017) Possible role of rare variants in Trace amine associated receptor 1 in schizophrenia. *Schizophr Res* 189: 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.02.020>
 9. di Cara B, Maggio R, Aloisi G, Rivet JM, Lundius EG, Yoshitake T, Svenningsson P, Brocco M, Gobert A, de Groote L, Cistarelli L, Veiga S, de Montiron CD, Rodriguez M, Galizzi JP, Lockhart BP, Cogé F, Boutin JA, Vayer P, Verdouw PM, Groenink L, Millan MJ (2011) Genetic deletion of trace amine 1 receptors reveals their role in auto-inhibiting the actions of ecstasy (MDMA). *J Neurosci* 31: 16928–16940.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2502-11.2011>
 10. Dedic N, Jones PG, Hopkins SC, Lew R, Shao L, Campbell JE, Spear KL, Large TH, Campbell UC, Hanania T, Leahy E, Koblan KS (2019) SEP-363856, a novel psychotropic agent with a unique, non-D2 receptor mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 371: 1–14.
<https://doi.org/10.1124/jpet.119.260281>
 11. Koblan KS, Kent J, Hopkins SC, Krystal JH, Cheng H, Goldman R, Loebel A (2020) A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia. *N Engl J Med* 382: 1497–1506.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1911772>
 12. Gainetdinov RR, Hoener MC, Berry MD (2018) Trace amines and their receptors. *Pharmacol Rev* 70: 549–620.
<https://doi.org/10.1124/pr.117.015305>
 13. Revel FG, Meyer CA, Bradaia A, Jeanneau K, Calcagno E, André CB, Haenggi M, Miss MT, Galley G, Norcross RD, Invernizzi RW, Wettstein JG, Moreau JL, Hoener MC (2012) Brain-specific overexpression of trace amine-associated receptor 1 alters monoaminergic neurotransmission and decreases sensitivity to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 37: 2580–2592.
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.109>
 14. Rutigliano G, Accorroni A, Zucchi R (2018) The case for TAAR1 as a modulator of central nervous system function. *Front Pharmacol* 8: 987.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00987>
 15. Corripio I, Escartí MJ, Portella MJ, Pérez V, Grasa E, Saúras RB, Alonso A, Safont G, Camacho MV, Dueñas R, Aranz B, San L, Catafau AM, Carrió I, Álvarez E (2011) Density of striatal D2 receptors in untreated first-episode psychosis: an I 123-IBZM SPECT study. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:861–866.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.03.004>
 16. Полякова НВ, Виноградова ЕП, Александров АА, Гайнетдинов РР Преимпульсное торможение у мышей-нокаутов по TAAR1 рецептору. *Рос физиол журн им И.М. Сеченова*. 104(9): 1098–1105. 2018. [Polyakova NV, Vinogradova EP, Aleksandrov AA, Gainetdinov RR (2018) Prepulse inhibition in the TAAR1 knockout mice. *Russ J Puysiol* 104: 1098–1105. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.010>
 17. Xia L, Wang D, Wang J, Xu H, Huo L, Tian Y, Dai Q, Wei S, Wang W, Zhang G, Du X, Jia Q, Zhu X, Wang L, Tang W, Zhang XY (2020) Association of cognitive and P50 suppression deficits in chronic patients with schizophrenia. *Clin Neurophysiol* 131: 725–733.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.12.405>
 18. Javitt DC, Freedman R (2015) Sensory processing dysfunction in the personal experience and neuronal machinery of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 172: 17–31.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.13121691>
 19. Adler LE, Pachtman E, Franks RD, Pecevic M, Waldo MC, Freedman R (1982) Neurophysiological evidence for a defect in neuronal mechanisms involved in sensory gating in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 17(6): 639–654.
 20. Karkal R, Goyal N, Tikka SK, Khanande R V., Kakunje A, Khess CRJ (2018) Sensory gating deficits and their clinical correlates in drug-free/drug-naive patients with schizophrenia. *Indian J Psychol Med* 40: 247–256.
https://doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM_53_18
 21. Martin LF, Hall MH, Ross RG, Zerbe G, Freedman R, Olincy A (2007) Physiology of schizophrenia, bipolar disorder, and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 164(12): 1900–1996.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.06010017>
 22. Stewart LP, White PM (2008) Sensory filtering phenomenology in PTSD. *Depress Anxiety* 25(1): 38–45.
<https://doi.org/10.1002/da.20255>
 23. Freedman R, Waldo M, Bickford-Wimer P, Nagamoto H (1991) Elementary neuronal dysfunctions in schizophrenia. *Schizophr Res* 4:233–243.
[https://doi.org/10.1016/0920-9964\(91\)90035-P](https://doi.org/10.1016/0920-9964(91)90035-P)
 24. Aleksandrov AA, Dmitrieva ES, Volnova AB, Knyazeva VM, Polyakova NV, Ptukha MA, Gainetdinov RR (2019) Effect of alpha-NETA on auditory event related potentials in sensory gating study paradigm in mice. *Neurosci Lett*

- 712: 134470.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134470>
25. Roger C, Hasbroucq T, Rabat A, Vidal F, Burle B (2009) Neurophysics of temporal discrimination in the rat: A mismatch negativity study. *Psychophysiology* 46: 1028–1032.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2009.00840.x>
 26. Rentzsch J, Jockers-Scherübl MC, Boutros NN, Gallinat J (2008) Test-retest reliability of P50, N100 and P200 auditory sensory gating in healthy subjects. *Int J Psychophysiol* 67: 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2007.10.006>
 27. Mears RP, Klein AC, Cromwell HC. (2006) Auditory inhibitory gating in medial pre-frontal cortex: Single unit and local field potential analysis. *Neuroscience* 141 (1): 47–65.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.040>
 28. Boutros NN, Korzyukov O, Jansen B, Feingold A, Bell M (2004) Sensory gating deficits during the mid-latency phase of information processing in medicated schizophrenia patients. *Psychiatry Res* 126: 203–215.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.01.007>
 29. Clementz BA, Blumenfeld LD, Cobb S (1997) The gamma band response may account for poor P50 suppression in schizophrenia. *Neuroreport* 8: 3889–3893.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199712220-00010>
 30. Freedman R, Adler LE, Waldo MC, Pachtman E, Franks RD (1983). Neurophysiological evidence for a defect in inhibitory pathways in schizophrenia: comparison of medicated and drug-free patients. *Biol Psychiatry* 18 (5): 537–551.
 31. Freedman R, Adler LE, Gerhardt GA, Waldo M, Baker N, Rose GM, Drebing C, Nagamoto H, Bickford-Wimer P, Franks R (1987) Neurobiological studies of sensory gating in schizophrenia. *Schizophr Bull* 13 (4): 669–678.
<https://doi.org/10.1093/schbul/13.4.669>
 32. Miller GM (2011) The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity. *J Neurochem* 116(2): 164–176.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07109.x>
 33. Espinoza S, Ghisi V, Emanuele M, Leo D, Sukhanov I, Sotnikova TD, Chierigatti E, Gainetdinov RR (2015) Postsynaptic D2 dopamine receptor supersensitivity in the striatum of mice lacking TAAR1. *Neuropharmacology* 93:308–313.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.010>

Sensory Gating in TAAR1 Knockout Mice

A. A. Aleksandrov^a, E. S. Dmitrieva^{a, #}, V. M. Knyazeva^a, Y. A. Simon^a,
 N. V. Polyakova^a, L. N. Stankevich^a, and A. Y. Aleksandrov^a

^a Department of Higher Nervous Activity and Psychophysiology, Saint Petersburg State University, St Petersburg, Russia
[#]e-mail: e.s.dmitrieva@spbu.ru

Trace amines (TA) are a family of endogenous compounds structurally similar to classical biogenic amines that may be involved in the pathogenesis of a number of neuropsychiatric disorders. One of the most studied and perspective member of the TA associated receptors (TAARs) family is the TAAR1. The aim of the present study was to investigate the sensory gating (SG) in freely moving TAAR1 knockout mice in a chronic experiment. The study of SG was conducted in the paired-click paradigm. The SG indices were calculated as an absolute value by subtracting the second stimulus response amplitude from the first stimulus response amplitude (S1–S2) and as a relative value calculated by dividing the S2 amplitude by the response amplitude on S1 (S2/S1). As a result, a significant decrease in the amplitude of the N40 component was found in TAAR1 knockout mice compared to wild-type mice. In addition, the absolute value of sensory gating calculated by the S1–S2 method was also reduced, but the relative value of sensory gating denoted as S1/S2 ratio remained unchanged. Thus, the data obtained indicate the involvement of TAAR1 in the generation of auditory evoked potentials and the potential involvement of the trace amine system in the dosing and filtering of sensory information.

Keywords: trace amine associated receptors, TAAR1, sensory gating, N40, auditory event related potentials (ERPs)

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОТРОФИНОВ И КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ТИПАХ ОЖИРЕНИЯ

© 2022 г. И. М. Колесникова^{1,*}, А. М. Гапонов^{2,3}, С. А. Румянцев^{1,2},
Л. А. Ганенко⁴, Н. И. Волкова⁴, Т. В. Григорьева⁵, А. В. Лайков⁵,
В. В. Макаров⁶, С. М. Юдин⁶, А. В. Шестопалов^{1,2,7}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Центр цифровой и трансляционной биомедицины “Центр Молекулярного Здоровья”, Москва, Россия

³ НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, Москва, Россия

⁴ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

⁵ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁶ “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью”
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁷ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

*e-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 28.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Ожирение ассоциировано с дисбалансом кишечного микробиома и риском поражения нервной системы, при этом риск развития осложнений определяется метаболическим типом ожирения. Целью работы стало изучение взаимосвязи кишечного микробиома и содержания нейротрофинов (BDNF и NGF) при различных метаболических типах ожирения. Обследовано 130 здоровых доноров без ожирения и 104 пациента с ожирением, которые были разделены по метаболическому типу ожирения на подгруппы с метаболически здоровым (МЗО, $n = 40$) и метаболически нездоровым типом (МНЗО, $n = 55$). У пациентов проводились измерение сывроточной концентрации нейротрофинов и определение таксономического состава микробиома кишечника методом секвенирования переменного участка гена 16S рРНК. Таксоны, положительно коррелировавшие с концентрацией BDNF, в основном были представлены бутират и/или ГАМК-продуцирующими микроорганизмами, способными деградировать муцин. Среди здоровых доноров, наиболее распространенным подобным таксоном, было семейство *S24-7*. При МЗО спектр таких таксонов включал *Bacteroides spp.*, *Rikenellaceae*, *Oscillospira spp.*, [*Barnesiellaceae*], *B. ovatus* и *Anaerostipes spp.*, а при МНЗО – *Bifidobacterium spp.* и *Coprococcus spp.* Также был выявлен спектр таксонов, негативно коррелировавших с уровнем BDNF, большая часть которых при ожирении принадлежала к грамположительной флоре. Спектр таксонов, коррелировавших с уровнем BDNF, был уникален для каждой группы пациентов, что предполагает значительную роль межвидового взаимодействия микроорганизмов. Содержание NGF при ожирении было ассоциировано с рядом таксонов, тогда как у здоровых лиц подобная связь практически отсутствовала. Позитивные ассоциации с уровнем NGF были отмечены для *Odoribacter spp.* при МЗО и *Slackia spp.* при МНЗО. Негативную взаимосвязь с концентрацией NGF при МЗО проявляли *H. parainfluenzae*, *Erysipelotrichaceae*, *Megamonas spp.* и *Clostridiaceae*, а при МНЗО – *ML615J-287* и *Clostridiales*. Таким образом, ожирение связано с появлением взаимосвязи “кишечный микробиом – NGF”, что не характерно для здоровых доноров, и, по-видимому, является следствием усиления кишечной проницаемости.

Ключевые слова: кишечный микробиом, микробиота кишечника, альфа-разнообразие, нейротрофины, фактор роста нервов, NGF, нейротропный фактор мозга, нейротрофический фактор мозга, BDNF, ожирение, метаболически здоровое ожирение, метаболически нездоровое ожирение

DOI: 10.31857/S0044452922040076

Количество публикаций, демонстрирующих многочисленные взаимодействия макроорганизма и кишечной микробиоты, неуклонно растет с каждым годом. Ожирение представляет собой одну из патологий, тесно связанных с кишечным микро-

биомом [1]. Микробиом кишечника при ожирении, с одной стороны, претерпевает существенные изменения, с другой стороны, является непосредственным участником патогенеза в формировании инсулинорезистентности, метаболического син-

дрома и диабета [2]. Некоторые таксоны микробного сообщества кишечника демонстрируют прямую взаимосвязь с индексом массы тела (ИМТ) при ожирении [3]. Для ожирения характерно снижение микробного разнообразия кишечника, а также значительные изменения в таксономическом составе микробиома уже на уровне филумов [4].

Представители микробного сообщества кишечника вовлечены в энергетический обмен макроорганизма. Они способны переваривать углеводы, не гидролизующие ферментами человека, и производить из них короткоцепочечные жирные кислоты (short-chain fatty acids, SCFAs), такие как ацетат, пропионат и бутират. SCFAs перекрывают до 10% суточной потребности в энергии и являются одним из основных энергетических субстратов для эпителия толстого кишечника и печени [5]. Помимо энергетической роли SCFAs являются и сигнальными молекулами. SCFAs, взаимодействуя с рецепторами GPR41 и GPR43, регулируют выработку гормонов кишечника (глюкагоноподобных пептидов 1-го и 2-го типов, пептида YY) и оказывают модулирующее влияние на иммунную систему [6]. Также SCFAs вовлечены в регуляцию энергетического гомеостаза. Было показано, что SCFAs способны подавлять липолиз в жировой ткани, усиливать окисление жирных кислот в печени, стимулировать термогенную дифференцировку адипоцитов, а также улучшать чувствительность к инсулину у здоровых лиц, но не у пациентов с метаболическими нарушениями [7].

Взаимодействие микробиома и иммунной системы не ограничивается SCFAs. Повышение кишечной проницаемости, характерное для ожирения, способствует проникновению бактериальных компонентов под слизистую оболочку кишечника [1]. Бактериальные липополисахариды (LPS) и флагеллин, взаимодействуя с toll-подобными рецепторами (toll-like receptors, TLRs), способствуют развитию воспаления, а также тесно связаны с увеличением массы тела и формированием инсулинорезистентности [2].

Исследования в последние годы показали, что кишечный микробиом модулирует развитие и функционирование центральной и энтеральной нервных систем (ЦНС и ЭНС соответственно), включая нейрогенез, миелинизацию, синаптическую обрезку, активность микроглии и астроцитов, проницаемость гематоэнцефалического барьера и т.д. [8, 9]. Было показано, что диета с высоким содержанием жиров приводит к изменению микробиома кишечника, нейропатии ЭНС и снижению чувствительности к глюкагоноподобному пептиду 1 типа [10]. Подобные результаты предполагают, что кишечные бактерии способны влиять на гомеостаз глюкозы, что особенно важно для пациентов с ожирением. Для лиц с избыточной массой тела также характерно формирование нейровоспаления, которое приводит к таким распространенным

осложнениям ожирения, как поражение ЦНС и периферической нервной системы [11].

Однако не все пациенты с ожирением имеют одинаковый риск развития осложнений. Принято выделять метаболически здоровый и метаболически нездоровый типы ожирения (МЗО и МНЗО соответственно). Пациенты с МЗО имеют низкий риск развития осложнений, ассоциированных с ожирением, тогда как у лиц с МНЗО существенно выше [12].

Учитывая негативное влияние ожирения и изменений в кишечном микробиоме на нервную систему, интересным представляется изучение влияния бактериального сообщества кишечника на содержание нейротрофинов у пациентов с ожирением. Нейротрофины представляют собой белки, способствующие дифференцировке, функционированию и выживанию нейронов. К семейству нейротрофинов относят: фактор роста нервов (Nerve Growth Factor, NGF), нейротрофический фактор мозга (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF), а также нейротрофин 3 и нейротрофин 4 (также называемый нейротрофин 4/5 или нейротрофин 5).

Данные о влиянии микробиома на уровень BDNF порой противоречивы. Например, показано, что у мышей-гнотобионтов (Germ-free mice, GF мыши) или у мышей после использования антибиотиков наблюдается увеличение экспрессии BDNF в головном мозге [13, 14]. Другие исследования, напротив, указывают на то, что у GF мышей или у животных после применения противомикробных средств наблюдается снижение экспрессии этого нейротрофина в ЦНС [15–17]. Также снижение экспрессии гена BDNF в гиппокампе наблюдалось у мышей после тотального облучения брюшной полости [18]. Подобные различия могут быть объяснены тем, что BDNF имеет несколько альтернативных стартовых сайтов, которые подвержены разным регуляторным механизмам, а также следует учитывать возможное разнонаправленное влияние на экспрессию BDNF различных штаммов кишечных бактерий [19].

Было показано, что положительное влияние на экспрессию BDNF оказывают как пробиотики, так и пребиотики. Исследование Savignas и соавт. [20] выявило, что опосредованная пребиотиками пролиферация кишечной микрофлоры увеличивает экспрессию BDNF в головном мозге крыс. O'Sullivan и соавт. [21] продемонстрировали, что использование *Bifidobacterium breve* 6330 способствовало увеличению экспрессии BDNF в головном мозге крыс, не подвергавшихся действию стрессового фактора в раннем возрасте. Аналогичное влияние на усиление синтеза BDNF оказало применение *Clostridium butyricum* у крыс с депрессивно-подобным поведением [22]. Работа, проведенная на модели рыбок данио (*Danio rerio*), показала, что использование пробиотика *Lactobacillus rhamnosus* привело к почти двукратному увеличению экспрессии гена BDNF в мозге, однако не повлияло на

синтез этого нейротрофина в кишечнике [23]. Причем подобные изменения в экспрессии BDNF были связаны с изменением профиля метилирования гена данного нейротрофина, что демонстрирует влияние кишечной микробиоты на эпигенетический ландшафт [24]. Недавнее исследование Hwang и соавт. [25] показало, что использование добавки сои, ферментированной *Lactobacillus plantarum* C29, у людей способствовало улучшению когнитивных функций и увеличению сывороточной концентрации BDNF.

Следует отметить, что взаимосвязь “кишечный микробиом – BDNF” является двусторонней. Исследование Li и соавт. [26] показало, что у BDNF-нокаутных мышей наблюдаются изменения в ультраструктуре толстого кишечника и снижение экспрессии белков плотных контактов в этой части желудочно-кишечного тракта. Таким образом, BDNF регулирует барьерную функцию слизистой оболочки кишечника и оказывает влияние на кишечный микробиом [26]. Кроме этого, BDNF подавляет апоптоз клеток кишечной глии, что также вносит свой вклад в поддержание кишечного барьера [27].

Синтез и секреция NGF также могут зависеть от представителей кишечной микробиоты. Ряд работ выявили влияние бактерий на образование этого нейротрофина в клеточных моделях [28, 29]. При этом Sudo и соавт. [15] показали, что у GF мышей и мышей, выращенных классическим способом, не различаются уровни NGF в мозге. У пациентов с рассеянным склерозом полугодовой прием пробиотиков не привел к изменению плазменной концентрации NGF, тогда как содержание BDNF в плазме увеличилось [30]. Однако было показано, что у крыс усиливается экспрессия NGF в ЦНС на фоне применения пробиотиков в модели эпилепсии, стимулированной пентилентетразолом [31].

В настоящее время совершаются попытки коррекции ожирения и его метаболических нарушений с использованием про- и пребиотиков, однако полученные данные пока еще не убедительны [32]. Остается неясным, как влияет кишечный микробиом и его отдельные таксоны на уровень нейротрофинов у пациентов с нормальной массой тела и при ожирении, а также играет ли роль в данном взаимодействии метаболический тип ожирения, что и стало целью нашей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было проведено когортное одномоментное исследование на базе центра цифровой и трансляционной биомедицины ООО “Центр молекулярного здоровья”, кафедры внутренних болезней № 3, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России и ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” в период 2018–2020 гг. Было обследовано 233 человека, из которых впоследствии было сформировано две группы испытуемых: Группа 1 (контрольная группа, контроль) и Группа 2 (пациенты с

ожирением). В Группу 1 были включены 130 пациентов без ожирения с ИМТ от 18.5 до 24.9 кг/м², при отсутствии метаболических нарушений (дислипидемия, гипергликемия, гиперурикемия) и без признаков артериальной гипертензии. Группа 2 была сформирована из 103 пациентов с ожирением (ИМТ ≥ 30 кг/м²) и с окружностью талии более 102 см у мужчин или 88 см у женщин. Исследуемые группы были сопоставимы по гендерному составу: Группу 1 составили 21 мужчина и 109 женщин, а Группу 2 – 21 мужчина и 82 женщины ($p > 0.05$).

Также пациенты Группы 2 были разделены на две подгруппы: пациенты с МЗО ($n = 40$) и пациенты с МНЗО ($n = 55$) в соответствии с критериями NCEP-АТР III (табл. 1) [33]. Полученные подгруппы также были сопоставимы по гендерному составу ($p > 0.05$). Для 8 пациентов с ожирением не было получено убедительных данных для включения их в одну из подгрупп, поэтому результаты их исследований не были включены в анализ влияния микробиома кишечника на сывороточную концентрацию нейротрофинов при различных метаболических типах ожирения.

У всех пациентов проводили сбор образцов фекалий и отбор венозной крови, в образцах сыворотки которой проводилось определение концентрации нейротрофинов BDNF и NGF методом мультиплексного иммуноферментного анализа на анализаторе Magpix (BioRad, США) с использованием наборов Milliplex: Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 и Human Myokine Magnetic Bead Panel (Merck, Германия). Выделение ДНК из образцов кала проводилось при помощи набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Нидерланды) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование переменного участка v3-v4 гена 16S рРНК проводили на платформе “Illumina MiSeq” на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета. Полученные последовательности генов были проанализированы с помощью программы “QIIME v.1.9.1” с использованием референсной базы данных “Greengenes v.13.8” с 97%-ным порогом сходства между последовательностями. Данные представленности бактериальных таксонов в общем пуле ридов были получены в долях (от 0 до 1), которые были рассчитаны на основе количества картированных ридов для каждого таксона. Особенности кишечного микробиома, характерные для этих пациентов, отражены в работе Гапонова и соавт. [4]. Для характеристики альфа-разнообразия кишечного микробиома были рассчитаны:

- Общее количество наблюдаемых операционных таксономических единиц (Observed OTUs). Операционная таксономическая единица – суррогатный таксономический уровень, результат кластерного объединения результатов секвенирования генов 16S РНК бактерий с 97%-ной идентичностью;

Таблица 1. Критерии NCEP-АТР III, использованные для определения метаболического типа ожирения [33]

Критерий	Значение критерия
Объем талии	
мужчины	>102 см
женщины	>88 см
Триглицериды	≥1.7 ммоль/л (150 мг/дл)
Холестерол ЛПВП	
мужчины	<1.03 ммоль/л (40 мг/дл)
женщины	<1.29 ммоль/л (50 мг/дл)
Артериальное давление	
систолическое	≥130 мм. рт.ст.
диастолическое	≥85 мм. рт.ст.
Глюкоза натощак	≥5.6 ммоль/л (110 мг/дл)
Метаболически здоровое ожирение	<3 критериев
Метаболически нездоровое ожирение	≥3 критериев

• Индекс Chao1 – мера скрытого разнообразия, прогнозирует количество таксонов в выборке путем экстраполяции редких микроорганизмов, которые могли быть упущены из-за недостаточной выборки;

• Филогенетическое разнообразие (Phylogenetic diversity whole tree, PD whole tree), демонстрирующее удаленность таксонов на филогенетическом древе;

• Индекс Shannon – мера разнообразия и равномерности таксонов в выборке;

• Индекс Simpson – индекс разнообразия, демонстрирующий вероятность того, что две случайно выбранные особи принадлежат к разным видам.

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Содержание нейротрофинов в Группе 1 и 2 соответствовало нормальному распределению, однако в подгруппах, ввиду меньшей выборки, распределение данных содержания нейротрофинов и показателей альфа-разнообразия не всегда носило нормальный характер, поэтому полученные данные были представлены в виде медианы и ее 95%-ного доверительного интервала, а сравнение групп/подгрупп между собой проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Для установления наличия или отсутствия влияния разнообразия кишечного микробиома на содержание нейротрофинов пациенты Группы 1 и Группы 2, а также пациенты с МЗО и МНЗО были разделены на три подгруппы: с высокими, средними и низкими показателями α -разнообразия. Разделение по каждому из показателей альфа-разнообразия на подгруппы проводилось по квантилям. Для выявления различий между содержанием нейротрофинов в сформированных подгруппах использовался однофакторный дисперсион-

ный анализ (ANOVA) при условии нормального распределения и равенства дисперсий в подгруппах. В случае отсутствия нормального распределения и/или равенства дисперсий в сформированных подгруппах для выявления различий использовался непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Различия между группами и подгруппами считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Для многих таксонов не было характерно нормальное распределение, поэтому для установления взаимосвязи между содержанием отдельных таксонов кишечного микробиома и концентрацией нейротрофинов был проведен корреляционный анализ с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Коэффициенты корреляции (ρ) принимались во внимание если они по модулю были более 0.3 (умеренная сила связи в соответствии со шкалой Чеддока) при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для пациентов с ожирением, вне зависимости от его метаболического типа, оказалось характерно снижение сывороточной концентрации NGF, при этом содержание BDNF не отличалось от здоровых доноров (табл. 2). Микробное разнообразие кишечного сообщества было более разнообразным у лиц с МЗО по сравнению с контрольной группой. Напротив, МНЗО было ассоциировано со сниженными показателями α -разнообразия.

Разделение исследуемых групп пациентов на подгруппы в зависимости от величины индексов Shannon, PD whole tree и количества observed OTUs не выявило взаимосвязи данных показателей альфа-разнообразия с содержанием BDNF ни в одной из исследуемых групп. Однако у пациентов Группы 1 и пациентов с МЗО разделение на подгруппы по

Таблица 2. Содержание нейротрофинов в сыворотке и характеристики α -разнообразия микробиома кала у исследуемых групп пациентов

	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
BDNF, нг/мл	7208.3 [6567.3–7952.3]	8063.4 [7087.5–8758.8]	8109.4 [6790.3–8827.4]	8017.0 [6538.2–8898.2]
NGF, нг/мл	0.56 [0.52–0.70]	0.46* [0.37–0.52]	0.45* [0.34–0.52]	0.52* [†] [0.38–0.54]
Индекс Simpson	0.981 [0.979–0.982]	0.977 [0.975–0.981]	0.978 [0.971–0.986]	0.976 [0.973–0.981]
Индекс Shannon	7.80 [7.71–7.90]	7.82 [7.63–8.11]	8.28* [7.67–8.76]	7.63 [†] [7.46–7.90]
Индекс Chao1	4010.16 [3871.53–4256.37]	4018.56*[3647.52–4492.64]	4899.13*[4139.88–5384.25]	3631.75 [†] [3214.01–4118.26]
Observed OTUs	1974.50[1865.86–2060.00]	2015.00[1930.17–2285.94]	2479.00*[1982.88–2727.61]	1930.00 [†] [1743.64–2125.33]
PD whole tree	43.52 [42.76–45.16]	41.09* [38.33–42.32]	41.44 [38.12–44.70]	38.90* [36.11–42.37]

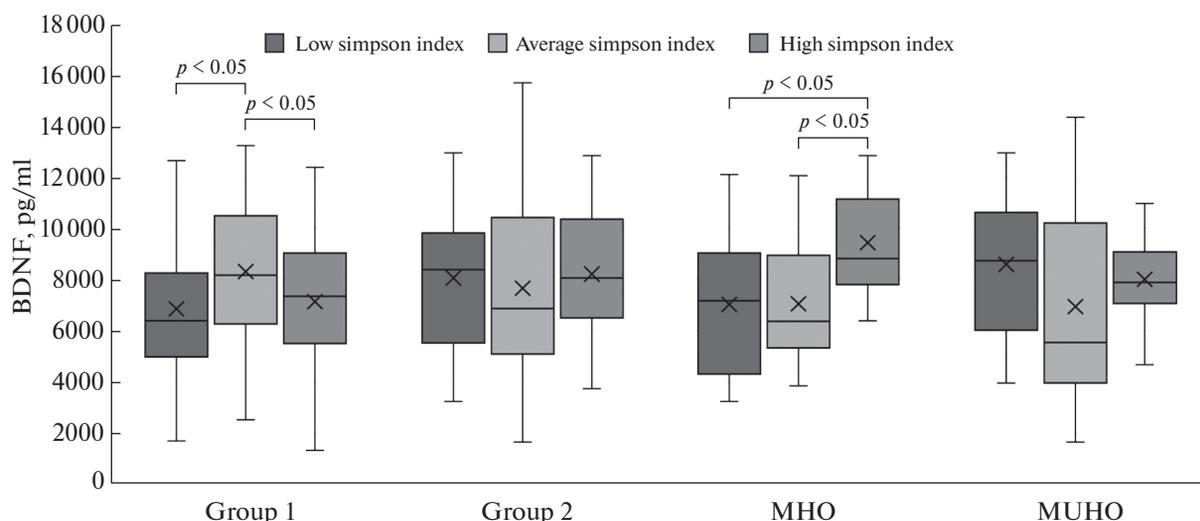
Примечание: данные представлены в виде медианы и ее 95%-ного доверительного интервала; * – различия достоверны по сравнению с Группой 1 ($p < 0.05$); [†] – различия достоверны по сравнению с МЗО ($p < 0.05$).

величине индекса Simpson привело к появлению достоверных различий между подгруппами в содержании BDNF (рис. 1). При этом для пациентов Группы 2 и пациентов с МНЗО подобной взаимосвязи выделено не было. По-видимому, наличие взаимосвязи между сывороточной концентрацией BDNF и индексом Simpson у пациентов Группы 1 и пациентов с МЗО является показателем “здорового” взаимодействия микробиома и макроорганизма. При этом в Группе 1 максимальное содержание BDNF в плазме наблюдалось у пациентов со средними значениями индекса Simpson. У пациентов с МЗО, напротив, наибольшее содержание BDNF было выявлено среди пациентов с высокими значениями индекса Simpson.

Для пациентов с МНЗО была характерна ассоциация содержания BDNF и индекса Chao1, тогда как у других исследуемых групп подобной взаимосвязи не наблюдалось (рис. 2). При этом у пациентов с МНЗО с низкими значениями индекса Chao1 наблюдалось максимальное содержание BDNF,

тогда как при высоких значениях индекса Chao1 концентрация BDNF в сыворотке была ниже. В отличие от индекса Simpson, индекс Chao1 – мера скрытого разнообразия, полученная путем экстраполяции редких микроорганизмов, которые могли быть упущены из-за недостаточной выборки. По-видимому, увеличение содержания редких микроорганизмов в кишечном микробиоме ассоциировано с негативным влиянием на уровень BDNF крови при данном типе ожирения. Подобное предположение подтверждают и результаты корреляционного анализа. Для пациентов с МНЗО была выявлена обратно пропорциональная связь между содержанием BDNF и такими показателями альфа-разнообразия, как индекс Chao1 ($\rho = -0.317$, $p < 0.05$) и Observed OTUs ($\rho = -0.331$, $p < 0.05$).

Мы не обнаружили взаимосвязи характеристик α -разнообразия с содержанием NGF в сыворотке крови у пациентов Группы 1 и пациентов с МЗО. Однако для общей группы пациентов с ожирением (Группа 2) и пациентов с МНЗО распределение на

**Рис. 1.** Содержание BDNF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости от величины индекса Simpson.

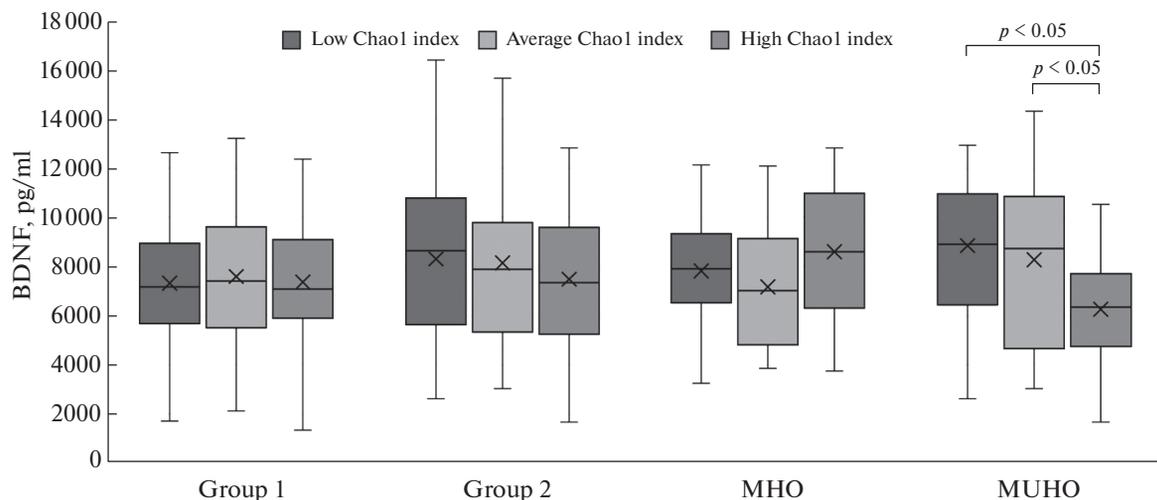


Рис. 2. Содержание BDNF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости от величины индекса Chao1.

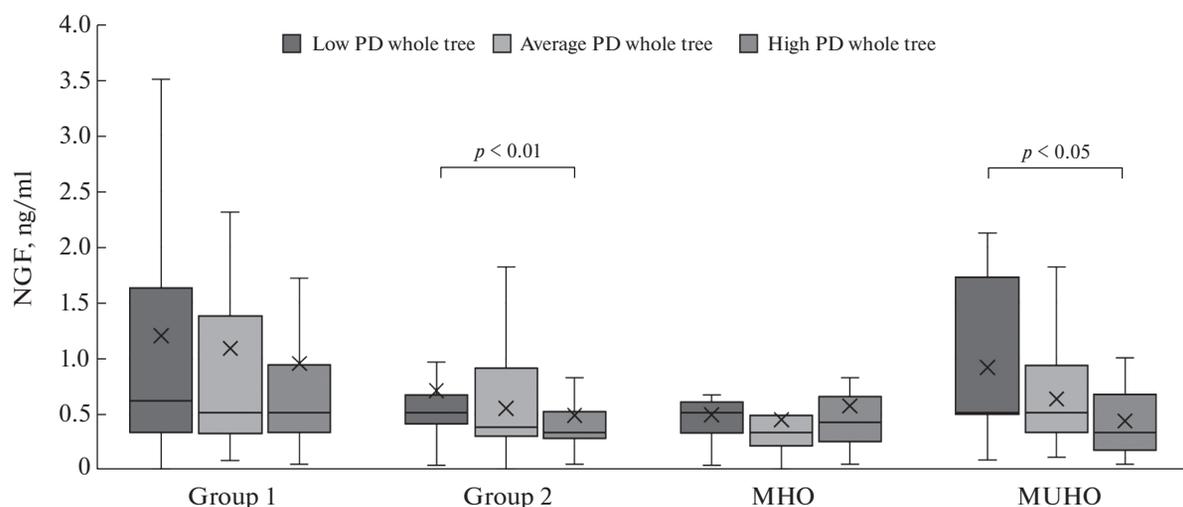


Рис. 3. Содержание NGF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости величины PD whole tree.

подгруппы по величине индекса филогенетического разнообразия (PD whole tree) показало, что у пациентов этих групп максимальное содержание NGF наблюдается у лиц с низкими показателями филогенетического разнообразия (рис. 3). Корреляционный анализ также показал, что сывороточная концентрация NGF обратно пропорциональна PD whole tree у пациентов Группы 2 ($\rho = -0.3$, $p < 0.01$) и МНЗО ($\rho = -0.353$, $p = 0.01$). Таким образом, отрицательная корреляция филогенетического разнообразия микробиома кишечника и концентрации NGF является характерной чертой метаболически нездорового ожирения. Возможно, увеличение филогенетического разнообразия у таких пациентов наблюдается за счет отдельных таксонов, оказывающих неблагоприятное воздействие на продукцию данного нейротрофина.

Учитывая выявленную негативную взаимосвязь между содержанием нейротрофинов и показателями альфа-разнообразия, отражающими влияние

отдельных и редких таксонов, у пациентов с МНЗО особый интерес представляет влияние конкретных таксономических единиц на содержание BDNF и NGF сыворотки. Были проанализированы таксоны, выявленные более чем у 15% пациентов каждой группы с глубиной до вида.

Экспрессия BDNF может регулироваться продуктами кишечной микробиоты. Несколько работ на грызунах продемонстрировали, что одна из SCFAs – бутират – способствует ингибированию гистон-деацетилазы и повышает экспрессию BDNF в астроцитах [34, 35]. Другим стимулом для синтеза BDNF является гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) [36]. ГАМК образуется не только в нервной системе, но и продуцируется рядом бактерий, например, представителями рода *Bacteroides* [37]. Кроме того, кишечная микробиота способна регулировать кишечную проницаемость, в том числе за счет деградации муцина [38].

Таблица 3. Таксоны, положительно коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF, и ферменты, характерные для данных таксонов

	Таксоны	Окраска по Граму	I		II		III					
			2.8.3.8	2.7.2.7	4.1.1.15	3.2.1.18	3.1.1.53	4.1.3.3	3.2.1.51	3.2.1.96	3.2.1.97	3.1.1.2
Группа 1	<i>Peptostreptococcaceae</i> ¹ rho = 0.408, p < 0.05, n = 24	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>S24-7 (Muribaculaceae)</i> ² rho = 0.317, p < 0.005, n = 86	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Группа 2	Не выявлено значимых таксонов (rho > 0.3)											
МЗО	<i>[Ruminococcus] torques</i> rho = 0.618, p < 0.05, n = 11	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Bacteroides spp.</i> ³ rho = 0.408, p < 0.01, n = 40	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Rikenellaceae</i> ⁴ rho = 0.407, p < 0.01, n = 39	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Oscillospira spp.</i> rho = 0.341, p < 0.05, n = 40	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>[Barnesiellaceae]</i> ⁵ rho = 0.325, p < 0.05, n = 39	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Bacteroides ovatus</i> rho = 0.311, p = 0.06, n = 38	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Anaerostipes spp.</i> rho = 0.307, p = 0.06, n = 38	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
МНЗО	<i>Bifidobacterium spp.</i> ⁶ rho = 0.437, p < 0.005, n = 45	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Collinsella spp.</i> ⁷ rho = 0.432, p < 0.05, n = 27	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>Coprococcus spp.</i> ⁸ rho = 0.317, p = 0.056, n = 37	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Примечание: нет заливки – нет данных, что фермент характерен для данного таксона, серая заливка – фермент характерен для других видов (родов) данного рода (семейства), черная заливка – фермент характерен для данного таксона; I – ферменты синтеза бутирата, II – фермент синтеза ГАМК, III – ферменты, участвующие в деградации муцина; ¹ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Peptostreptococcus*; ² неидентифицированные таксоны семейства; ³ неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *B. acidifaciens*, *B. barnesiae*, *B. caccae*, *B. coprophilus*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. plebeius* и *B. uniformis*; ⁴ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Alistipes*; ⁵ неидентифицированные таксоны семейства; ⁶ неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* и *B. pseudolongum*; ⁷ неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *C. aerofaciens* и *C. stercoris*; ⁸ неидентифицированные виды, не принадлежащие к виду *C. eutactus*.

Чтобы выявить, способны ли выявленные таксоны участвовать в синтезе бутирата, ГАМК или в деградации муцина, мы проанализировали наличие или отсутствие специфических ферментов у этих таксонов в соответствии с комплексной информационной системой по ферментам BRENDA [39]. Ключевым ферментом синтеза ГАМК является глутамат декарбоксилаза (4.1.1.15), а образование бутирата может происходить под действием бутираткиназы (2.7.2.7) и бутирил-КоА: ацетат КоА-трансферазы (2.8.3.8) [40, 41]. Деградация муцина представляет собой сложный и многоэтапный процесс, с вовлечением различных ферментов [42, 43]. Среди них мы анализировали наличие α -сиалидазы (3.2.1.18), O-ацетилэстеразы (3.1.1.53), N-ацетилнейраминаглиазы (4.1.3.3), α -L-фруктозидазы (3.2.1.51), β -N-ацетилглюкозаминидаза (3.2.1.96), α -N-ацетилгалактозаминидазы (3.2.1.97) и арилэстеразы (3.1.1.2).

Мы обнаружили значительное количество таксонов, положительно коррелировавших с сывороточным содержанием BDNF у исследуемых групп (табл. 3). Наибольшее число значимых таксонов было отмечено у пациентов с МЗО, что, по-видимому, связано с большим разнообразием кишечного микробиома, характерного для таких пациентов. А также это объясняет, почему максимальное со-

держание BDNF наблюдалось у пациентов с высокими значениями индекса Simpson (рис. 1). Интересным наблюдением стало, что разные представители одной и той же таксономической группы могут по-разному коррелировать с концентрацией BDNF. У пациентов с МЗО представители рода *Bacteroides* были позитивно ассоциированы с уровнем BDNF, тогда как в группе 1 *Bacteroides barnesiae*, напротив, демонстрировали негативную корреляцию. Подобное наблюдение подтверждает предположение Stilling и соавт. [19], которые высказали гипотезу о разнонаправленном влиянии отдельных таксонов на экспрессию BDNF. Также можно предполагать, что действие на макроорганизм того или иного таксона связано не только с метаболическими возможностями бактерии, но и с влиянием ее микроокружения на экспрессию тех или иных бактериальных белков.

В каждой исследуемой группе пациентов среди таксонов, положительно взаимосвязанных с содержанием BDNF, присутствовали микроорганизмы, способные к синтезу бутирата. У пациентов Группы 1 и пациентов с МЗО была также отмечена позитивная ассоциация содержания BDNF с ГАМК-продуцирующими бактериями. При этом у лиц с МНЗО доля бактерий-продуцентов ГАМК практически не коррелировала с содержанием BDNF.

Таблица 4. Таксоны, отрицательно коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF, и ферменты, характерные для данных таксонов

	Таксоны	Окраска по Граму	I		II		III					
			2.8.3.8	2.7.2.7	4.1.1.15	3.2.1.18	3.1.1.53	4.1.3.3	3.2.1.51	3.2.1.96	3.2.1.97	3.1.1.2
Группа 1	<i>Parvimonas spp.</i> rho = -0.600, p < 0.01, n = 18	+										
	<i>Succinivibrio spp.</i> rho = -0.408, p = 0.01, n = 38	-										
	<i>Lactococcus garvieae</i> rho = -0.403, p = 0.06, n = 23	+										
	<i>Gemellaceae</i> ¹ rho = -0.398, p < 0.005, n = 25	+										
	<i>Prevotella spp.</i> ² rho = -0.375, p = 0.065, n = 25	-										
	<i>Bacteroides barnesiae</i> rho = -0.371, p < 0.05, n = 36	-										
	<i>Bulleidia spp.</i> ³ rho = -0.365, p = 0.0565, n = 28	+										
Группа 2	<i>Coprobacillus spp.</i> rho = -0.337, p < 0.05, n = 36	+										
МЗО	<i>Enterococcaceae</i> ⁵ rho = -0.857, p < 0.05, n = 7	+										
	<i>Blautia obeum</i> rho = -0.833, p = 0.01, n = 8	+										
	<i>Mitsuokella spp.</i> ⁶ rho = -0.734, p < 0.01, n = 12	-										
	<i>Leuconostocaceae</i> ⁷ rho = -0.621, p < 0.05, n = 13	+										
МНЗО	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> rho = -0.321, p < 0.05, n = 53	+										

Примечание: нет заливки – нет данных, что фермент характерен для данного таксона, серая заливка – фермент характерен для других видов (родов) данного рода (семейства), черная заливка – фермент характерен для данного таксона; I – ферменты синтеза бутирата, II – фермент синтеза ГАМК, III – ферменты, участвующие в деградации муцина; ¹ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Gemella*; ² неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к видам *P. copri* и *P. stercorea*; ³ неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *B. p-1630-c5*; ⁴ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Enterococcus* и *Vagococcus*; ⁵ неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *M. multacida*; ⁶ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Fructobacillus*, *Leuconostoc* и *Weissella*.

Также многие из выделенных таксонов, продуцирующих бутират и/или ГАМК, были способны к деградации муцина, что, по-видимому, усиливает влияние продуктов бактериального метаболизма на макроорганизм.

Кроме того, ряд таксонов был негативно ассоциирован с концентрацией BDNF (табл. 4). Максимальное количество таксономических единиц с отрицательными корреляциями “BDNF – таксон” наблюдалось у пациентов с МЗО, что также очевидно связано с большим микробным разнообразием. Важно отметить, что большая часть этих таксонов принадлежала к грамположительным бактериям, важным компонентом клеточной стенки которых являются тейхоевые кислоты. Было показано, что действие липотейхоевой кислоты стимулирует экспрессию рецепторов к белку системы комплемента C5a – C5aR и C5L2 в фибробластах [44]. В свою очередь стимуляция C5L2 приводит к торможению секреции BDNF фибробластами, что позволяет рассматривать липотейхоевую кислоту как негативный регулятор секреции BDNF [44]. Подобный эффект тейхоевых кислот может объяснить негативное влияние грамположительных бактерий на содержание BDNF сыворотки. Возможно, именно различия в спектре антибиотической активности в отношении грамположительной и грамотрицательной флоры позволяют объяснить

диаметрально противоположные результаты изменения концентрации BDNF при использовании противомикробных средств [13, 16]. Однако остается неясным, с чем связана негативная взаимосвязь ряда грамотрицательных таксонов на уровень сывороточного BDNF. Появление подобной связи подразумевает наличие дополнительных взаимодействий “кишечная микробиота – BDNF”.

Несмотря на более чем полувековую историю изучения NGF и открытия его многочисленных эффектов, нам относительно немного известно о регуляции синтеза этого нейротрофина. Усиление экспрессии NGF наблюдается в ответ на глутамат, ацетилхолин, под действием глюкокортикоидов и интерлейкина 1 [45, 46]. Так как в литературе мы не обнаружили описания влияния микробных метаболитов на синтез и секрецию NGF, мы проанализировали представленность муцин-деградирующих ферментов у выделенных таксонов (табл. 5, 6). Было обнаружено, что подобные ферменты характерны для многих из таксонов, как положительно, так и отрицательно коррелировавших с содержанием NGF. Позитивная взаимосвязь содержания представителей микробиома кишечника с концентрацией NGF объяснима тем, что увеличение кишечной проницаемости, опосредованное этими таксонами, способствует лучшему проникновению ряда патоген-ассоциированных молекулярных

Таблица 5. Таксоны, положительно коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF, и ферменты, характерные для данных таксонов

	Таксоны	Окраска по Граму	3.2.1.18	3.1.1.53	4.1.3.3	3.2.1.51	3.2.1.96	3.2.1.97	3.1.1.2
Группа 1	Не выявлено значимых таксонов ($\rho > 0.3$)								
Группа 2	<i>Fusobacterium spp.</i> $\rho = 0.469$, $p < 0.05$, $n = 20$	–	■	■	■	■	■		
МЗО	<i>Peptococcus spp.</i> $\rho = 0.821$, $p < 0.005$, $n = 10$	+	■						
	<i>Alcaligenaceae</i> ³ $\rho = 0.806$, $p < 0.005$, $n = 11$	–	■			■	■	■	■
	<i>Lactobacillus ruminis</i> $\rho = 0.564$, $p = 0.005$, $n = 23$	+	■	■					■
	<i>Ruminococcus spp.</i> ⁴ $\rho = 0.468$, $p < 0.05$, $n = 24$	+	■			■	■	■	■
	<i>Odoribacter spp.</i> $\rho = 0.338$, $p = 0.05$, $n = 34$	–				■			
МНЗО	<i>Fusobacterium spp.</i> $\rho = 0.537$, $p = 0.06$, $n = 13$	–	■	■	■	■	■		
	<i>Slackia spp.</i> $\rho = 0.360$, $p < 0.05$, $n = 36$	+							

Примечание: нет заливки – нет данных, что фермент характерен для данного таксона, серая заливка – фермент характерен для других видов (родов) данного рода (семейства), черная заливка – фермент характерен для данного таксона; ¹ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Achromobacter* и *Sutterella*; ² неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к видам *R. bromii*, *R. callidus* и *R. flavefaciens*.

Таблица 6. Таксоны, отрицательно коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF, и ферменты, характерные для данных таксонов

	Таксоны	Окраска по Граму	3.2.1.18	3.1.1.53	4.1.3.3	3.2.1.51	3.2.1.96	3.2.1.97	3.1.1.2
Группа 1	<i>Mitsuokella spp.</i> ¹ $\rho = -0.606$, $p < 0.05$, $n = 11$	–			■				
Группа 2	Не выявлено значимых таксонов ($\rho > 0.3$)								
МЗО	<i>Mitsuokella spp.</i> ¹ $\rho = -0.632$, $p = 0.05$, $n = 10$	–			■				
	<i>Lactococcus spp.</i> ² $\rho = -0.524$, $p < 0.05$, $n = 19$	+	■				■		
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> $\rho = -0.456$, $p = 0.01$, $n = 30$	–	■		■	■	■	■	■
	<i>Erysipelotrichaceae</i> ³ $\rho = -0.403$, $p < 0.05$, $n = 32$	+				■	■		
	<i>Megamonas spp.</i> $\rho = -0.398$, $p < 0.05$, $n = 29$	–			■	■	■		
	<i>Clostridiaceae</i> ⁴ $\rho = -0.396$, $p < 0.05$, $n = 35$	–	■	■	■	■	■	■	■
МНЗО	<i>Streptococcus anginosus</i> $\rho = -0.730$, $p < 0.005$, $n = 16$	+		■	■	■	■	■	■
	<i>Gemellaceae</i> ⁵ $\rho = -0.581$, $p < 0.05$, $n = 13$	+	■						
	<i>Alcaligenaceae</i> ⁶ $\rho = -0.528$, $p = 0.06$, $n = 13$	–	■			■	■	■	■
	<i>ML615J-28</i> ⁷ $\rho = -0.404$, $p < 0.05$, $n = 37$								
	<i>Clostridiales</i> ⁸ $\rho = -0.347$, $p < 0.05$, $n = 51$		■	■	■	■	■	■	■

Примечание: нет заливки – нет данных, что фермент характерен для данного таксона, серая заливка – фермент характерен для других видов (родов) данного рода (семейства), черная заливка – фермент характерен для данного таксона; ¹ неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *M. multacida*; ² неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *L. garvieae*; ³ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам [*Eubacterium*], *Asteroleplasma*, *Bulleidia*, *Catenibacterium*, *cc_115*, *Clostridium*, *Coprobacillus*, *Holdemania*, *p-75-a5* и *RFN20*; ⁴ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *O2d06*, *Caloramator*, *Clostridium*, *Sarcina* и *SMB53*; ⁵ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Gemella*; ⁶ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Achromobacter* и *Sutterella*; ⁷ неидентифицированные таксоны порядка; ⁸ неидентифицированные таксоны порядка, не принадлежащие к семействам [*Mogibacteriaceae*], [*Tissierellaceae*], *Christensenellaceae*, *Clostridiaceae*, *Dehalobacteriaceae*, *EtOH8*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* и *Veillonellaceae*.

паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), в частности LPS. В свою очередь, PAMPs взаимодействуя с образ-распознающими рецепторами, такими как TLRs, потенцируют развитие воспаления и секрецию провоспалительных цитокинов, в том числе интерлейкина 1 β (IL1 β) [47].

Было показано, что IL1 β стимулирует секрецию NGF, что может объяснять положительную взаимосвязь между муцин-деградирующими бактериями и содержанием этого нейротрофина [48]. Однако выявление таксонов, отрицательно коррелирующих с содержанием NGF, подразумевает наличие

дополнительных взаимодействий “кишечный микробиом – NGF”.

Интересно, что у пациентов Группы 1 практически отсутствовали представители, содержание которых в микробиоме было значимо связано с содержанием NGF. По-видимому, это свидетельствует о том, что в условиях нормальной кишечной проницаемости, характерной для здоровых доноров, деятельность кишечного микробиома не является значительным фактором для формирования пула сывороточного NGF.

В общей группе пациентов с ожирением (Группа 2) состав кишечного микробиома также практически не был ассоциирован с уровнем NGF. Однако после разделения по метаболическому типу ожирения обнаружился целый спектр таксонов, коррелировавших с концентрацией этого нейротрофина. Причем эти таксоны были уникальны для каждой из подгрупп (МЗО и МНЗО). Появление более тесной связи “кишечный микробиом – NGF” при ожирении (любого метаболического типа) может быть следствием увеличения кишечной проницаемости, характерной для лиц с избыточной массой тела [49]. Возможно, именно подобная связь является одной из причин, почему сывороточная концентрация NGF значительно ниже при ожирении (табл. 2).

У пациентов с МЗО было выявлено значительное количество таксонов, как положительно, так и отрицательно коррелировавших с уровнем NGF. У пациентов с МНЗО, напротив, большая часть корреляций носила отрицательный характер и только *Fusobacterium spp.* и *Slackia spp.* позитивно ассоциировались с содержанием NGF. Учитывая преобладание негативного влияния на уровень NGF у пациентов с МНЗО, становится понятно, почему максимальное содержание данного нейротрофина наблюдалось у пациентов с низкими показателями микробного разнообразия (рис. 3). А поскольку для пациентов с МНЗО характерно более значительное увеличение кишечной проницаемости по сравнению с МЗО, появление тесной связи “NGF – разнообразие кишечного микробиома” не является удивительным [50].

ВЫВОДЫ

Содержание BDNF сыворотки тесно взаимосвязано с микробным сообществом кишечника вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения. Большая часть выделенных таксонов, положительно коррелировавших с содержанием этого нейротрофина, были представлены бутират и/или ГАМК-продуцирующими микроорганизмами, способными к деградации муцина. Также был выделен спектр таксонов, негативно взаимосвязанных с уровнем BDNF, большая часть которых принадлежала к грамположительной флоре.

У здоровых доноров практически отсутствует взаимосвязь “кишечный микробиом – NGF”, тогда как у лиц с ожирением характерно появление подобной ассоциации. Данная взаимосвязь отмечена как для лиц с метаболически здоровым типом ожирения, так и для пациентов с метаболически нездоровым типом, что, по-видимому, является следствием усиления кишечной проницаемости.

Спектр таксонов, коррелирующих с содержанием нейротрофинов, зависит от наличия или отсутствия ожирения, а также его метаболического типа. Можно предполагать, что влияние микробиома кишечника на уровни BDNF и NGF определяется не столько отдельными таксонами и/или экспрессируемыми ими ферментами, сколько взаимодействием внутри микробного сообщества и проницаемостью кишечного барьера.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках договора № 0373100122119000041 по проекту “Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов систем quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринную и метаболическую функцию жировой ткани”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение научно-исследовательской работы одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 186 от 26.06.2019) и ЛНЭК ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

И.М.К. – обработка данных, написание манускрипта; А.М.Г. – идея работы, планирование эксперимента, редактирование манускрипта; С.А.Р. – идея работы, планирование эксперимента, редактирование манускрипта; Л.А.Г. – сбор данных, обработка данных;

Н.И.В. – планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных; Т.В.Г. – планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных; А.В.Л. – сбор данных, обработка данных; В.В.М. – идея работы, редактирование манускрипта; С.М.Ю – идея работы, редактирование манускрипта; А.В.Ш. – идея работы, планирование эксперимента, написание манускрипта, редактирование манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee CJ, Sears CL, Maruthur N (2020) Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1461: 37–52. <https://doi.org/10.1111/nyas.14107>
2. Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R (2019) Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 3–15. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1543023>
3. Котрова АД, Шишкин АН, Воропаева ЛС, Лавренова НС, Слепых ЛА, Лукашенко МВ, Ермоленко ЕИ (2021) Гендерная оценка микробиома кишечника у больных с ожирением. *Клин гастроэнтерол* 194: 91–99. [Kotrova AD, Shishkin AN, Voropaeva LS, Lavrenova NS, Blind LA, Lukashenko MV, Ermolenko EI (2021) Gender assessment of the intestinal microbiome in obese patients. *Clinical Gastroenterology* 194: 91–99. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-194-10-91-99>
4. Гапонов АМ, Волкова НИ, Ганенко ЛА, Набока ЮЛ, Маркелова МИ, Синягина МН, Харченко АМ, Хуснутдинова ДР, Румянцев СА, Тутельян АВ, Макаров ВВ, Юдин СМ, Шестопалов АВ (2021) Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах (оригинальная статья). *Журн микробиол, эпидемиол и иммунобиол* 98: 144–155. [Gaponov AM, Volkova NI, Ganenko LA, Naboka YUL, Markelova MI, Sinyagina MN, Kharchenko AM, Khusnutdinova DR, Rumyantsev SA, Tutelyan AV, Makarov VB, Yudin SM, Shestopalov AV (2021) Features of the colon microbiome in obese patients with its various phenotypes (original article). *J Microbiol, Epidemiol Immunobiol* 98: 144–155. (In Russ)]. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-66>
5. Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL (2015) The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 26:493–501. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.002>
6. Hu J, Lin S, Zheng B, Cheung PCK (2018) Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58: 1243–1249.
7. Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G, Nauta A, Scott K, Stahl B, van Harsselaar J, van Tol R, Vaughan EE, Verbeke K (2020) Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes* 11: 411–455. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
8. Heiss CN, Olofsson LE (2019) The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *J Neuroendocrinol* 31: 1–11. <https://doi.org/10.1111/jne.12684>
9. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK (2016) The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 167: 915–932. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>
10. Grasset E, Puel A, Charpentier J, Collet X, Christensen JE, Tercé F, Burcelin R (2017) A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. *Cell Metab* 25: 1075–1090.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.013>
11. Guillemot-Legris O, Muccioli GG (2017) Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci* 40:237–253. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.02.005>
12. Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, Federici M, Menini S (2019) Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism* 92: 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>
13. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, Macri J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141: 599–609, 609.e1–3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>
14. Schéle E, Grahnemo L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O (2013) The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. *Endocrinology* 154: 3643–3651. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2151>
15. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558: 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
16. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, Cotter PD, Dinan TG, Cryan JF (2015) Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun* 48: 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>
17. Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, Zinser E, Bordag N, Magnes C, Fröhlich E, Kashofer K, Gorkiewicz G, Holzer P (2016) Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun* 56: 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.020>
18. Cui M, Xiao H, Li Y, Dong J, Luo D, Li H, Feng G, Wang H, Fan S (2017) Total abdominal irradiation exposure impairs cognitive function involving miR-34a-5p/BDNF axis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1863: 2333–2341. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.021>
19. Stilling RM, Ryan FJ, Hoban AE, Shanahan F, Clarke G, Claesson MJ, Dinan TG, Cryan JF (2015) Microbes & neurodevelopment – Absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala. *Brain Behav Immun* 50: 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.009>
20. Savignac HM, Corona G, Mills H, Chen L, Spencer JPE, Tzortzis G, Burnet PWJ (2013) Prebiotic feeding elevates

- central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine. *Neurochem Int* 63: 756–764.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.006>
21. *O'Sullivan E, Barrett E, Grenham S, Fitzgerald P, Stanton C, Ross RP, Quigley EMM, Cryan JF, Dinan TG* (2011) BDNF expression in the hippocampus of maternally separated rats: Does *Bifidobacterium breve* 6330 alter BDNF levels? *Benef Microbes* 2: 199–207.
<https://doi.org/10.3920/BM2011.0015>
 22. *Sun J, Wang F, Hu X, Yang C, Xu H, Yao Y, Liu J* (2018) *Clostridium butyricum* Attenuates Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depressive-Like Behavior in Mice via the Gut-Brain Axis. *J Agric Food Chem* 66: 8415–8421.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02462>
 23. *Borrelli L, Aceto S, Agnisola C, De Paolo S, Dipineto L, Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF, Menna LF, Fioretti A* (2016) Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. *Sci Rep* 6: 1–9.
<https://doi.org/10.1038/srep30046>
 24. *Cuomo M, Borrelli L, Monica R Della, Coretti L, De Riso G, Di Durazzo LDL, Fioretti A, Lembo F, Dinan TG, Cryan JF, Cocozza S, Chiariotti L* (2021) DNA methylation profiles of *Tph1a* and BDNF in gut and brain of *L. Rhamnosus*-treated Zebrafish. *Biomolecules* 11: 1–13.
<https://doi.org/10.3390/biom11020142>
 25. *Hwang YH, Park S, Paik JW, Chae SW, Kim DH, Jeong DG, Ha E, Kim M, Hong G, Park SH, Jung SJ, Lee SM, Na KH, Kim J, Chung YC* (2019) Efficacy and safety of *Lactobacillus plantarum* C29-fermented soybean (DW2009) in individuals with mild cognitive impairment: A 12-week, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients* 11.
<https://doi.org/10.3390/nu11020305>
 26. *Li C, Cai YY, Yan ZX* (2018) Brain-derived neurotrophic factor preserves intestinal mucosal barrier function and alters gut microbiota in mice. *Kaohsiung J Med Sci* 34: 134–141.
<https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.11.002>
 27. *Steinkamp M, Schulte N, Spaniol U, Pflüger C, Hartmann C, Kirsch J, von Boyen GB* (2012) Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 18: BR117–122.
<https://doi.org/10.12659/msm.882612>
 28. *Ma D, Forsythe P, Bienenstock J* (2004) Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 72: 5308–5314.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5308-5314.2004>
 29. *Ju IG, Hong SM, Yun S-W, Huh E, Kim D-H, Kim SY, Oh MS* (2021) CCL01, a novel formulation composed of *Cuscuta* seeds and *Lactobacillus paracasei* NK112, enhances memory function via nerve growth factor-mediated neurogenesis. *Food Funct* 12: 10690–10699.
<https://doi.org/10.1039/d1fo01403j>
 30. *Rahimlou M, Hosseini SA, Majdinasab N, Haghhighizadeh MH, Husain D* (2022) Effects of long-term administration of Multi-Strain Probiotic on circulating levels of BDNF, NGF, IL-6 and mental health in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr Neurosci* 25: 411–422.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1758887>
 31. *Aygun H, Akin AT, Kızılaslan N, Sumbul O, Karabulut D* (2022) Electrophysiological, histopathological and biochemical evaluation of the protective effect of probiotic supplementation against PTZ-induced seizures in rats. *Eur J Neurol*.
<https://doi.org/10.1111/ene.15359>
 32. *Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-rad J, Aiello V, Romano B, Lorenzo A De, Izzo AA* (2019) Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. *Nutrients* 11: 2690.
<https://doi.org/10.3390/nu11112690>
 33. Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (2001) Executive summary of the third report (NCEP) –adult treatment panel III. *J Am Med Assoc* 285: 2486–2497.
 34. *Wu X, Chen PS, Dallas S, Wilson B, Block ML, Wang CC, Kinyamu H, Lu N, Gao X, Leng Y, Chuang DM, Zhang W, Lu RB, Hong JS* (2008) Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 1123–1134.
<https://doi.org/10.1017/S1461145708009024>
 35. *Spichak S, Donoso F, Moloney GM, Gunnigle E, Brown JM, Codagnone M, Dinan TG, Cryan JF* (2021) Microbially-derived short-chain fatty acids impact astrocyte gene expression in a sex-specific manner. *Brain, Behav Immun – Heal* 16: 100318.
<https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100318>
 36. *Fukuchi M, Kirikoshi Y, Mori A, Eda R, Ihara D, Takasaki I, Tabuchi A, Suda M* (2014) Excitatory GABA induces BDNF transcription via CRTCL1 and phosphorylated CREB-related pathways in immature cortical cells. *J Neurochem* 131: 134–146.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12801>
 37. *Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, McDonald D, Dietrich D, Ramadhar TR, Lekbua A, Mroue N, Liston C, Stewart EJ, Dubin MJ, Zengler K, Knight R, Gilbert JA, Clardy J, Lewis K* (2019) GABA Modulating Bacteria of the Human Gut Microbiota. *Nat Microbiol* 4: 396–403.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0307-3>.GABA
 38. *Allam-Ndoul B, Castonguay-Paradis S, Veilleux A* (2020) Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability. *Int J Mol Sci* 21: 1–14.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176402>
 39. Enzyme Database – BRENDA. <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>. Accessed 26 Dec 2021
 40. *Yogeswara IBA, Maneerat S, Haltrich D* (2020) Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria—a key enzyme in Gaba synthesis. *Microorganisms* 8: 1–24.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8121923>
 41. *Louis P, Flint HJ* (2017) Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Env Microbiol* 19: 29–41.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920>
 42. *Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC* (1992) Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun*

- 60:3971–3978.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.10.3971-3978.1992>
43. Wright DP, Rosendale DI, Robertson AM (2000) Prevootella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiol Lett* 190: 73–79.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00324-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00324-4)
44. Chmielewsky F, About I, Chung SH (2017) C5L2 Receptor Represses Brain-Derived Neurotrophic Factor Secretion in Lipoteichoic Acid-Stimulated Pulp Fibroblasts. *J Dent Res* 96: 92–99.
<https://doi.org/10.1177/0022034516673832>
45. West AE, Pruunsild P, Timmusk T (2014) Neurotrophic Factors: Transcription and Translation *Handb Exp Pharmacol* 220:67–100.
46. Murata K, Sawaji Y, Alimasi W, Suzuki H, Endo K, Tanaka H, Yorifuji M, Kosaka T, Shishido T, Yamamoto K (2016) PGE1 Attenuates IL-1 β -induced NGF Expression in Human Intervertebral Disc Cells. *Spine (Phila Pa 1976)* 41: E710–E716.
<https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000001379>
47. Weigt SS, Palchevskiy V, Belperio JA (2017) Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. *J Clin Invest* 127: 2022–2029.
<https://doi.org/10.1172/JCI93537>
48. Nagura N, Uchida K, Kenmoku T, Inoue G, Nakawaki M, Miyagi M, Takaso M (2019) IL-1 β mediates NGF and COX-2 expression through transforming growth factor-activating kinase 1 in subacromial bursa cells derived from rotator cuff tear patients. *J Orthop Sci* 24: 925–929.
<https://doi.org/10.1016/j.jos.2019.02.006>
49. Cox AJ, West NP, Cripps AW (2015) Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3: 207–215.
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70134-2)
50. Rial SA, Karelis AD, Bergeron KF, Mounier C (2016) Gut microbiota and metabolic health: The potential beneficial effects of a medium chain triglyceride diet in obese individuals. *Nutrients* 8: 1–19.
<https://doi.org/10.3390/nu8050281>

Relationship between Neutrophins and Gut Microbiome in Various Metabolic Types of Obesity

I. M. Kolesnikova^{a,#}, A. M. Gaponov^{b,c}, S. A. Roumiantsev^{a,b},
 L. A. Ganenko^d, N. I. Volkova^c, T. V. Grigoryeva^e, A. V. Laikov^e,
 V. V. Makarov^f, S. M. Yudin^f, and A. V. Shestopalov^{a,b,g}

^a Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^b Center for Digital and Translational Biomedicine, Center for Molecular Health, Moscow, Russia

^c Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

^d V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia

^e Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

^f Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Moscow, Russia

^g Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

[#]e-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Obesity is associated with a gut microbiome imbalance and the risk of neurological complications, while the risk of complications is determined by the metabolic type of obesity. The study aimed to explore the effect of intestinal microbiome taxa on the content of neurotrophins BDNF and NGF in different types of obesity. The study included 130 healthy non-obese donors and 104 obese patients. Depending on the metabolic type of obesity, patients were divided into subgroups with metabolically healthy obesity (MHO, $n = 40$) and metabolically unhealthy obesity (MUHO, $n = 55$). Serum neurotrophin concentrations were measured and the gut microbiome taxonomic composition was determined by the sequencing of the variable region of the 16S rRNA gene. The taxa positively correlated with concentration of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were mainly represented by butyrate- and/or GABA-producing microorganisms able to degrade mucin; in healthy donors, the S24-7 family was the most widespread taxon among these microorganisms. In MHO, the taxa positively correlated with BDNF included *Bacteroides* spp., *Rikenellaceae*, *Oscillospira* spp., [*Barnesiellaceae*], *B. ovatus* and *Anaerostipes* spp., while in MUHO, there were *Bifidobacterium* spp. and *Coprococcus* spp. The taxa negatively correlated with BDNF were also revealed, most of which in MUHO patients belonged to the Gram-positive bacteria. Nerve growth factor (NGF) concentration was associated with the gut microbiome in MUHO, but not in MHO donors. A positive relationship with NGF was found for *Odoribacter* spp. in MHO patients and *Slackia* spp. in MUHO patients. *H. parainfluenzae*, *Erysipelotrichaceae*, *Megamonas* spp. and *Clostridiaceae* showed a negative correlation with NGF levels in MHO. In MUHO, a similar effect was shown for *ML615J-287* and *Clostridiales*. Thus, obesity, regardless of the metabolic type, is associated with the appearance of the gut microbiome–NGF relationship, which is not typical for healthy patients and may be a consequence of increased intestinal permeability. The spectrum of taxa that correlated with BDNF levels was unique for each patient group, suggesting a significant effect of interspecies microbial interaction on the neurotrophin levels.

Keywords: gut microbiome, gut microbiota, neurotrophins, nerve growth factor, NGF, brain-derived neurotrophic factor, BDNF, obesity, metabolically healthy obesity, metabolically unhealthy obesity

фМРТ ИССЛЕДОВАНИЯ ОППОНЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ОБЛАСТЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ОБЕЗЬЯН *MACACA MULATTA*

© 2022 г. А. К. Хараузов^{1,*}, Л. Е. Иванова¹, П. П. Васильев¹, Д. Н. Подвигина¹

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

*e-mail: harauzov@infran.ru

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 06.04.2022 г.

Принята к публикации 23.05.2022 г.

В нейрофизиологических исследованиях метод функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) наиболее часто используется при картировании функций мозга путем локализации областей с повышенной активностью во время выполнения различных тестов. При этом традиционно уделяется меньше внимания сопутствующему снижению метаболизма в других областях мозга, несмотря на сопоставимую интенсивность этих процессов. В настоящее время причина снижения активности, его динамика и зависимость локализации от условий эксперимента остаются под вопросом. Целью данной работы являлась локализация у обезьян областей мозга, вовлеченных в оппонентные отношения при стимуляции мелькающим светом.

Исследование было проведено на трех бодрствующих обезьянах *Macaca mulatta*, у которых сравнивали карты распределения активности, полученные во время аperiодической световой стимуляции и при нахождении в полной темноте. Вспышки света вызывали увеличение потребления кислорода в первичной зрительной коре и одновременное снижение этого показателя в поле 7 теменной коры и в зоне V5 срединной височной области. Области мозга, снизившие свою активность, обычно не реагируют на стимуляцию вспышками и не задействованы в процессе обработки сигнала в наших условиях. Полученные данные трактуются исходя из гипотезы об автоматическом поддержании баланса между активированными и деактивированными областями, целью которого является экономия энергетических ресурсов мозга. Предположительно снижение активности относительно фонового уровня в незадействованных областях помогло бы компенсировать увеличение потребления энергии в других областях мозга, ответственных за обработку сигнала.

Ключевые слова: макака-резус, вспышки, функциональная МРТ, негативный BOLD-ответ

DOI: 10.31857/S0044452922040064

Томографические методы являются наиболее распространенным способом неинвазивной нейровизуализации для изучения нейрофизиологических основ когнитивных функций человека и животных. Первоначально изменения метаболизма мозга исследовали с помощью ПЭТ, а теперь в основном методом фМРТ. С помощью различных когнитивных тестов, выявляя области мозга, в которых повышалось потребление глюкозы или кислорода во время выполнения задачи, исследователи описали множество так называемых крупномасштабных нейронных сетей в головном мозге человека, отвечающих за принятие решений, переключение внимания, функции памяти, речи, кодирования сенсорной информации и многие другие. Однако, наряду с повышением активности в областях мозга, участвующих в выполнении задачи, нередко наблюдали снижение активности в некоторых других областях мозга. Наиболее яркий пример таких оппонентных взаи-

модействий представляет так называемая дефолтная система мозга (Default Mode Network, DMN), активность которой максимальна, когда человек не выполняет никаких задач, и снижается по мере увеличения когнитивной нагрузки [1].

Обычно снижению активности уделяют меньше внимания, концентрируясь, в основном, на локализации областей мозга, увеличивающих свою активность в процессе выполнения тех или иных задач. Возможно, именно поэтому данные о распределении деактивированных областей в мозге человека и животных относительно редки (за исключением исследований дефолтной системы). Зависимость их локализации от экспериментальных условий отличается многообразием и в настоящее время не поддается систематизации. Так, согласно данным, полученным на человеке, активация зрительных областей мозга в ответ на стимуляцию шахматным паттерном сопровождается снижением активности не только в дефолтной

системе, но и в областях первичной слуховой коры [2]. Звуковая стимуляция, наряду с активацией слуховой коры, приводила к снижению активности в экстрастриарной области зрительной коры [3]. Однако при стимуляции всего поля зрения человека мелькающим светом активация первичной зрительной коры сопровождалась снижением активности в экстрастриарных областях мозга и в затылочной части фузиформной извилины [4, 5]. А предъявление зрительных паттернов раздельно в левое или правое поле зрения человека приводило преимущественно к увеличению активности в зрительной коре контралатерального полушария и одновременно к снижению BOLD-сигнала в ипсилатеральном полушарии [6, 7].

В наших ранних фМРТ исследованиях на человеке [8], во время выполнения испытуемыми зрительных когнитивных тестов, мы наблюдали снижение активности в дефолтной системе и в первичной слуховой коре. Причем усложнение задачи приводило к пропорциональному увеличению общего объема активированных и деактивированных областей мозга, безотносительно их локализации. Было выдвинуто предположение, что получаемые результаты отражают общий принцип работы мозга, направленный на поддержание баланса нейронной активности с целью экономии его энергетических ресурсов, что подчеркивает важность процессов деактивации для функционирования мозга как единого целого.

Таким образом, исходя из имеющихся литературных данных, следует, что во время сенсорной стимуляции или целенаправленной деятельности снижение активности наблюдается в областях мозга, менее задействованных в выполнении задачи. Однако снижение активности происходит выборочно и далеко не во всех незадействованных функциональных системах, по неизвестным пока правилам. Поэтому, для понимания общих принципов функционирования мозга, необходимо продолжать накопление данных о распределении негативного BOLD ответа в зависимости от условий стимуляции, как у человека, так и у животных.

Однако исходя из того, что метод фМРТ лишь косвенно отражает изменение нейронной активности за счет изменения уровня потребления кислорода тканями мозга, снижение BOLD-сигнала (основного показателя фМРТ, отражающего уровень оксигенации крови) может быть объяснено как снижением нейронной активности [9], так и снижением кровотока [10]. Поэтому взаимосвязь между изменениями BOLD-сигнала и лежащими в их основе метаболическими процессами и нейронной активностью все еще обсуждается [6]. Подтвердить нейронную природу снижения BOLD-сигнала помогла бы непосредственная регистрация электрической активности в областях мозга, демонстрирующих оппонентные взаимодействия.

Такую возможность дают исследования на обезьянах, как наиболее близких к человеку подопытных животных по морфофункциональным особенностям мозга, у которых были описаны оппонентные взаимодействия, подобные тем, что были обнаружены у человека [11, 12]. Однако работы, сочетающие томографические методы с инвазивной электрофизиологией, еще крайне малочисленны.

Даная работа – первый этап исследования, направленного на изучение нейрофизиологических принципов оппонентных взаимодействий в мозге человека и животных. Целью экспериментов являлась локализация у обезьян областей мозга, вовлеченных в оппонентные отношения. Большинство имеющейся литературы, посвященной данному вопросу, описывает оппонентные взаимодействия в мозге обезьян во время выполнения ими различных когнитивных тестов, предполагающих активное привлечение внимания к задаче. При сравнении карт распределения активности во время выполнения задачи с периодами покоя (бездействия) в таких тестах, в основном, фиксировали снижение потребления кислорода в областях, аналогичных дефолтной системе человека [12]. Однако какие области мозга у обезьян снижают свою активность при пассивном наблюдении самых простых зрительных стимулов – вспышек света – без привлечения внимания и без всякого задания, до сих пор неизвестно. Мы постарались восполнить этот пробел и изучили влияние аperiodической стимуляции мелькающим светом на перераспределение уровня потребления кислорода тканями мозга у обезьян.

Проведение фМРТ экспериментов на животных сопряжено с рядом сложностей. Основная проблема – необходимость исключить даже минимальные движения головой во время эксперимента, иначе сигнал будет искажен. Самый простой способ обездвиживания – это наркоз, но при этом мозг работает в другом режиме, и результаты зависят от степени наркотизации, так как наркоз, либо патологическое нарушение сознания, приводит к изменению паттерна функциональных связей и у человека [13], и у обезьяны [14]. Самый распространенный способ фиксации бодрствующего животного на сегодняшний день – закрепление на черепе животного специальных удерживающих устройств. Однако этот способ требует хирургического вмешательства и травматичен для животного. Другой способ – создание шлема, препятствующего движениям головы. Так, Srihasam и соавт. [15] сконструировали шлем, который плотно прилегал к голове животного за счет вакуума, создаваемого промышленным насосом. Slater и соавт. [16] создали маску на основе индивидуальных особенностей формы черепа обезьян, но она была изготовлена из жесткого пластика, что почти наверняка причиняло неудобство подопытным животным. Мы пошли по пути создания индивидуальных масок на голову

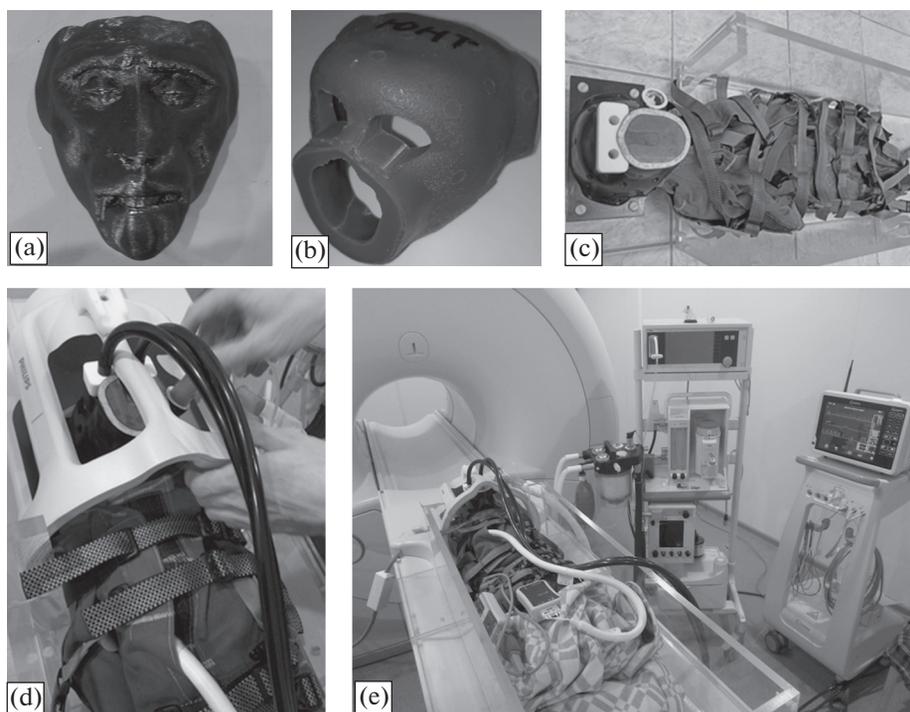


Рис. 1. Этапы подготовки к фМРТ эксперименту на бодрствующих обезьянах. (а) – распечатанная на 3D принтере модель головы обезьяны. (б) – отлитая на основе модели лицевая часть внутренней маски из мягкого силикона. (с) – лицевая часть универсальной наружной маски с отверстиями для световодов, фиксирующей тело костюм и аммагнитный контейнер с ремнями. (д) – крепление световодов перед глазами животного внутри МРТ катушки. (е) – зафиксированное животное перед проведением фМРТ эксперимента.

обезьян из силиконов различной твердости. Маски, созданные на основе данных компьютерной томографии (КТ) головы, надежно и безболезненно фиксировали животное на время эксперимента. Методика фиксации и подготовка животных к проведению фМРТ экспериментов будут подробно описаны в данной статье.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на трех самцах макак-резусов (ЦКП Биокolleкция ИФ РАН), массой 8–9 кг. Двое самцов (Юнт и Лев) на момент исследования были в возрасте восьми лет, и один самец по имени Эдуард был в возрасте 15 лет. Все животные были рождены и выращены в неволе и имели опыт участия в поведенческих экспериментах. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 10/02 от 10 февраля 2022 г.).

Для фиксации головы животных нами была разработана специальная маска, состоящая из двух частей (внешней и внутренней), которую изготавливали из силиконов различной плотности. Как

внутренняя, так и внешняя части маски состояли из лицевой и затылочной части. Внутреннюю маску создавали индивидуально для каждого животного из мягкого силикона таким образом, чтобы она целиком повторяла особенности формы его головы. Для этого, на основе данных КТ, формировали трехмерную виртуальную модель головы каждой обезьяны. После проведения необходимых программных манипуляций с моделью (повернуть голову, закрыть рот, удалить посторонние предметы и т.п.) ее распечатывали на 3D принтере (рис. 1а). На основе распечатанной модели из мягкого силикона отливали внутреннюю маску с отверстиями для глаз, носа и рта (рис. 1б). Таким образом, достигалось плотное и относительно комфортное примыкание маски к голове животного с учетом всех индивидуальных особенностей ее формы.

Внешняя маска была выполнена из твердого пластика. Ее форма и размер были универсальными и рассчитаны на основе КТ пяти животных таким образом, чтобы в будущем ее можно было использовать для экспериментов на разных обезьянах, изготавливая заново только внутреннюю маску (рис. 1с). Носовая часть внешней маски сконструирована так, чтобы к ней герметично крепилась штатная накладка для подачи газового наркоза (в случае необходимости). На уровне глаз во внешней маске предусмотрены отверстия для

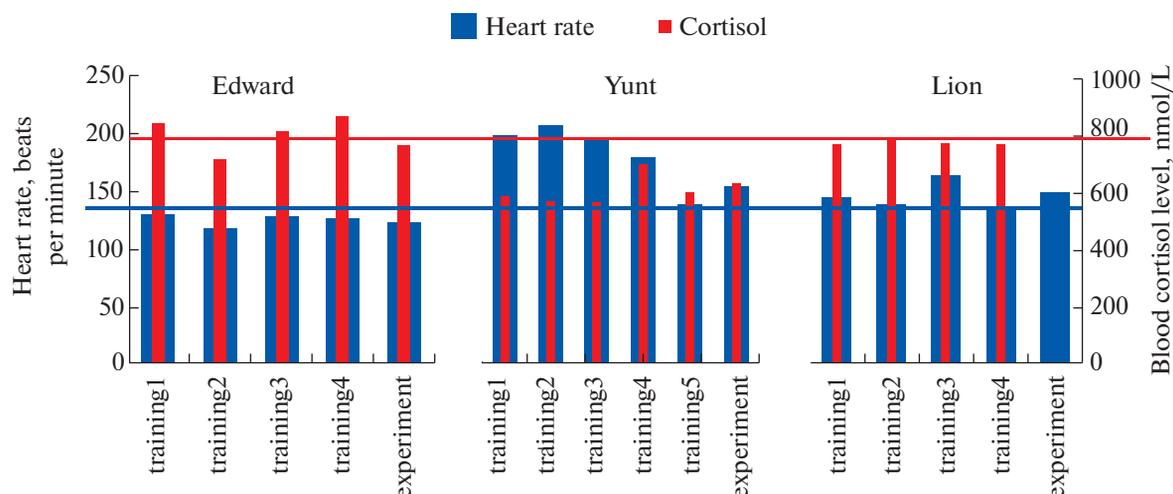


Рис. 2. Частота сердечных сокращений и концентрация кортизола в крови обезьян во время тренировок по имитации условий фМРТ эксперимента и во время проведения фМРТ эксперимента. Синяя горизонтальная линия – значение ЧСС у обезьян макак-резусов в покое. Красная горизонтальная линия – верхняя граница нормы содержания кортизола у обезьян данного вида в покое (норма 500–800 нмоль/л по [18]).

крепления световодов. К каждому глазу подводится по одному отдельному световоду, длиной пять метров (рис. 1d). Световоды упирались в рассеивающие свет заглушки из матового оргстекла, установленные непосредственно перед глазами животного. Таким образом, достигалась диффузная засветка всего поля зрения равномерным белым светом. Вторые концы световодов были выведены за пределы помещения, где находится томограф, и закреплены в специально разработанном нами устройстве для предъявления светодиодных вспышек с заданными временными характеристиками. Маска и система крепления световодов были сконструированы таким образом, что в отсутствие стимуляции глаза обезьяны находились в полной темноте.

Во время эксперимента животное располагали в томографе лежащим на спине. Для фиксации тела был сконструирован контейнер из оргстекла с множеством ремней (рис. 1с,е). В днище ящика были предусмотрены полозья под размер отверстий в столе томографа для стабилизации всей конструкции, которая полностью состояла из немагнитных материалов, чтобы она была совместима с томографом. В том числе, все крепления были сделаны на основе пластиковых винтов. Затылочная часть внешней маски была прочно закреплена к днищу контейнера, в нее помещали затылочную часть внутренней маски, укладывали животное, надевали лицевую часть внутренней маски и затем фиксировали всю конструкцию с помощью лицевой части внешней маски, прикручивая ее винтами к затылочной части (рис. 1с). Таким образом, достигалось надежное и безболезненное обездвиживание головы обезьяны.

Перед помещением в контейнер обезьяне вводили короткодействующий наркоз (золетил,

5 мг/кг), надевали специально сшитый костюм из прочного материала, ограничивающий движения конечностей (рис. 1с,е). После завершения фиксации тела и головы животного, дожидались, когда оно полностью отойдет от наркоза (1.5–2 ч), и приступали к проведению экспериментов.

Поскольку вынужденное обездвиживание способно вызвать стресс у животных, что может сказаться на регистрируемом сигнале, перед проведением фМРТ исследования с каждой обезьяной проводили по четыре–пять тренировок, имитирующих эксперимент. Макакам вводили короткодействующий наркоз, помещали в фиксирующий пенал, закрепляли маску и дожидались, когда животное проснется. Затем подавали через динамики звуки, имитирующие работающий МРТ сканер, и через световоды предъявляли вспышки света. Каждая тренировка длилась 2–2.5 ч, в течение этого времени, в качестве косвенного показателя уровня стресса, регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС) с помощью ЭКГ-датчиков. После тренировки у животных брали кровь на анализ содержания гормона кортизола, принимающего участие в развитии стрессовых реакций.

Тренировки проводили один раз в неделю, чтобы дать животным время на реабилитацию. На рис. 2 представлены значения ЧСС и концентрации кортизола у трех обезьян в разные дни тренировок и во время проведения фМРТ эксперимента.

Синяя горизонтальная линия на рисунке отображает значение ЧСС у обезьян макак-резусов в покое, составляющее в среднем 135 ударов в минуту [17]. Видно, что только у Юнта этот показатель вначале превышает норму. Однако к пятой тренировке его ЧСС снижается до значений, близких к норме, что предполагает постепенное привыкание животного

го к стесненным условиям. У остальных двух обезьян ЧСС не изменялась по мере обучения и в среднем не превышала средних значений в покое.

Красной горизонтальной линией на рисунке отмечена верхняя граница нормы содержания кортизола у обезьян данного вида в покое (норма 500–800 нмоль/л по [18]). У всех трех животных концентрация кортизола не снижалась по мере обучения и в целом не превышала границы нормы (за исключением небольшого превышения у Эдуарда в некоторые дни тренировок).

Взятые вместе показатели ЧСС и уровня кортизола, при сопоставлении их с контрольными данными из литературы [17, 18], предполагают, что обезьяны не подвергаются сильному стрессу во время иммобилизации. Тем не менее, тренируя их заранее, мы минимизируем эффекты новизны или испуга, которые могли бы повлиять на результат фМРТ исследования.

Изменения уровня оксигенации крови (BOLD-сигнала) в ответ на стимуляцию вспышками света регистрировали в томографе Philips Achieva мощностью 1.5 Тесла. Регистрацию осуществляли со следующими параметрами: импульсная последовательность FE_EPI (16 срезов через каждые 4 мм), FS 1.5, TR 3000, TE 50. Первые 30 с обезьяна лежала в полной темноте, затем, в последующие 30 с, осуществляли стимуляцию мелькающим светом с помощью световодов, подходящих к глазам животного, после чего опять наступала темнота. Такой цикл темнота–мелькания повторяли 13 раз для повышения достоверности результатов, что составляло по времени 13 мин. Во время световой стимуляции длительность каждой вспышки составляла 10 мс, время между вспышками варьировало от 100 до 500 мс. Таким образом, достигалась переменная частота мельканий для того, чтобы не происходило навязывание ритмов. Яркость каждой вспышки составляла 250 кд/м², этого было достаточно, чтобы вызвать ощущения мельканий даже сквозь веки, при закрытых глазах.

Препроцессинговая обработка данных включала стандартные процедуры сглаживания, удаления артефактов, преобразование данных в MNI-пространство и совмещение данных с шаблоном, основанном на результатах более 100 структурных МРТ макак [19]. Статистические карты распределения активности в мозге обезьяны оценивали с помощью стандартного метода GLM (General Linear Model), сравнивая BOLD-сигнал, накопленный за все периоды темноты (фаза покоя) и за все периоды с мелькающим светом (фаза активации). При описании индивидуальных карт активации использовали порог $p < 0.001$, а при описании групповых результатов использовали порог $p < 0.01$ без поправки на множественные сравнения. Обработку проводили в программах SPM12, DPABI_2.3, работающих в сре-

де Matlab. Для визуализации полученных результатов использовали программный пакет Xjview.

РЕЗУЛЬТАТЫ исследования

Всего на трех обезьянах было проведено пять однотипных экспериментов, в которых регистрировали изменения потребления кислорода тканями мозга, вызываемые вспышками света. С двумя обезьянами, Юнтом и Львом, эксперимент повторили дважды для повышения достоверности данных. На рис. 3 показан пример реакции мозга на мелькание света, зарегистрированной у обезьяны Юнт. В верхней части рис. 3 красным цветом отмечены области мозга в затылочной коре, увеличившие потребление кислорода во время стимуляции. Одновременно с этим наблюдали снижение активности в теменных областях мозга (отмечено синим цветом на рис. 3). На нижней части рисунка представлено изменение во времени BOLD-сигнала, косвенно отражающего активность этих областей мозга по уровню оксигенации крови. Как видно из рисунка, во время стимуляции вспышками света наблюдается устойчивое, но разнонаправленное изменение активности – активация в затылочной коре сопровождается деактивацией в теменной коре, и наоборот – во время фазы покоя, в темноте, потребление кислорода в затылочной коре снижается, а в теменной коре повышается. Таким образом, нами были локализованы области мозга, находящиеся в оппонентных отношениях во время пассивного восприятия мелькающего диффузного света.

В целях выявления достоверных реакций на вспышки, характерных для всех трех животных, были усреднены статистические карты распределения активности, полученные в пяти экспериментах на трех макаках. Для этого индивидуальные данные, полученные на каждом животном, были совмещены с универсальным анатомическим шаблоном, основанным на данных МРТ множества макак. Для усреднения использовалась модель со случайными эффектами из пакета SPM (one-sample t-test). При усреднении результатов применили дополнительный метод шумоподавления – кластеризацию, – при котором однонаправленные изменения BOLD-сигнала в соседних вокселях объединяли в единый кластер. В наших экспериментах размер одного вокселя (элемента объемного изображения мозга) составлял 2 × 2 × 2 мм. За порог кластеризации мы приняли 80 вокселей. Изменения BOLD-сигнала в меньших по объему областях мозга нами не рассматривались.

На рис. 4 представлены усредненные результаты пяти фМРТ экспериментов, полученные на трех макаках. Красным цветом отмечены области мозга, достоверно увеличивающие потребление кислорода во время световой стимуляции относительно фазы покоя, когда животные находились в пол-

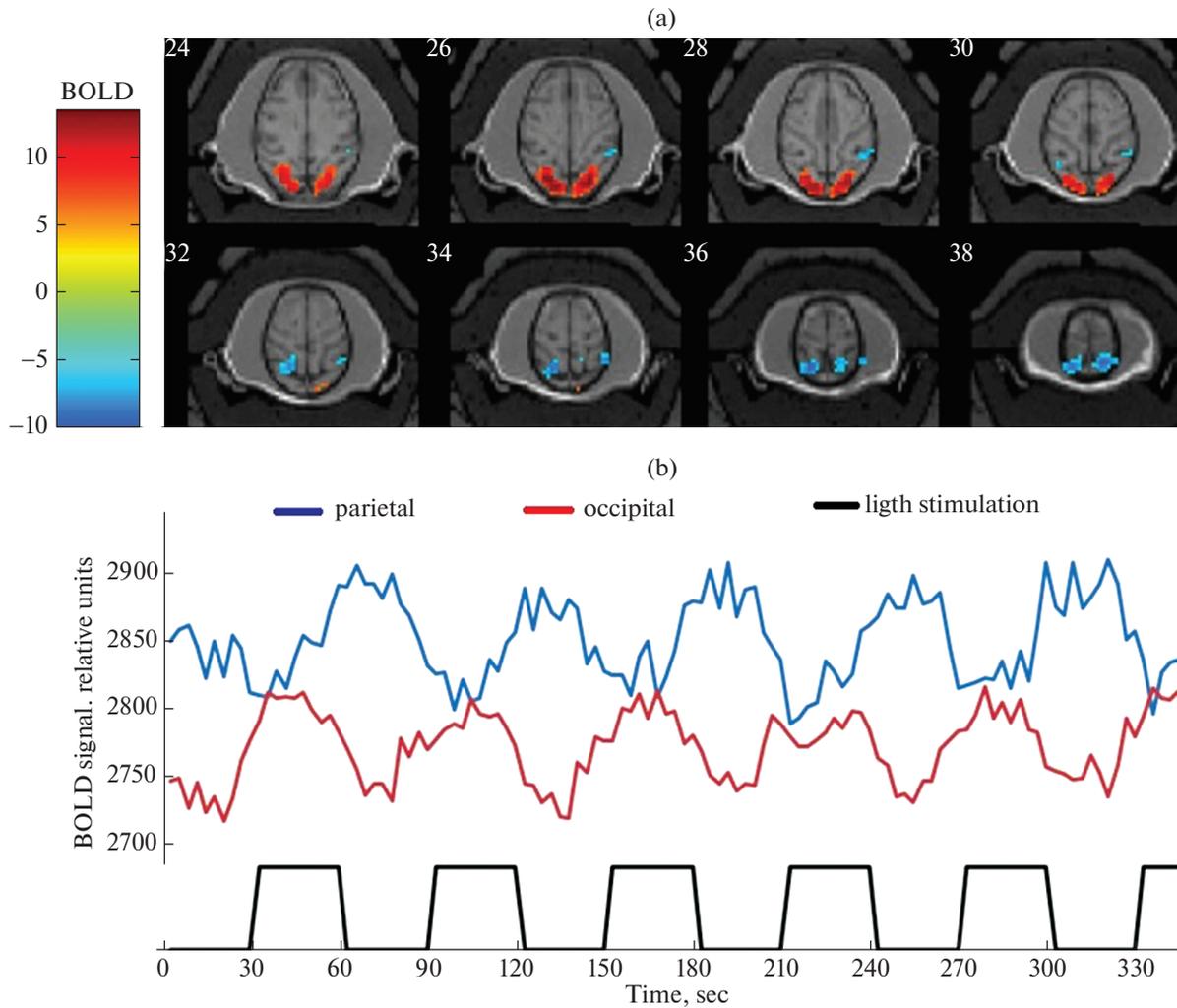


Рис. 3. Пример разнонаправленного изменения активности в теменной и затылочной коре во время стимуляции вспышками света, зарегистрированного у обезьяны Юнт. (а) – распределение активности на анатомических срезах мозга. Красный цвет – увеличение потребления кислорода во время световой стимуляции; синий цвет – снижение потребления кислорода. (б) – красная и синяя линии – изменение BOLD-сигнала, отражающего активность мозга, в областях, отмеченных красным и синим цветом на верхнем рисунке. Черная линия отображает моменты включения и выключения световой стимуляции.

ной темноте. Синим цветом отмечены области мозга, в которых потребление кислорода, наоборот, снижалось в ответ на вспышки света (двусторонний t -тест, $p < 0.01$).

Увеличение активности в ответ на вспышки наблюдали в затылочной области, симметрично в обоих полушариях. В стереотаксических координатах, где за центральную точку принимают пересечение срединно-сагитальной плоскости и интрауральной линии (точка соприкосновения ушных держателей стереотакса), максимальную активацию наблюдали в координатах X, Y, Z: ± 6 , -17 , $+26$ мм. Другими словами, максимум находился на 6 мм левее и правее нулевой координаты, симметрично в обоих полушариях, на 17 мм позади, и на 26 мм выше нулевой координаты. Согласно электронному атласу мозга макаки-резус [20], основан-

ному на данных Paxinos и соавт. [21], увеличение BOLD-сигнала в ответ на вспышки света наблюдали в первичной зрительной коре (зона V1).

Снижение потребления кислорода во время световой стимуляции наблюдали в различных областях теменной коры, преимущественно симметрично в правом и левом полушарии. Максимальное снижение активности регистрировали в задней части теменной коры, в районе интрапариетальной борозды, в зоне 7 по Бродману. Согласно электронному атласу мозга [20], это задняя часть латеральной интрапариетальной области (LIP) с частичным захватом дорзальной париетальной зоны с координатами X, Y, Z: ± 6 , -8 , 32 мм. По соседству деактивацию наблюдали в задней теменной области (PPt) с частичным захватом срединной височ-

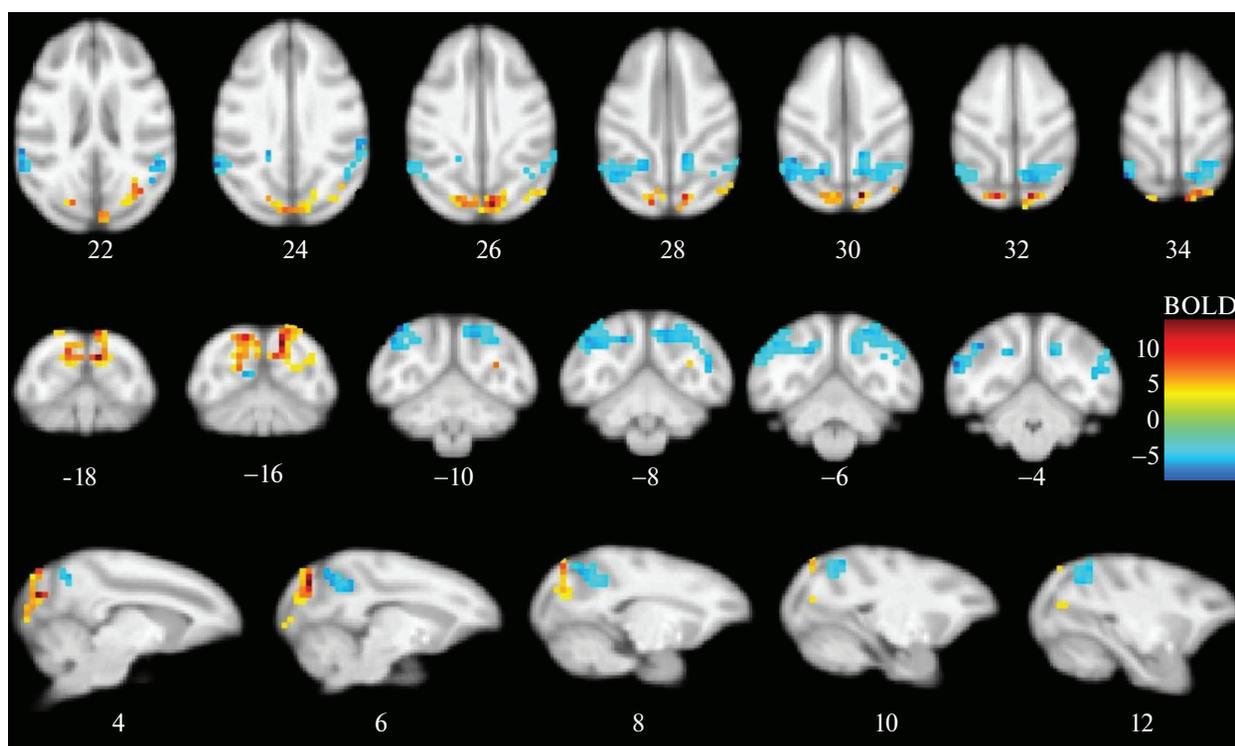


Рис. 4. Статистические карты распределения активности во время световой стимуляции, полученные на основе пяти фМРТ экспериментов на трех макаках ($p < 0.01$). Цифры под каждым срезом – расстояние в мм относительно нулевой стереоатактической координаты (см. пояснения в тексте).

ной области (экстрастриарная зона V5) с координатами X, Y, Z: $\pm 12, -6, 34$.

Следует отметить, что активированные и деактивированные области в затылочной и теменной коре не граничили друг с другом – кратчайшее расстояние между ними, измеренное по прямой с помощью программы анализа томографических данных Инобитек, составило 10 мм. Таким образом, анализ изменений BOLD-сигнала во времени и соотнесение локализованных нами областей с данными известных атласов мозга макак-резусов позволяют утверждать, что процессы активации и деактивации в ответ на вспышки света происходят одновременно в различных морфофункциональных отделах мозга.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для проведения фМРТ экспериментов на бодрствующих обезьянах нами была разработана оригинальная система крепления головы и тела, позволяющая проводить исследования без хирургических вмешательств. Использование индивидуальных данных о форме головы на основе КТ и сочетание силиконов различной твердости при изготовлении маски обеспечили надежную и безболезненную фиксацию головы животного. Косвенные показатели уровня стресса, такие как уровень кортизола и ЧСС, измеренные у обезьян во время

имитации фМРТ эксперимента, в целом незначительно превышали нормативные показатели в покое, приближаясь к ним к концу тренировок. Это позволяет утверждать, что используемый нами метод фиксации не причиняет существенного дискомфорта обезьянам. Однако мы считаем, что предварительные тренировки необходимы, так как они позволяют животным адаптироваться к стесненным условиям, привыкнуть к шуму томографа и, таким образом, минимизировать эффекты новизны, которые могли бы повлиять на результат фМРТ исследования.

В результате экспериментов, на основе анализа изменений уровня оксигенации крови в ответ на стимуляцию всего поля зрения мелькающим светом, было зафиксировано увеличение BOLD-сигнала в первичной зрительной коре (зона V1) и одновременное его снижение в теменной коре (зона 7 по Бродману) и в экстрастриарной коре (зона V5). Активация первичной зрительной коры была предсказуема, так как равномерное освещение всего поля зрения является простейшим стимулом, который не требует вовлечения более высоких зрительных областей мозга, осуществляющих более сложную обработку сигнала, такую как восприятие формы, движения, объединение фрагментов паттерна в единое целое и другие процессы, связанные с распознаванием изображений.

Согласно Подвигину и соавт. [22], нейроны зоны 7 теменной коры, где мы наблюдали снижение BOLD-сигнала, могут отвечать на зрительную стимуляцию, но чаще всего это происходит при активном участии животного в эксперименте, при котором необходима координация зрительных, соматосенсорных и двигательных функций. В частности, латеральная интрапариетальная область, где мы наблюдали максимальное снижение потребления кислорода во время световой стимуляции, играет ключевую роль в управлении глазодвигательным аппаратом при зрительном поиске и локализации объектов в поле зрения [23, 24]. Экстрастриарная зона V5, где мы также наблюдали снижение BOLD-сигнала, преимущественно отвечает за восприятие когерентного движения и сложных зрительных паттернов [25].

Прежде чем обсуждать причину снижения BOLD-сигнала в ответ на вспышки, необходимо прояснить его природу. На данный момент существуют две альтернативные гипотезы, объясняющие этот феномен. Согласно сосудистой гипотезе [10], количество оксигенированной крови, доступной в каждый момент времени, ограничено, поэтому она поступает пропорционально потребностям мозговой ткани. Как следствие, во время выполнения задачи кислород, который обслуживает активированные области, будет отобран из незадействованных соседних областей. Согласно нейронной гипотезе, в основе снижения BOLD-сигнала лежит снижение нейронной активности в данной области [9], при этом не исключается и сосудистый вклад в снижение BOLD-сигнала. В настоящее время, несмотря на растущее число исследований, в которых сообщается о снижении BOLD-сигнала, его происхождение и связь с метаболическими и нейронными реакциями все еще обсуждаются, а его механизмы менее понятны по сравнению с механизмами увеличения BOLD-сигнала [6, 26]. В англоязычной литературе этот феномен до сих пор называют негативным BOLD-ответом (negative BOLD-response, NBR), без привязки к его природе.

Однако со временем появляется все больше свидетельств в пользу нейронной гипотезы происхождения негативного BOLD-ответа, где наиболее убедительные данные основаны на результатах инвазивных экспериментов на обезьянах. Так, снижение нейронной активности было зарегистрировано в областях мозга макаки, в которых ранее наблюдали негативный BOLD-ответ [11]. Данное исследование проводили на животных под наркозом, а изменения нейронной активности и BOLD-сигнала регистрировали в ответ на стимуляцию центра и периферии поля зрения кольцевым шахматным паттерном. Nauden и соавт. снижение нейронной активности регистрировали у бодрствующих макак в задней цингулярной извилине, основном компоненте дефолтной системы мозга, во время решения обезьяной когнитивной задачи

[27]. Авторы не проводили собственных фМРТ исследований, направленных на локализацию негативного BOLD-ответа, они основывались на литературных данных о снижении BOLD-сигнала в дефолтной сети мозга во время увеличения когнитивной нагрузки. Логическим продолжением этой работы является исследование [28], в котором с помощью электрода, помещенного в заднюю цингулярную извилину макаки (дефолтная сеть), регистрировали как нейронную активность, так и локальную концентрацию кислорода в тканях, тесно связанную с BOLD-сигналом в фМРТ. В результате, в ответ на предъявление изображений живой природы, в задней цингулярной извилине регистрировали снижение как нейронной активности, так и концентрации кислорода. Таким образом, эксперименты на животных, совместно с фМРТ исследованиями на человеке, косвенно подтверждающими нейронную природу негативного BOLD-ответа [7, 9, 29], позволяют рассматривать наблюдаемое в наших экспериментах снижение BOLD-сигнала как снижение нейронной активности в локализованных областях.

Возвращаясь к обсуждению полученных нами результатов, по нашим данным, на обезьянах еще не описан негативный BOLD-ответ на стимуляцию всего поля зрения вспышками света. Однако похожие результаты были получены в аналогичных фМРТ исследованиях на человеке [4, 5]. Наряду с активацией первичной зрительной коры, авторы наблюдали снижение активности в экстрастриарных областях мозга – латеральной затылочной области (LOC) и в затылочной части фузиформной извилины. Области, активность которых снижается в ответ на вспышки, находились рядом с областями, повышающими активность, но не пересекались.

Предъявление более сложных зрительных стимулов, таких как синусоидальные решетки, шахматные паттерны и тому подобное, тоже вызывало позитивные и негативные BOLD-ответы, локализованные, как правило, в пределах зрительной коры, по соседству друг с другом [9, 11, 30]. Так, в исследованиях на человеке стимуляция кольцевым шахматным паттерном приводила к увеличению BOLD-сигнала в первичной зрительной области, в соответствии с ретинотопическим картированием ортогонально шпорной борозде. В дорсальном направлении от этой области развивался негативный BOLD-ответ, захватывающий помимо первичной зрительной коры еще зоны V2 и V3 [9]. В эксперименте на анестезированных обезьянах стимуляция таким же паттерном приводила к появлению позитивных и негативных BOLD-ответов в пределах первичной зрительной коры. Причем эти области граничили друг с другом, а их взаимное расположение изменялось в зависимости от эксцентриситета предъявляемого стимула [11].

Общим принципом распределения активированных и деактивированных областей в упомянутых работах было увеличение активности в зонах мозга, вовлеченных в обработку стимула, и снижение активности в соседних областях, функционально менее связанных с обработкой данного типа сигналов. Однако предъявление зрительных паттернов раздельно в левое или правое поле зрения человека приводило преимущественно к увеличению активности в зрительной коре контралатерального полушария и одновременно к снижению BOLD-сигнала в ипсилатеральном полушарии [6, 7]. Это говорит о существовании оппонентных взаимодействий и между удаленными друг от друга областями мозга, в разной степени вовлеченными в обработку сигнала.

В наших экспериментах этот принцип тоже соблюдается. Во время стимуляции вспышками света основная нагрузка приходилась на первичную зрительную кору, что выражалось в позитивном BOLD-ответе. При этом области с негативным BOLD-ответом, отвечающие за локализацию объектов в пространстве и интеграцию сенсорных сигналов (зона 7), либо отвечающие за восприятие движения и сложных зрительных паттернов (зона V5), оставались менее задействованными, поскольку обезьяны пассивно созерцали предъявляемые вспышки, без всякого задания. Осуществлять целенаправленный зрительный поиск они не могли, так как световая стимуляция была диффузной, перекрывающая практически все поле зрения, и взгляду попросту не на чем было фиксироваться.

Следует отметить, что разнонаправленное изменение активности в различных областях мозга, наблюдаемое с помощью фМРТ в наших и других исследованиях, вряд ли обеспечивается за счет непосредственной (моносинаптической) связи между этими областями, особенно если они существенно разнесены в пространстве. Маловероятно и параллельное, но разнонаправленное воздействие восходящих таламокортикальных проекций на корковые представительства сенсорных систем разной модальности. Хотя в литературе встречаются данные о прямых таламокортикальных зрительных проекциях на вторичную слуховую кору и таламокортикальных слуховых проекциях на вторичную зрительную кору у некоторых видов, эти входы сравнительно редки [3, 31, 32].

Вероятнее всего, оппонентные взаимодействия происходят благодаря полисинаптическим переключениям с участием третьих структур. В качестве таких релейных структур, например, при мультимодальных взаимодействиях, рассматриваются ассоциативные области коры, интегрирующие информацию от различных органов чувств [3, 33]. Причем, эти взаимодействия пластичны и зависят от жизненного опыта. Так, в томографическом ис-

следовании на пациентах, ослепших в раннем детстве, было показано, что тактильная стимуляция при чтении таблиц Брайля активизирует зрительные области коры. Однако такая же процедура, проведенная на здоровых испытуемых, задачей которых было определить наощупь структуру таблиц, наоборот, приводила к снижению активности в зрительной коре [34].

С помощью томографических методов не представляется возможным ответить на вопрос о природе разнонаправленных изменений активности. В любом случае, поскольку активация и деактивация различных областей мозга происходит в ответ на предъявление одних и тех же стимулов и практически одновременно (в секундном временном разрешении), можно говорить об их взаимодействии, хоть и опосредованном. Изучение временных задержек между активацией и деактивацией в миллисекундном временном разрешении, совместно с анализом синхронизации текущей нейронной активности в этих областях, позволило бы пролить свет на природу оппонентных взаимодействий. Такую возможность дает сочетание томографических и электрофизиологических методов, применяемых на животных в одинаковых экспериментальных парадигмах.

Какой же смысл оппонентных взаимодействий, наблюдаемых между довольно большими областями мозга, зачастую между различными функциональными системами? Большинство исследователей рассматривают распределение позитивных и негативных BOLD-ответов как отражение процесса переключения внимания. В результате оппонентных взаимодействий, когда одни области мозга, вовлеченные в обработку сигнала, активизируются, а менее задействованные соседние области снижают свою активность, повышается точность обработки информации при фокусировке внимания. Однако негативный BOLD-ответ на зрительный паттерн, выявленный у обезьян под наркозом [11], сложно объяснить переключением внимания. В наших экспериментальных условиях обезьяны тоже вряд ли усиленно следили за вспышками. Во-первых, у них не было такого задания, во-вторых, они могли бы привыкнуть к вспышкам за время тренировок и, в-третьих, среди прочих раздражителей, таких как шум томографа и вынужденная иммобилизация, вспышки явно не доминировали в привлечении внимания обезьяны.

Мы полагаем, что разнонаправленные изменения BOLD-сигнала, наблюдаемые в наших и во многих других экспериментах, отражают общий принцип поддержания баланса нейронной активности, целью которого является экономия энергетических ресурсов мозга. Давно известно, что активность нейронов (как потенциалов действия, так и синаптической передачи) — энергоемкий процесс [35]. Поэтому снижение активности относи-

тельно фонового уровня в областях мозга, незадействованных в решении какой-либо задачи, помогло бы компенсировать увеличение потребления энергии в других областях мозга, ответственных за выполнение этой задачи.

Данную гипотезу мы выдвинули ранее на основе изучения зависимости объема активированных и деактивированных областей в мозге человека от сложности задачи [8]. Испытуемые решали зрительный пространственный тест на четырех уровнях сложности. Во время работы у них активировались затылочно-височные, теменные и лобные области, ответственные за выполнение этой задачи. Одновременно наблюдали деактивацию в структурах дефолтной системы и в областях первичной слуховой коры, не занятых в выполнении данного теста. Для каждого уровня сложности отдельно рассчитали суммарный объем активированных областей по всему мозгу, и отдельно — суммарный объем всех деактивированных областей, вне зависимости от их локализации. Зависимости объема активированных и деактивированных областей от сложности задачи полностью совпали — по мере усложнения теста количество вокселей со значимым увеличением BOLD-сигнала возрастало, и точно по такому же закону возрастало количество вокселей со значимым снижением BOLD-сигнала. Другими словами, отношение количества активированных и деактивированных вокселей всегда было постоянным, что предполагает существование в мозге человека и животных механизмов, направленных на поддержание постоянства общего уровня нейронной активности.

Косвенным подтверждением этой гипотезы является исследование с помощью высокопольного томографа (7 Тесла) реакций головного мозга человека на предъявление шахматных паттернов разного контраста [2]. По мере увеличения контраста стимула амплитуда позитивного BOLD-ответа, регистрируемого в зрительной коре, постепенно увеличивалась. Аналогичным образом увеличивалась и амплитуда негативного BOLD-ответа, регистрируемого в то же время в слуховой коре. Сходство зависимостей амплитуды позитивных и негативных BOLD-реакций, регистрируемых в различных функциональных системах, подтверждает наше предположение о том, что процессы активации и деактивации в головном мозге сбалансированы.

Поскольку увеличение активности в одних областях и снижение в других происходит практически одновременно [11], можно допустить, что поддержание баланса между различными областями мозга происходит на рефлекторном уровне, вероятно, на основе выработанных в ходе эволюции алгоритмов. Мозаику распределения негативных BOLD-ответов относительно активированных областей еще предстоит понять. Почему в одних условиях стимуляции деактивируются соседние

участки, принадлежащие одной функциональной системе, а в иных условиях деактивацию наблюдают в другом полушарии, или в другой функциональной системе? Почему при возрастании когнитивной нагрузки наиболее часто деактивацию наблюдают на медиальной поверхности теменной и лобной коры, в структурах дефолтной системы? Ответы на эти вопросы, а также на вопросы, связанные с динамикой оппонентных взаимосвязей, могут дать эксперименты, сочетающие томографические и электрофизиологические методы. В этом смысле исследования на обезьянах дают неопределенное преимущество, так как у этих животных с помощью фМРТ можно выявить аналогичные человеку крупномасштабные нейронные сети [12] и регистрировать электрическую активность непосредственно этих структур мозга, что мы планируем осуществить в следующих экспериментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель исследований заключалась в изучении оппонентных взаимодействий в головном мозге приматов как возможного механизма поддержания энергетического баланса мозга. В результате проведенных работ нами была разработана и внедрена в практику собственная система фиксации головы и тела обезьян, необходимая для проведения томографических исследований на бодрствующих животных. Впервые показано, что при стимуляции вспышками света, одновременно с увеличением активности в первичной зрительной коре, ответственной за обработку сигнала, происходит снижение активности в определенных областях теменной и височной коры. Эти области у макаков ответственны преимущественно за локализацию объектов в поле зрения, восприятие когерентного движения и сложных зрительных паттернов, т.е. были менее задействованы при восприятии вспышек света. Поскольку процессы активации и деактивации изменялись синхронно со световой стимуляцией, мы допускаем, что они взаимосвязаны, возможно, опосредованно. Нейрофизиологические принципы таких оппонентных взаимодействий — предмет дальнейших электрофизиологических исследований на обезьянах с учетом полученных томографических данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030), тема 0134-2019-0006.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента – А.К.Х. Сбор данных – А.К.Х., Л.Е.И., П.П.В. Обработка данных – А.К.Х., П.П.В., Д.Н.П. Написание манускрипта – А.К.Х. Редактирование манускрипта – Д.Н.П.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.А. Варовина за техническое сопровождение проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL (2001) A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 676–682.
2. Jorge J, Figueiredo P, Gruetter R, van der Zwaag W (2018) Mapping and characterization of positive and negative BOLD responses to visual stimulation in multiple brain regions at 7T. *Human brain mapping* 39 (6): 2426–2441. <https://doi.org/10.1002/hbm.24012>
3. Laurienti PJ, Burdette JH, Wallace MT, Yen YF, Field AS, Stein BE (2002) Deactivation of sensory-specific cortex by cross-modal stimuli. *Journal of cognitive neuroscience* 14 (3): 420–429. <https://doi.org/10.1162/089892902317361930>
4. Maggioni E, Molteni E, Zucca C, Reni G, Cerutti S, Triulzi FM, Arrigoni F, Bianchi AM (2015) Investigation of negative BOLD responses in human brain through NIRS technique. A visual stimulation study. *NeuroImage* 108: 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.074>
5. Maggioni E, Zucca C, Reni G, Cerutti S, Triulzi FM, Bianchi AM, Arrigoni F (2016) Investigation of the electrophysiological correlates of negative BOLD response during intermittent photic stimulation: An EEG-fMRI study. *Human Brain Mapping* 37 (6): 2247–2262. <https://doi.org/10.1002/hbm.23170>
6. Fracasso A, Gaglianese A, Vansteensel MJ, Aarnoutse EJ, Ramsey NF, Dumoulin SO, Petridou N (2021) FMRI and intra-cranial electrocorticography recordings in the same human subjects reveals negative BOLD signal coupled with silenced neuronal activity. *BraIn Structure & Function*. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02342-4>
7. Smith AT, Williams AL, Singh KD (2004) Negative BOLD in the visual cortex: evidence against blood stealing. *Human Brain Mapping* 21 (4): 213–220. <https://doi.org/10.1002/hbm.20017>
8. Kharauzov AK, Vasil'ev PP, Sokolov AV, Fokin VA, Shelepin YuE (2018) *Functional magnetic resonance imaging analysis* of the human brain in texture recognition tasks. *J Opt Technol* 85: 463–467.
9. Shmuel A, Yacoub E, Pfeuffer J, Van de Moortele PF, Adriany G, Hu X, Ugurbil K (2002) Sustained negative BOLD, blood flow and oxygen consumption response and its coupling to the positive response in the human brain. *Neuron* 36 (6): 1195–1210. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01061-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01061-9)
10. Harel N, Lee SP, Nagaoka T, Kim DS, Kim SG (2002) Origin of negative blood oxygenation level-dependent fMRI signals. *J Cerebr Blood Flow And Metabolism : Official J International Society of Cerebral Blood Flow And Metabolism* 22 (8): 908–917. <https://doi.org/10.1097/00004647-200208000-00002>
11. Shmuel A, Augath M, Oeltermann A, Logothetis NK (2006) Negative functional MRI response correlates with decreases in neuronal activity in monkey visual area V1. *Nature Neurosci* 9 (4): 569–577. <https://doi.org/10.1038/nn1675>
12. Mantini D, Gerits A, Nelissen K, Durand JB, Joly O, Simone L, Sawamura H, Wardak C, Orban GA, Buckner RL, Vanduffel W (2011) Default mode of brain function in monkeys. *J Neurosci* 31 (36): 12954–12962. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2318-11.2011>
13. Demertzi A, Tagliazucchi E, Dehaene S, Deco G, Bartfeld P, Raimondo F, Martial C, Fernández-Espejo D, Rohaut B, Voss HU, Schiff ND, Owen AM, Laureys S, Naccache L, Sitt JD (2019) Human consciousness is supported by dynamic complex patterns of brain signal coordination. *Science Advances* 5 (2): eaat7603. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7603>
14. Bartfeld P, Uhrig L, Sitt JD, Sigman M, Jarraya B, Dehaene S (2015) Signature of consciousness in the dynamics of resting-state brain activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (3): 887–892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418031112>
15. Srihasam K, Sullivan K, Savage T, Livingstone MS (2010) Noninvasive functional MRI in alert monkeys. *NeuroImage* 51 (1): 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.01.082>
16. Slater H, Milne AE, Wilson B, Muers RS, Balezeau F, Hunter D, Thiele A, Griffiths TD, Petkov CI (2016) Individually customisable non-invasive head immobilisation system for non-human primates with an option for voluntary engagement. *J Neurosci Methods* 269: 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.05.009>
17. Ueda Y, Slabaugh TL, Walker AL, Ontiveros ES, Sosa PM, Reader R, Roberts JA, Stern JA (2019) Heart Rate and Heart Rate Variability of Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) Affected by Left Ventricular Hypertrophy. *Front Veterin Sci* 6:1. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00001>
18. Capitanio JP, Mendoza SP, Bentson KL (2004) Personality characteristics and basal cortisol concentrations in adult male rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinology* 29 (10): 1300–1308. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.04.001>
19. McLaren DG, Kosmatka KJ, Oakes TR, Kroenke CD, Kohama SG, Matochik JA, Ingram DK, Johnson SC (2009) A population-average MRI-based atlas collection of the rhesus macaque. *NeuroImage* 45 (1): 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.10.058>
20. Bakker R, Tiesinga P, Kötter R (2015) The Scalable Brain Atlas: Instant Web-Based Access to Public Brain Atlases and Related Content. *Neuroinformatics* 13 (3): 353–366. <https://doi.org/10.1007/s12021-014-9258-x>
21. Paxinos G, Huang XF, Toga AW (2000) The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA. Acad Press.

22. *Подвигин НФ, Макаров ФН, Шелепин ЮЕ* (1986) Элементы структурно-функциональной организации зрительно-глазодвигательной системы. Наука Ленинград [Podvigin NF, Makarov FN, Shelepin YE (1986) Elements of the structural and functional organization of the visual-oculomotor system. Nauka. Leningrad (In Russ)].
23. *Christopoulos VN, Kagan I, Andersen RA* (2018) Lateral intraparietal area (LIP) is largely effector-specific in free-choice decisions. *Sci Rep* 8: 8611. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26366-9>
24. *Niu M, Impieri D, Rapan L, Funck T, Palomero-Gallagher N, Zilles K* (2020) Receptor-driven, multimodal mapping of cortical areas in the macaque monkey intraparietal sulcus. *eLife* 9: e55979. <https://doi.org/10.7554/eLife.55979>
25. *Vanni S, Hokkanen H, Werner F, Angelucci A* (2020) Anatomy and Physiology of Macaque Visual Cortical Areas V1, V2, and V5/MT: Bases for Biologically Realistic Models. *Cerebral cortex* (New York, N.Y. : 1991) 30 (6): 3483–3517. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz322>
26. *Goense J, Bohraus Y, Logothetis NK* (2016) fMRI at High Spatial Resolution: Implications for BOLD-Models. *Front Comput Neurosci* 10: 66. <https://doi.org/10.3389/fncom.2016.00066>
27. *Hayden BY, Smith DV, Platt ML* (2009) Electrophysiological correlates of default-mode processing in macaque posterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (14): 5948–5953. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812035106>
28. *Bentley WJ, Li JM, Snyder AZ, Raichle ME, Snyder LH* (2016) Oxygen Level and LFP in Task-Positive and Task-Negative Areas: Bridging BOLD fMRI and Electrophysiology. *Cerebral cortex* (New York, N.Y. : 1991) 26 (1): 346–357. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu260>
29. *Lin P, Hasson U, Jovicich J, Robinson S* (2011) A neuronal basis for task-negative responses in the human brain. *Cerebral cortex* (New York, N.Y. : 1991) 21 (4): 821–830. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq151>
30. *Bressler D, Spotswood N, Whitney D* (2007) Negative BOLD fMRI response in the visual cortex carries precise stimulus-specific information. *PLoS ONE*, 2 (5): e410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000410>
31. *Barth DS, Goldberg N, Brett B, Di S* (1995) The spatio-temporal organization of auditory, visual, and auditory–visual evoked potentials in rat cortex. *Brain Res* 678: 177–190.
32. *Dean P* (1990) Sensory cortex: Visual perceptual functions. In *B. Kolb & R. Tees* (Eds.), *The cerebral cortex of the rat* (pp. 275–307). Cambridge: MIT Press.
33. *Calvert GA, Campbell R, Brammer MJ* (2000) Evidence from functional magnetic resonance imaging of cross-modal binding in the human heteromodal cortex. *Current Biol : CB* 10 (11): 649–657. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00513-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00513-3)
34. *Satado N, Pascual-Leone A, Grafman J, Ibanez V, Deiber M-P, Dold G, Hallett M* (1996) Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. *Nature* 380: 526–528.
35. *Attwell D, Laughlin SB* (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Neurosci* 21 (10): 1133–1145. <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>

fMRI Studies of Opponent Interregional Interactions in the *Macaca mulatta* Brain

A. K. Harauzov^{a,*}, L. E. Ivanova^a, P. P. Vasiliev^a, and D. N. Podvignina^a

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

*e-mail: harauzov@infran.ru

In neurophysiological studies, functional magnetic resonance imaging (fMRI) is most commonly used to map brain functions by locating areas of increased activity when executing various tests. At the same time, less attention is traditionally paid to a concomitant decrease in metabolism in other brain areas despite a comparable intensity of these processes. At present, The cause for such a decrease in local brain activity, as well as its dynamics and the dependence of localization on experimental conditions, are currently in question. The aim of this work was to study the interaction between brain regions that demonstrate bidirectional changes in the level of oxygen consumption in response to the simplest stimuli, flashes of light. The study was carried out on three awake *Macaca mulatta* monkeys, in which activity distribution maps were compared during aperiodic light stimulation and in total darkness. Flashes of light evoked an increase in oxygen consumption in the primary visual cortex and a simultaneous decrease in this indicator in field 7 of the parietal cortex and in zone V5 of the middle temporal area. Brain areas that decreased their activity usually did not respond to stimulation with flashes and were not involved in signal processing under conditions of our experiments. The data obtained are interpreted in the light of the hypothesis of an automatic maintenance of a balance between activated and deactivated brain areas, aimed at saving brain energy resources. Presumably, a decrease in activity relative to the background level in unused areas would help compensate for increased energy consumption in other brain areas responsible for signal processing.

Keywords: rhesus monkey, functional MRI, negative BOLD response

ФЕНОТИПИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ВИСТАР ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА

© 2022 г. М. В. Кондашевская^{1,*}, К. А. Артемьева¹, В. В. Алексанкина¹,
Д. А. Арешидзе¹, М. А. Козлова¹, Л. А. Макарецва¹

¹ “Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына”,
ФГБНУ “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, Москва, Россия

*e-mail: marivladiko@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 24.05.2022 г.

Экстраординарная ситуация пандемии 2019–2022 гг. обусловила резкий скачок заболеваемости посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР). В настоящее время ПТСР расценивается не только как нейropsychическое расстройство, но и как коморбидное заболевание, сопровождающееся заболеваниями сердечно-сосудистой системы, нарушениями кровообращения, патологией печени и др. На сегодняшний день еще не выяснена связь поведенческих изменений с выраженностью трансформации морфофункционального состояния печени. В данной работе ПТСР моделировали на половозрелых самцах крыс Вистар, используя предаторный стресс (страх жертвы перед хищником). Тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте позволило разделить популяцию на животных с низкотрещовым (НТФ) и высокотрещовым (ВТФ) фенотипами. Установлено, что морфофункциональные исследования печени, в большей мере, чем биохимические результаты, позволяют сделать заключение о том, что у крыс обоих фенотипов предаторный стресс индуцирует дисфункцию печени. Это может свидетельствовать о снижении диапазона компенсаторно-приспособительных реакций у стрессированных животных. Тем не менее глубина морфофункциональных нарушений комплекса функциональных механизмов, обеспечивающих углеводно-жировой, водно-электролитный и белковый обмен в печени ВТФ крыс, свидетельствуют о дозозологическом состоянии органа. В случае предъявления дополнительных нагрузок, напряжение регуляторных систем печени может привести к нарушению гомеостаза. Тогда как печень НТФ животных характеризовалась лишь небольшими диффузными изменениями. Следовательно, в настоящей работе удалось установить связь поведенческих изменений с выраженностью трансформации морфофункционального состояния печени.

Ключевые слова: крысы Вистар, посттравматическое стрессовое расстройство, дисфункция печени, высокотрещовый фенотип

DOI: 10.31857/S0044452922040088

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) — это комплекс симптомов нарушения психической деятельности, возникающий в результате единоразового или повторяющегося внешнего сверхсильного травмирующего воздействия на психику человека. В современном мире, с учетом пандемии, объявленной в январе 2020 г. по поводу заболевания, названного COVID-19, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, проблема ПТСР приобретает особую значимость, так как поражается не только иммунная, но и нервная система, а также ментальное здоровье [1, 2]. Во всех странах мира пандемия детерминировала рост числа пациентов с диагнозом ПТСР как среди переболевших, так и не переболевших людей [1, 2].

Необходимо подчеркнуть значительное отличие воздействия стресса на гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему (ГГАС) при ПТСР от других разновидностей нейropsychических расстройств. Именно для ПТСР характерно достаточно быстрое изменение активности структур мозга, участвующих в стресс-реакции, в результате чего гиперинтенсивный тип реагирования нейроэндокринной системы сменяется гипофункцией. То есть большинство типов стресса приводит к гиперактивации ГГАС, развивающейся в результате десенситизации глюкокортикоидной отрицательной обратной связи и повышению уровня кортизола в крови у людей, тогда как лишь при ПТСР формируются ее сенситизация и снижение уровня этого гормона [3, 4]. Принято считать, что в основе нейроэндокрин-

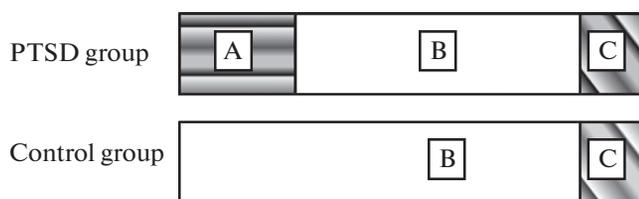


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

A – предаторный стресс 10 мин 10 сут;

B – обычное содержание в виварии 14 сут;

C – тестирование крыс за сутки до окончания эксперимента в приподнятом крестообразном лабиринте.

ных нарушений у пациентов с ПТСР лежит дисрегуляция, которая заключается в повышенной активности симпатoadренальной системы [5]. По мере истощения адаптационных возможностей происходит срыв регуляторных систем организма (дизадаптация) и развиваются патологические изменения [6]. Для ПТСР характерно отсроченное проявление психических и поведенческих симптомов заболевания, а также появление этих симптомов не у всех стрессированных людей. В связи с этим популяцию стрессированных людей принято разделять на устойчивых и неустойчивых к стрессу индивидов [7]. Ранее ПТСР считалось преимущественно психическим заболеванием, тогда как в настоящий момент ПТСР расценивается как коморбидное заболевание, сопровождающееся заболеваниями сердечно-сосудистой системы, нарушениями кровообращения, патологией печени и др. [8].

Множество проводимых исследований демонстрируют связь между стрессом и заболеваниями печени. Известно, что интенсивный стресс сопровождается пероксидацией липидов клеточных мембран и ведет впоследствии к тканевым повреждениям, при этом по сравнению с другими органами наиболее уязвима печень, которая играет ключевую роль в таких жизненных процессах, как детоксикация, углеводный, липидный, энергетический метаболизм и др. [9]. На сегодняшний день еще не выяснена связь поведенческих изменений с выраженностью трансформаций морфофункционального состояния печени.

На данный момент общепризнанной моделью экспериментального воспроизведения ПТСР является модель предаторного стресса – эволюционно закрепленного, избирательного страха грызунов перед хищником и его запахом, разработанная Cohen и Zohar [10] и усовершенствованная Tseilikman и соавт. [11]. Характерным для этой модели является снижение уровня кортикостерона – основного гормона стресса для лабораторных грызунов, что рассматривается в качестве важного фактора адекватности патогенезу у пациентов с диагнозом ПТСР [12, 13]. Для данной модели ПТСР разрабо-

таны методы оценки поведенческих изменений, позволяющие подразделить популяцию лабораторных грызунов на устойчивых (низкотрещовных) и неустойчивых (высокотрещовных) к стрессу особей [14].

Цель работы – охарактеризовать морфофункциональное состояние печени устойчивых и неустойчивых к предаторному стрессу половозрелых самцов крыс Вистар при моделировании посттравматического стрессового расстройства, установить связь поведенческих изменений с выраженностью трансформаций морфофункционального состояния печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 40 половозрелых крысах-самцах Вистар (филиал “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России) с массой тела 180–200 г. Животных, прошедших карантин не менее 14 дней, содержали в стандартных условиях вивария, рассаживая в клетки по 10 особей случайным образом, при естественном освещении, температуре 20–22°C. Доступ к воде и полноценному гранулированному корму (ГОСТ 34566-2019) был свободным. Для проведения эксперимента крыс делили на 2 группы – контрольную и опытную с равным числом особей (по 20 крыс). Опытную группу крыс подвергали воздействию предаторного стресса (кошачья моча) ежедневно по 10 мин 10 сут с последующим содержанием в течение 14 сут в обычных условиях вивария. Дизайн эксперимента изображен на рис. 1.

Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с директивой Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях” (от 22.09.2010 г.). На проведение работы было получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ “Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына” (протокол № 20 от 12 марта 2019 г.).

Для выявления поведенческих различий реакции на стресс животных тестировали по одному в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) в течение 600 с. Регистрировали число заходов в открытые и закрытые рукава ПКЛ, время нахождения в каждом типе рукавов, вычисляли индекс тревожности, разработанный Cohen и соавт. [15]: $ИТ = 1 - [(ВОР/ВТ + ЧЗОР/ОЧЗ)/2]$, где ВОР – время, проведенное в открытых рукавах, ВТ – время тестирования (600 с), ЧЗОР – число заходов в открытые рукава ПКЛ, ОЧЗ – общее число заходов в рукава ПКЛ.

В конце эксперимента производили забор периферической крови натошак, под золетилловым наркозом (5 мг/100 г, Virbac Sante Animale, Франция)

Таблица 1. Показатели поведения крыс Вистар при тестировании в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) и уровень кортикостерона, позволяющие разделить популяцию стрессированных животных на низкотрещовных и высокотрещовных, Ме (25%; 75%)

Показатели	Группы		
	Контроль	Низкотрещовные	Высокотрещовные
Число заходов в закрытые рукава ПКЛ	7.3 (4.1; 10.5)	6.8 (3.5; 10.3)	4.3*# (2.2; 7.3)
Число заходов в открытые рукава ПКЛ	4.6 (2.2; 6.5)	3.7 (2.3; 5.6)	1.9*# (1.1; 3.5)
Время в закрытых рукавах ПКЛ, с	439.1 (398.3; 547.3)	468.3 (419.9; 561.3)	577.8*# (556.7; 608.5)
Время в открытых рукавах ПКЛ, с	156.2 (26.7; 318.8)	110.5 (52.4; 297.5)	21.2*# (5.5; 38.7)
Индекс трещовности, усл. ед.	0.65 (0.47; 0.76)	0.71 (0.53; 0.76)	0.88*# (0.81; 0.98)
Уровень кортикостерона, нмоль/л	368.6 (304.6; 416.9)	281.4* (207.1; 372.9)	169.6*# (141.6; 199.3)

Примечание: * $p < 0.05$ – достоверность отличий от группы контроля, # $p < 0.05$ – достоверность отличий между группами низкотрещовных и высокотрещовных крыс по U-критерию Манна–Уитни.

в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 3000 г в течение 10 мин. В плазме крови определяли уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), а также уровень глюкозы, триглицеридов и общего холестерина, используя автоматический биохимический анализатор (СХ4/Pro, BeckmanCoulter, США).

При вскрытии крыс оценивали состояние печени макроскопически, визуальнo оценивая: цвет, объем, консистенцию, эластичность при захвате пинцетом. Относительную массу рассчитывали как отношение абсолютной массы печени (АМП) к массе тела (МТ) и выражали в мг/кг массы тела животного $\frac{АМП}{МТ}$ мг/кг.

Для морфометрического анализа брали образцы печени, часть которых фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, другую часть кусочков печени без фиксации резали на криостате, срезы окрашивали суданом III для выявления нейтральных жиров. После фиксации образцы печени обезвоживали, заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Часть срезов окрашивали гематоксилином и эозином, другую часть срезов подвергали PAS-реакции для выявления гликогена. При помощи микроскопа Axioplan 2 imaging с цифровой фотокамерой и системой обработки изображений (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия) производили по 10 фотографий окрашенных срезов каждого животного. Оптическую плотность срезов, окрашенных суданом III и после PAS-реакции, определяли, используя программу ImageJ (Fiji).

Концентрацию кортикостерона в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора регентов (IBL, Германия).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Характер распре-

деления признаков оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Было установлено, что эмпирическое распределение полученных нами данных отличается от нормального. Для статистической обработки использовали непараметрический метод Краскела–Уоллиса и метод парных сравнений – U-критерий Манна–Уитни. Производили расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Данные приводили в виде медианы и квартилей Ме (25%; 75%). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки морфофункционального состояния печени у различных фенотипов крыс Вистар мы применяли предаторный стресс. Дизайн эксперимента изображен на рис. 1. За сутки до окончания эксперимента производили тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) (табл. 1), на следующие сутки, на фоне пищевой депривации, крыс выводили из эксперимента передозировкой золетила.

Было установлено, что показатели тестирования в ПКЛ опытной группы крыс различались, а именно: у части животных (Группа 1 – 9 крыс) показатели не отличались от таковых контрольной группы крыс (табл. 1), тогда как показатели другой группы крыс (Группа 2 – 11 крыс) имели статистически значимые отличия, как от контроля, так и от Группы 1. Оказалось, что крысы Группы 1 проводили на 71.8% больше времени в открытых рукавах ПКЛ, чем крысы Группы 2 (табл. 1). Значения индекса трещовности (ИТ) крыс группы 2 составляли 0.88, что превышало ИТ контрольных крыс на 29.4% и на 17.3% – крыс группы 1 (табл. 1).

Концентрация плазменного кортикостерона (КОРТ) у крыс 1-й и 2-й групп была ниже, чем в контрольной группе (табл. 1). Тем не менее концентрация КОРТ в плазме крыс Группы 1 была на

Таблица 2. Биохимические показатели крови и относительная масса печени низкотревожных и высокотревожных крыс Вистар при моделировании посттравматического стрессового расстройства, Ме (25%; 75%)

Показатели	Группы		
	Контроль	Низкотревожные	Высокотревожные
Относительная масса печени, мг/кг	0.031 (0.028; 0.034)	0.038* (0.035; 0.041)	0.046*# (0.042; 0.048)
Аспаратаминотрансфераза, ммоль/л	75.3 (66.7; 85.3)	80.7 (66.7; 95.3)	96.4*# (80.3; 113.2)
Аланинаминотрансфераза, ммоль/л	46.8 (38.7; 53.7)	43.3 (34.4; 51.3)	54.6*# (49.3; 59.5)
Общий холестерин, моль/л	3.5 (3.1; 3.9)	3.9 (3.3; 4.3)	4.7*# (2.7; 5.3)
Триглицериды (ТРГ), моль/л	0.79 (0.63; 0.89)	1.17* (0.89; 1.42)	2.85*# (2.12; 3.83)
Глюкоза (Гл) ммоль/л	5.9 (5.3; 6.1)	5.6 (5.2; 6.1)	4.9*# (4.7; 5.2)
Гл/ТРГ, усл. ед.	7.6 (7.2; 8.9)	5.1* (4.2; 6.2)	1.9*# (1.4; 2.3)

Примечание: * $p < 0.05$ – достоверность отличий от группы контроля, # $p < 0.05$ – достоверность отличий между группами низкотревожных и высокотревожных крыс по U-критерию Манна–Уитни.

24.8%, а у Группы 2 – на 63.7% ниже, чем у контрольных крыс (табл. 1).

В течение экспериментального периода ни у одной из крыс не наблюдалось видимых признаков болезни. В конце эксперимента (через 25 дней от начала эксперимента) масса тела крыс всех групп не имела статистически значимых различий ($p \geq 0.05$). В то же время расчет отношения абсолютной массы

печени (АМП мг) к массе тела (МТ кг) $\frac{\text{АМП}}{\text{МТ}}$ мг/кг показал заметно более высокие значения в группе высокотревожных крыс по сравнению с контролем и низкотревожными животными (табл. 2). Макроскопически печень высокотревожных крыс отличалась от контроля и низкотревожных животных – она была увеличена в объеме, имела рыхлую консистенцию, легко повреждалась при захвате пинцетом, имела тусклый, серовато-коричневый цвет. Все указанные признаки являются проявлениями диффузных изменений в печени высокотревожных особей. Тогда как печень низкотревожных животных не отличалась по объему, цвету и консистенции от контроля.

Многие заболевания печени сопровождаются нарушением целостности гепатоцитов, при этом высвобождаются в кровь такие внутриклеточные ферменты, как аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспаратаминотрансфераза (АСТ), поэтому их концентрация в крови возрастает. Определение концентрации АЛТ и АСТ используется в первую очередь для ранней диагностики функциональных нарушений печени [16].

Плазменная концентрация АЛТ у низкотревожных крыс не отличалась от контрольного уровня, тогда как концентрация АЛТ у высокотревожных животных была на 16.7% выше, чем в контроле (табл. 2). Плазменная концентрация АСТ низкотревожных крыс также не отличалась от контрольного уровня, тогда как концентрация АСТ высоко-

тревожных особей была на 28.1% выше, чем в контроле (табл. 2). В то же время относительная масса печени – $\frac{\text{АМП}}{\text{МТ}}$ мг/кг оказалась повышенной как у низкотревожных крыс на 26.7%, так и у высокотревожных животных на 53.3% (табл. 2). Относительная масса печени высокотревожных крыс была на 21.1% выше, чем у низкотревожных крыс (табл. 2).

В связи с тем, что норма реакции АЛТ, АСТ и относительной массы печени характеризуется достаточно широким диапазоном, не позволяющим наверняка судить о развитии дисфункциональных изменений, было проведено гистологическое и гистохимическое исследование печени [17].

При морфологическом исследовании печени крыс контрольной и опытных групп установлено, что общий план строения у всех животных был одинаковым и соответствовал возрастной группе. При окраске срезов печени гематоксилином и эозином хорошо видно, что гепатоциты контрольной крысы (рис. 2а) имеют темный фон, характеризующий плотное заполнение клеток гликогеном. В то же время, гепатоциты низкотревожных крыс (рис. 2б) и, особенно, высокотревожных животных (рис. 2с), имеют более светлый фон, свидетельствующий о гистологических признаках снижения запасов гликогена (рис. 2).

Также хорошо заметно, что в гепатоцитах низкотревожных крыс (рис. 2б) наблюдаются мелкие и средние вакуоли, а в гепатоцитах высокотревожных животных (рис. 2с) – средние и крупные вакуоли. Часть вакуолей обеих групп крыс заполнена прозрачной жидкостью, что является свидетельством развития гидропической (водяночной) дистрофии. На срезах печени высокотревожных крыс (рис. 2с) можно заметить баллонную дистрофию – заполнение отечной жидкостью почти всей цитоплазмы клетки. В последнем случае обычно наблюдаются некроз и гибель таких клеток [18]. Другая

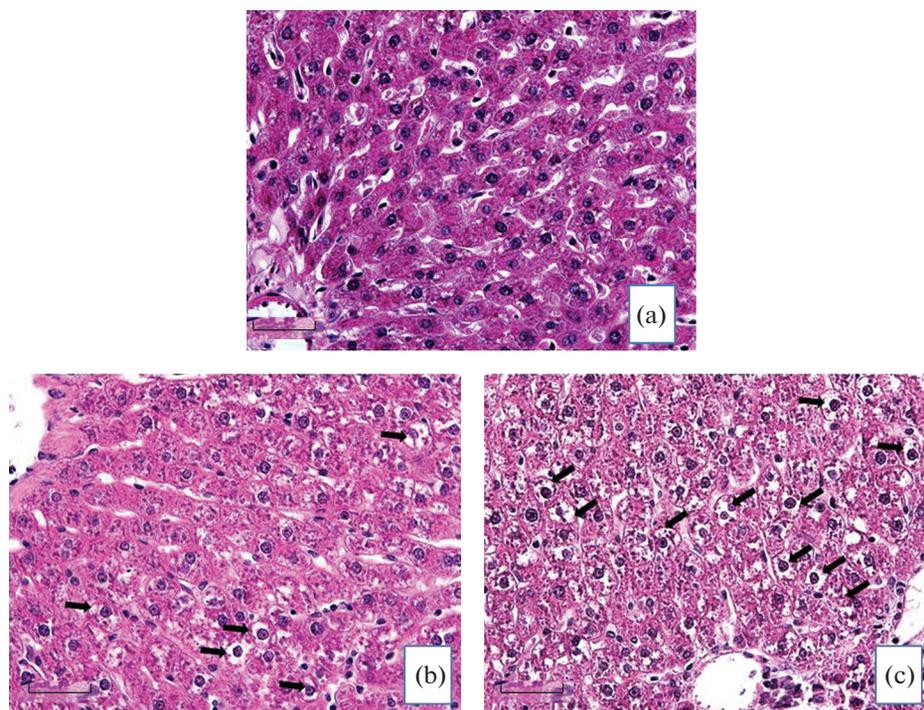


Рис. 2. Морфофункциональное состояние печени контрольных (а), низкотревожных (b) и высокотревожных (с) крыс Вистар при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) (гематоксилин и эозин, масштаб 50 мкм).

Стрелки указывают на дистрофически измененные клетки.

часть вакуолей гепатоцитов низкотревожных и высокотревожных крыс заполнена малопрозрачным веществом, имеющим гистологические признаки нейтральных жиров.

С целью доказательства наличия жировой дистрофии мы использовали традиционную окраску суданом III на нейтральные жиры [19]. Микроскопически в гепатоцитах низкотревожных крыс наблюдалась мелко- и среднекапельная жировая дистрофия, и лишь небольшая часть клеток содержала вакуоли, окрашенные в красный цвет суданом III, что свидетельствовало о наличии жиров. В то же время в гепатоцитах высокотревожных животных была обнаружена средне- и крупнокапельная жировая дистрофия, заметная во многих клетках. Тогда как гепатоциты контрольных крыс практически не содержали вакуолей, окрашенных в красный цвет суданом III, т.е. в норме накопление жиров в гепатоцитах происходит в очень небольших количествах и только в звездчатых клетках. Проведение измерений оптической плотности (ОП) окраски гепатоцитов суданом III на срезах печени позволило установить, что по сравнению с контролем значения ОП низкотревожных крыс были выше на 29.2% ($p = 0.004$), а значения ОП высокотревожных особей – на 120.3% ($p = 0.004$) (рис. 3). Обнаружена негативная корреляция значений ОП окраски суданом III со значениями

уровня КОРТ в крови у низкотревожных крыс $r_s = -0.979$ (коэффициент ранговой корреляции Спирмена, $p = 0.001$) и у высокотревожных особей $r_s = -0.955$ ($p = 0.001$).

При визуализации гликогена, используя традиционную PAS-реакцию [20], было установлено, что значения ОП срезов печени снижены у низкотревожных крыс на 25.5% ($p = 0.0003$) и на 32.1% ($p = 0.0001$) у высокотревожных животных по сравнению с контролем (рис. 3). Выявлена позитивная корреляция значений ОП гликогена со значениями уровня кортикостерона в крови у низкотревожных $r_s = 1$ (коэффициент ранговой корреляции Спирмена, $p = 0.0001$) и у высокотревожных крыс $r_s = 1$ ($p = 0.0001$). Следует отметить, что у всех групп крыс структура печени не нарушалась – сохранялось дольковое и пластинчатое строение, контуры клеток хорошо определялись. Это же было характерно и для высокотревожных крыс, несмотря на то, что во всех долях печени у них обнаружена массивная вакуольная дистрофия гепатоцитов.

Дистрофические изменения в печени сопровождались изменениями содержания и доминирования транспортных форм энергии в плазме крови, таких как глюкоза и липиды. При этом обнаруживалась разная реакция на предаторный стресс организма низкотревожных и высокотревожных крыс

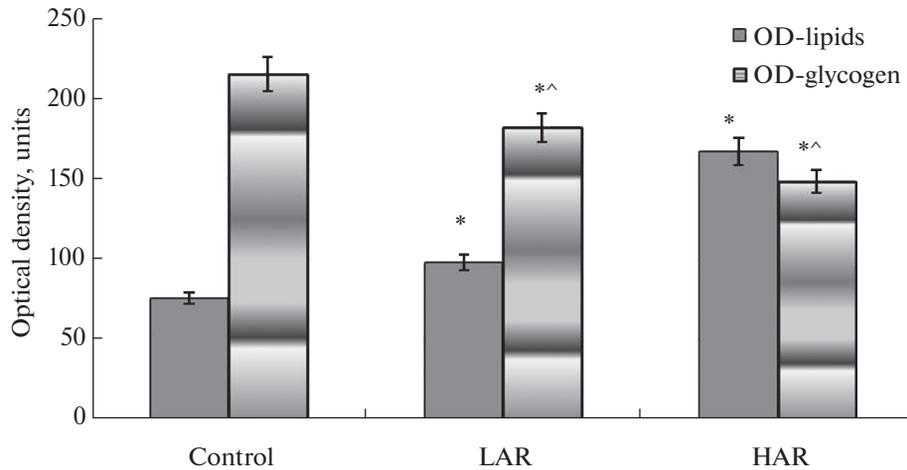


Рис. 3. Оптическая плотность окраски срезов печени на жиры и гликоген у низкотрещовных (LAR) и высокотрещовных (HAR) крыс Вистар при моделировании посттравматического стрессового расстройства.

OD – оптическая плотность, OD-lipids – ОП при визуализации нейтральных жиров суданом III; OD-glycogen – ОП при визуализации гликогена реакцией Шиффа.

* $p < 0.005$ отличие от контроля, ^ $p < 0.005$ различие между LAR (Группа 1) и HAR (Группа 2) фенотипами опытных крыс по U-критерию Манна–Уитни.

(табл. 2). Оказалось, что по сравнению с контролем уровень плазменной глюкозы снижался только у высокотрещовных на 15.4% и не отличался от контроля у низкотрещовных животных (табл. 2). Одновременно с этим плазменное содержание общего холестерина было повышено только у высокотрещовных крыс на 32.2%, тогда как у низкотрещовных особей не отличалось от контроля (табл. 2). В то же время по сравнению с контролем плазменный уровень триглицеридов оказался повышенным как у высокотрещовных на 62.3%, так и у низкотрещовных крыс на 32.4% (табл. 2). Отношение значений уровня глюкозы (Гл) к значениям уровня триглицеридов (ТРГ) – Гл/ТРГ снижалось у обеих стрессированных групп. По сравнению с контролем у низкотрещовных крыс Гл/ТРГ было ниже на 35.1%, тогда как у высокотрещовных животных – на 75.8% (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки состояния различных систем организма обычно используется метод функциональной нагрузки, позволяющий оценить диапазон компенсаторно-приспособительных реакций различных органов и систем. В данном исследовании при моделировании ПТСР был использован предаторный стресс (страх жертвы перед хищником) и валидная модель ПТСР [4]. Исследования, проводимые российскими и зарубежными авторами, доказывают значимость предаторного стресса для грызунов [21, 22]. В этих работах показано, что химическая коммуникация млекопитающих осуществляется с помощью обонятельных сигналов, в основном летучих компонентов различных экскре-

тов, кодирующих информацию о постоянных характеристиках особей – информацию, необходимую для сохранения жизни вида. Такие сигнальные вещества распространяются в воздушной среде и воспринимаются обонятельным анализатором, вомероназальной системой – периферическим отделом основной обонятельной системы, снабженным автономной иннервацией, многочисленными кровеносными сосудами, и высланный нейроэпителием [23]. Для большинства видов млекопитающих анализ запаховых раздражителей является определяющим в организации сложных форм поведения и регуляции гормонального ансамбля в организме. Воздействие запаха хищника настолько значительно для грызунов, что активизирует не только поведенческие рефлексy – бегство, тревожность и др., но и abortивную реакцию у беременных самок [23].

Тестирование крыс в приподнятом крестообразном лабиринте позволило нам разделить группу стрессированных крыс на высокотрещовных и низкотрещовных особей по индексу тревожности. Так же, как и в наших предыдущих экспериментах [4], крыс, имеющих значения ИТ выше 0.75, мы считали высокотрещовными, а менее 0.75 – низкотрещовными животными. Кроме поведенческих признаков развития ПТСР-подобного состояния, дополнительным признаком валидности модели служит снижение уровня плазменного кортикостерона [4]. Несмотря на то что снижение КОРТ наблюдалось у обоих фенотипов, у высокотрещовных крыс значения КОРТ оказались самыми низкими. Последнее предполагает наибольшие изменения в организме этой группы крыс.

Наше предположение подтвердилось уже при макроскопическом исследовании печени экспериментальных групп. Оказалось, что у высокотревожных крыс печень была увеличена в объеме, имела признаки развития воспалительной реакции (табл. 2, рис. 2). Подтверждением нарушения функционирования печени служили такие маркеры, как аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартаттрансаминаза (АСТ) [24], значения которых оказались повышенными только у высокотревожных крыс. Следует заметить, что большинство биохимических маркеров дисфункции печени имеет большой диапазон нормы реакции [17], в связи с этим более надежным способом диагностики является исследование морфофункционального состояния печени. Визуализацию нейтральных жиров производили с помощью специфической окраски суданом III [19]. Использование данного метода позволило диагностировать жировую дистрофию, ярко выраженную у высокотревожного фенотипа крыс, и лишь небольшое нарушение метаболизма жиров у низкотревожных особей. При этом повышение оптической плотности срезов, окрашенных суданом III, сопровождалось снижением уровня плазменного кортикостерона (негативная корреляция). Полученный нами результат подтверждает связь между КОРТ и метаболизмом нейтральных жиров в печени, однако другими исследователями такие результаты получены при повышении уровня КОРТ или введении КОРТ выше физиологических доз [25, 26]. Следовательно, можно констатировать, что механизмы, с помощью которых КОРТ может влиять на метаболизм липидов, до настоящего времени остаются малоизученными.

Применение специфической PAS-реакции на содержание гликогена в клетках печени [20], позволило установить резкое снижение содержания этого энергетического запаса у высокотревожного фенотипа крыс и гораздо менее выраженное – у низкотревожных животных. Снижение оптической плотности срезов с окраской на гликоген сопровождалось понижением уровня плазменного КОРТ (позитивная корреляция). Судя по сведениям литературы, кроме КОРТ, содержание гликогена зависит от уровней инсулина и катехоламинов, влияющих на уровни ферментов и метаболитов глюкозы и гликогена [27, 28]. Впервые в нашем эксперименте продемонстрировано, что у высокотревожных крыс дистрофические изменения распространяются на подавляющее большинство клеток печени, в которых почти не остается гликогена, визуализируются вакуоли, заполненные отечной жидкостью и жирами. Выявленные изменения отражают серьезные нарушения метаболического баланса печени, расстройство механизмов, обеспечивающих регуляцию углеводно-жирового, водно-электролитного и белкового обмена, свидетельствующие о донозологическом состоянии органа у высокотревожного фенотипа крыс. В то же время у

низкотревожных особей указанные дистрофические изменения выражены лишь в части клеток. В дальнейших экспериментах следует определить возможность самопроизвольного восстановления морфофункционального состояния печени у этого фенотипа животных, для чего следует продлить постстрессорный период.

Уместно напомнить, что печень является центром многих физиологических процессов. Важнейшей функцией печени является способность накапливать вещества, служащие источником энергии не только для местных нужд, но и для всего организма. К числу основных источников энергии относится поступающая с пищей глюкоза, которая запасается в печени в форме гликогена (гликогеногенез), а при потребности организма в энергии происходит обратный процесс – превращение гликогена в глюкозу (гликогенолиз) [29]. Несмотря на то что в физиологических условиях в печени происходит синтез, секреция и окисление липидов, накопление липидов в основном происходит не в печени, а в жировой ткани. Липиды более чем в два раза более энергоемки, чем глюкоза. Тем не менее биоэнергия, заключенная в липидах, начинает расходоваться только в экстренных случаях, тогда как энергетические ресурсы гликогена гораздо более доступны и мобилизуются за считанные секунды [30]. Показана взаимосвязь уровня глюкозы с КОРТ, однако механизмы такой связи еще предстоит выяснить [31]. В нашем исследовании, при моделировании ПТСР, дистрофические перестройки морфофункционального состояния печени сопровождались изменениями плазменной концентрации и доминирования основных транспортных форм энергии, таких как общий холестерин (ОХ), триацилглицерины (ТРГ) и глюкоза (Гл). Судя по снижению значений отношения Гл/ТРГ и повышению показателей ОХ и ТРГ, можно заключить, что предаторный стресс обусловил смену доминирования основного источника транспортной формы энергии в норме – глюкозы, на липидный. У высокотревожных крыс смена энергии была особенно ярко выражена. Причина изменения доминирования транспортной формы энергии вероятнее всего заключается в стресс-индуцированной дисфункции печени, которая является основным органом, выполняющим фундаментальную роль в регулировании углеводного, липидного и белкового обмена, а также принимает участие во многих других процессах, направленных на поддержание гомеостаза всего организма животных и человека. Преобладание мобилизации свободных жирных кислот, как источника энергии, обычно наблюдается в пожилом возрасте, а также при действии экстремальных факторов [32].

Если экстраполировать на человека состояние ПТСР с выраженной дисфункцией печени, охарактеризованное у высокотревожного фенотипа крыс в нашем эксперименте, то можно заключить,

что оно является серьезным фактором риска развития атеросклероза, нарушений работы сердца и центральной нервной системы, отмечаемых в работах других исследователей [33, 34]. Кроме того, достаточно давно известно, что практически все функциональные нарушения печени и заболевания этого органа могут являться причиной различных неврологических и психоневрологических патологий, от минимальных изменений церебральной функции до когнитивной дисфункции и, даже, отека мозга [27]. Все вышеизложенное указывает на то, что последствия нарушения морфофункционального состояния печени при ПТСР могут способствовать хронизации и усугублению заболеваний, выполняя роль ключевого звена сформированного порочного круга: нейрогормональные нарушения ↔ дисфункция печени, индуцированного сильным психоэмоциональным стрессом.

Таким образом, морфофункциональные исследования печени, в большей мере, чем биохимические результаты данной серии исследований, позволяют сделать заключение о том, что у всех подопытных крыс, как с высокотревожным, так и с низкотревожным фенотипом, предаторный стресс индуцирует дисфункцию печени. В свою очередь, это может свидетельствовать о снижении диапазона компенсаторно-приспособительных реакций у этих животных. Тем не менее в работе удалось установить связь поведенческих изменений с выраженностью трансформаций морфофункционального состояния печени. Глубина морфофункциональных нарушений комплекса функциональных механизмов, обеспечивающих углеводно-жировую, водно-электролитный и белковый обмен в печени крыс с высокотревожным фенотипом, свидетельствует о донозологическом состоянии органа. В случае предъявления дополнительных нагрузок могут возникнуть срыв гомеостатических систем и развитие заболеваний. Тогда как печень животных с низкотревожным фенотипом характеризовалась лишь небольшими диффузными изменениями. Полученные сведения о нарушении функции печени у стрессированных крыс могут быть полезны в клинической практике. После стрессирования следует выполнить диагностические тесты, доступные для определения степени дисфункции печени, и провести соответствующее лечение. Коррекция функциональной активности будет способствовать повышению функциональных возможностей печени и разрыву порочного круга патологического процесса.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания “НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына”, ФГБНУ “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, НИОКТР № 122030200535-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В.К. осуществляла планирование, сбор данных, написание статьи. К.А.А., В.В.А., М.А.К. и Л.А.М. осуществляли техническую поддержку при проведении экспериментов, участвовали в обработке и обсуждении экспериментальных данных, Д.А.А. участвовал в редактировании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vindegaard N, Benros ME* (2020) COVID-19 pandemic and mental health consequences: Systematic review of the current evidence. *Brain Behav Immun* 89: 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.048>
2. *Сомова ЛМ, Коцюрбий ЕА, Дробот ЕИ, Ляпун ИН, Щелканов МЮ* (2021) Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Клин эксп морфология* 10 (1): 11–20. [*Somova LM, Kotsyurbiy EA, Drobot EI, Lyapun IN, Shchelkanov MYu* (2021) Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). *Clin Exp Morphology* 10 (1): 11–20. (In Russ)] . <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.1.11-20>
3. *Hadad NA, Schwendt M, Knackstedt LA* (2020) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in post-traumatic stress disorder and cocaine use disorder. *Stress* 23 (6): 638–650. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1803824>
4. *Tseilikman V, Komelkova M, Lapshin M, Alliluev A, Tseilikman O, Karpenko M, Pestereva N, Manukhina E, Downey HF, Kondashevskaya M, Sarapultsev A, Dremencov E* (2020) High and low anxiety phenotypes in a rat model of complex post-traumatic stress disorder are associated with different alterations in regional brain monoamine neurotransmission. *Psychoneuroendocrinology*. 117: 104691. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.10469>
5. *Morris MC, Hellman N, Abelson JL, Rao U* (2016) Cortisol, heart rate, and blood pressure as early markers of PTSD risk: A systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev* 49: 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2016.09.001>
6. *Morris MC, Compas BE, Garber J* (2012) Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev* 32 (4): 301–315. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2012.02.002>
7. *Javidi H, Yadollahie M* (2012) Post-traumatic Stress Disorder. *Int J Occup Environ Med* 3 (1): 2–9.
8. *Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, Milad MR, Liberzon I* (2012) Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci* 13 (11): 769–787. <https://doi.org/10.1038/nrn3339>

9. Forte G, Favieri F, Tambelli R, Casagrande M (2020) COVID-19 Pandemic in the Italian Population: Validation of a Post-Traumatic Stress Disorder Questionnaire and Prevalence of PTSD Symptomatology. *Int J Environ Res Public Health* 17 (11): 4151. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114151>
10. Cohen H, Zohar J (2004) An animal model of posttraumatic stress disorder: The use of cut-off behavioral criteria. *Ann NY Acad Sci* 1032: 167–178. <https://doi.org/10.1196/annals.1314.014>
11. Tseilikman V, Dremencov E, Maslennikova E, Ishmatova A, Manukhina E, Downey HF, Klebanov I, Tseilikman O, Komelkova M, Lapshin MS, Vasilyeva MV, Bornstein SR, Perry SW, Wong ML, Licinio J, Yehuda R, Ullmann E (2019) Post-Traumatic Stress Disorder Chronification via Monoaminoxidase and Cortisol Metabolism. *Horm Metab Res* 51 (9): 618–622. <https://doi.org/10.1055/a-0975-9268>
12. Рыбникова ЕА, Миронова ВИ, Пивина СГ (2010) Тест для выявления нарушений саморегуляции гипофизарно-адренокортикальной системы. Журнал высшей нервной деятельности им ИП Павлова 60 (4): 500–506. [Rybnikova EA, Mironova VI, Pivina SG (2010) Test for the detection of disorders of self-regulation of the pituitary-adrenocortical system. *Journal of Higher Nervous Activity IP Pavlova* 60 (4): 500–506. (In Russ.)].
13. Boero G, Pisu MG, Biggio F, Muredda L, Carta G, Banni S, Paci E, Follsea P, Concas A, Porcu P, Serra M (2018) Impaired glucocorticoid-mediated HPA axis negative feedback induced by juvenile social isolation in male rats. *Neuropharmacology* 133 (1): 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.045>
14. Кондашевская МВ, Комелькова МВ, Цейликман ВЭ, Цейликман ОБ, Артемьева КА, Александркина ВВ, Болтовская МН, Сарапульцев АП, Черешнева МВ, Черешнев ВА (2021) Новые нейробиологические критерии профиля устойчивости при моделировании посттравматического стрессового расстройства. Доклады Российской академии наук 501 (6): 28–33. [Kondashevskaya MV, Komelkova MV, Tseilikman VE, Tseilikman OB, Artemyeva KA, Aleksankina VV, Boltovskaya MN, Sarapultsev AP, Chereshneva MV, Chereshnev VA (2021) New neurobiological criteria for the resilience profile in modeling post-traumatic stress disorder. *Reports of the Russian Academy of Sciences* 501 (6): 28–33. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S2686738921060056>
15. Cohen H, Matar MA, Buskila D, Kaplan Z, Zohar J (2008) Early post-stressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 64: 708–717. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.025>
16. von Känel R, Abbas CC, Bégre S, Gander ML, Saner H, Schmid JP (2010) Association between posttraumatic stress disorder following myocardial infarction and liver enzyme levels: a prospective study. *Dig Dis Sci* 55 (9): 2614–2623. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-1082-z>
17. He Q, Su G, Liu K, Zhang F, Jiang Y, Gao J, Liu L, Jiang Z, Jin M, Xie H (2017) Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. *PLoS One* 12 (12): e0189837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189837>
18. Березов ЮЕ, Полсачев ВИ, Ковалев АИ (1980) Изменения биохимических показателей функции печени при раке желудка и пищевода. *Вопр Онкол* 26(12):15–18. [Berezov IuE, Polsachev VI, Kovalev AI (1980) Changes in the biochemical indices of liver function in stomach and esophageal cancer. *Vopr Onkol* 26 (12): 15–18. (In Russ)].
19. Ju J, Huang Q, Sun J, Jin Y, Ma W, Song X, Sun H, Wang W (2018) Correlation between PPAR- α methylation level in peripheral blood and inflammatory factors of NAFLD patients with DM. *Exp Ther Med* 15 (2): 1474–1478. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5530>
20. Ravikumar SS, Menaka TR, Vasupradha G, Dhivya K, Dinakaran J, Saranya V (2019) Cytological intracellular glycogen evaluation using PAS and PAS-D stains to correlate plasma glucose in diabetics. *Indian J Dent Res* 30 (5): 703–707. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_815_18
21. Voznessenskaya VV, Malanina TV (2013) Effect of chemical signals from a predator (*Felis catus*) on the reproduction of *Mus musculus*. *Dokl Biol Sci* 453: 362–364. <https://doi.org/10.1134/S0012496613060057>
22. Apfelbach R, Parsons MH, Soini HA, Novotny MV. (2015) Are single odorous components of a predator sufficient to elicit defensive behaviors in prey species? *Front Neurosci* 9: 263. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00263>
23. Voznessenskaya VV, Kyuchnikova MA, Wysocki CJ (2010) Roles of the main olfactory and vomeronasal systems in detection of androstenone in inbred strains of mice. *Current Zool* 56 (6): 813–818.
24. He XR, Lin QC, Chen Q (2017) Effects of Prescription Yiqi Huatan Quyu on oxidative stress level and pathological changes in chronic intermittent hypoxia rat liver. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 97(6):457–461. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.06.012>
25. Wu T, Jiang J, Yang L, Li H, Zhang W, Chen Y, Zhao B, Kong B, Lu P, Zhao Z, Zhu J, Fu Z (2017) Timing of glucocorticoid administration determines severity of lipid metabolism and behavioral effects in rats. *Chronobiol Int* 34 (1): 78–92. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1238831>
26. Butler MW, Armour EM, Minnick JA, Rossi ML, Schock SF, Berger SE, Hines JK (2019) Effects of stress-induced increases of corticosterone on circulating triglyceride levels, biliverdin concentration, and heme oxygenase expression. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 240: 110608. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110608>
27. Morakinyo AO, Samuel TA, Awobajo FO, Adekunbi DA, Olatunji IO, Binibor FU, Oni AF (2019) Adverse effects of noise stress on glucose homeostasis and insulin resistance in Sprague-Dawley rats. *Heliyon* 5 (12): e03004. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03004>
28. Dasgupta R, Saha I, Ray PP, Maity A, Pradhan D, Sarkar HP, Maiti BR (2020) Arecoline plays dual role on adrenal function and glucose-glycogen homeostasis under thermal stress in mice. *Arch Physiol Biochem* 126 (3): 214–224. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1508238>

29. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH (2016) Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48 (3): e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
30. Rui L (2014) Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 4 (1): 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
31. Conoscenti MA, Williams NM, Turcotte LP, Minor TR, Fanselow MS (2019) Post-Stress Fructose and Glucose Ingestion Exhibit Dissociable Behavioral and Physiological Effects. *Nutrients* 11 (2): 361. <https://doi.org/10.3390/nu11020361>
32. Won BY, Park SG, Lee SH, Kim MJ, Chun H, Hong D, Kim YS (2020) Characteristics of metabolic factors related to arterial stiffness in young and old adults. *Clin Exp Hypertens* 42 (3): 225–232. <https://doi.org/10.1080/10641963.2019.1619754>
33. von Känel R, Abbas CC, Bègré S, Gander ML, Saner H, Schmid JP (2010) Association between posttraumatic stress disorder following myocardial infarction and liver enzyme levels: a prospective study. *Dig Dis Sci* 55 (9): 2614–2623. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-1082-z>
34. Mesarwi OA, Loomba R, Malhotra A (2019) Obstructive Sleep Apnea, Hypoxia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 199 (7): 830–841. <https://doi.org/10.1164/rccm.201806-1109TR>

Phenotypically Determined Dysfunction of Liver Wistar Rats in Modeling of Post-traumatic Stress Disorder

M. V. Kondashevskaya^{a,#}, K. A. Artem'yeva^a, V. V. Aleksankina^a,
D. A. Areshidze, M. A. Kozlova^a, and L. A. Makartseva^a

^a A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

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

The extraordinary situation of the 2019–2022 pandemic caused an acute jump in the incidence of post-traumatic stress disorder (PTSD). PTSD is currently regarded not only as a neuropsychiatric disorder, but also as a comorbid disease, accompanied by diseases of the cardiovascular system, circulatory disorders, liver pathology, etc. At the same time, the morphofunctional state of the liver of individuals of animal units which are resistant or unstable to the development of PTSD has not been fully studied. In this study, PTSD was modeled on mature male Wistar rats using predatory stress (an evolutionarily fixed fear of a prey in front of a predator). To date, the relationship between behavioral changes and the severity of the transformation of the morphofunctional state of the liver has not yet been clarified. Elevated plus maze testing made it possible to separate the population into animals with low anxiety (LAPH) and high anxiety (HAPH) phenotypes. It has been established that morphological and functional studies of the liver, to a greater extent than biochemical results, allow us to conclude that in rats of both phenotypes, predatory stress induces liver dysfunction. This may indicate a decrease in the range of compensatory-adaptive reactions in stressed animals. Nevertheless, the depth of morphological and functional disorders of the complex of functional mechanisms that provide carbohydrate-fat, water-electrolyte and protein metabolism in the liver of HAPH rats indicates the prenosological state of the organ. In the case of additional loads, the tension of the regulatory systems of the liver can lead to a violation of homeostasis. Wherein the liver of LAPH animals was characterized by only small diffuse changes. Therefore, in this work, it became possible to establish a relationship between behavioral changes and the severity of the transformation in the morphofunctional state of the liver.

Keywords: Wistar rats, post-traumatic stress disorder, liver dysfunction, High-anxious rats

ГЕНЫ γ М-КРИСТАЛЛИНОВ В ХРУСТАЛИКЕ МОЛОДЫХ *Cyprinus carpio*: УРОВНИ ТРАНСКРИПЦИИ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

© 2022 г. А. И. Капитунова¹, И. Н. Домина¹, В. В. Жуков^{1,*}

¹ Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта Калининград, Россия

*e-mail: valerzhukov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Основной целью работы была оценка уровня транскрипции генов γ М-кристаллинов в хрусталике глаза *Cyprinus carpio*. Для этого методом количественной ПЦР-РВ зафиксирована транскрипция и измерен ее относительный уровень у 5 генов γ М-кристаллинов и кристаллин-подобных белков карпов в возрасте 4, 10 и 14 мес. Для всех возрастных групп установлена специфичность транскрипции в хрусталиках генов *Gcm1*, *Gcm1l*, *Gcm2l*, *Crygm6*. Транскрипция гена *Gcm2l2* кроме хрусталика обнаружена также в мышцах, печени и мозге. Анализ значимости аминокислотной последовательности выявленных γ М-кристаллинов для формирования преломляющих свойств хрусталика выполнен на основе рассчитанных для них величин инкремента показателя преломления. Предполагается, что высокие значения показателя преломления хрусталика определяются не столько относительным содержанием аминокислот в γ М-кристаллинах, сколько их последовательностями, обеспечивающими плотность укладки третичной пространственной структуры этих белков, а также концентрацией этих белков.

Для установления консервативных доменов и эволюционных отношений между γ М-кристаллинами рыб разных таксонов было выполнено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей и построено филогенетическое дерево методом ближайших соседей. Высокий уровень гомологии, наличие 26 консервативных участков и филогенетическая близость сравниваемых белков у группы костистых рыб могут свидетельствовать об эволюционном закреплении их структуры и важной роли в определении специфических свойств хрусталиков у *Teleostei*.

Ключевые слова: *Cyprinus carpio*, хрусталик, γ М-кристаллины, тканеспецифичность, консервативные белковые домены

DOI: 10.31857/S0044452922040052

Особенности зрения в водной среде находят свое отражение в строении и свойствах оптического аппарата глаза гидробионтов, которые наиболее изучены у рыб [1, 2]. Низкая преломляющая эффективность их роговицы в воде компенсируется большой преломляющей силой твердого сферического хрусталика. Коэффициент рефракции его центральной области превышает таковой у наземных позвоночных животных [3]. Высокое значение радиального градиента показателя преломления хрусталика рыб позволяет уменьшить влияние сферической аберрации на качество изображения, формируемого оптическим аппаратом глаза на сетчатке [4]. Очевидно, что указанные особенности хрусталика во многом связаны с химическим составом и способом упаковки его компонентов. Нахождение генов специфических белков хрусталика рыб и оценка уровня их транскрипционной активности должны повысить эффективность функциональных исследований этой структуры. В настоящее время считается, что количественно доминирующее

положение среди белков хрусталика рыб занимают кристаллины семейства γ , среди которых преобладают γ М-кристаллины [5]. Так, в хрусталиках взрослых особей *Danio rerio* среди 52 идентифицированных кристаллинов доминирующее положение по своему числу (35) и количественному содержанию (47.2%) занимают именно γ -кристаллины [6]. Из этого семейства белков наиболее многочисленны γ М-кристаллины, представленные 29 видами молекул. И, хотя из этого числа лишь 16 представляют точно установленные формы γ М-кристаллинов, общее содержание белков этого семейства в хрусталике *D. rerio* достаточно велико и составляет 30.2% от всего протеома [7]. У антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* из 22 кристаллинов хрусталика 14 относятся к семейству γ , из них 11 – γ М-кристаллины [8], которые, таким образом, составляют около 47.6% от общего числа видов кристаллинов этой структуры глаза. В хрусталике карпа *Cyprinus carpio* γ -кристаллины в целом составляют около 52% всех кристаллинов [9]. Од-

нако сведения о составе этой группы белков и, в частности, о присутствии в ней γ М-кристаллинов пока отсутствуют. Это обстоятельство представляется существенным пробелом, особенно с учетом той важной роли в формировании оптических свойств хрусталиков гидробионтов, которая, как предполагается, принадлежит этим белкам [10].

Сопоставление известных последовательностей аминокислот кристаллинов указывает на то, что γ М-кристаллины рыб образуют отдельную группу, которая отличается от γ -кристаллинов млекопитающих отсутствием консервативных пар триптофана в N-концевом домене и повышенным содержанием метионина [11, 12]. Последнее обстоятельство может способствовать стабильности структуры белка, а также опосредовать межмолекулярные взаимодействия, повышающие его растворимость и плотность упаковки в хрусталике [10]. Присутствие метионина также, вероятно, обеспечивает высокое значение показателя преломления γ -кристаллинов [13]. Все же остается неясным, насколько γ М-кристаллины специфичны для хрусталиков рыб или же они подобно другим кристаллинам могут синтезироваться клетками разных тканей организма. Мы подошли к рассмотрению этого вопроса с позиции оценки транскрипции генов γ М-кристаллинов у *S. carpio*. Основной целью работы стала идентификация генов γ М-кристаллинов, специфически экспрессирующихся в хрусталике карпа, а также оценка относительного уровня их транскрипции с целью последующего использования в качестве маркеров структурного и функционального онтогенеза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Объектом исследования являлись образцы тканей (хрусталики, мозг, печень и мышцы) самцов и самок *Syrpinus carpio* Парской породы в возрасте 4, 10 и 14 мес, выращенных в учебно-опытном рыболовном хозяйстве ФГБОУ ВО «КГТУ» (г. Калининград). Предоперационная анестезия рыб с последующим выделением хрусталиков, а также фрагментов мозга, мышц и печени производилась на льду. Выделенные образцы хранили при -80°C . В каждой возрастной группе образцы тканей брали от 10 особей. Поскольку точное установление пола карпа возможно только после наступления половой зрелости, начиная с 2-х лет, этот фактор не учитывался.

Все процедуры, проводившиеся с участием животных, соответствовали этическим нормам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии БФУ им. И. Канта.

Дизайн праймеров

Дизайн специфических праймеров осуществлялся с помощью программного обеспечения (ПО) NCBI Primer-BLAST на основании данных о геноме *Syrpinus carpio* в базе NCBI. Полученные праймеры анализировались и оценивались с помощью программного обеспечения (ПО) IDT OligoAnalyzer Tool и ПО Nucleotide BLAST, с учетом следующих показателей:

- 1) температура отжига forward и reverse праймеров: $53\text{--}63^{\circ}\text{C}$;
- 2) содержание GC в последовательности праймеров – 50%;
- 3) длина праймера: 17–25 нуклеотидов;
- 4) размер ампликона: 100–300 пар оснований;
- 5) комплементарность исследуемой последовательности – только одной последовательности из кДНК исследуемого вида;
- 6) способность формировать шпильки (hair-pins) – ΔG (энергия Гиббса) 3'-конца больше – 2 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше – 3 ккал/моль;
- 7) способность формировать димеры с таким же праймером (self-dimer) – ΔG 3'-конца больше – 5 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше – 6 ккал/моль;
- 8) способность формировать димеры с другим праймером (hetero-dimer) – ΔG 3'-конца больше – 5 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше – 6 ккал/моль.

Все пары праймеров были подобраны таким образом, чтобы области отжига на кДНК находились на стыках соседних экзонов [14].

Последовательности подобранных праймеров представлены в табл. 1.

Оптимизация ПЦР

Для установления параметров проведения ПЦР-РВ была проведена оптимизация, которая включала в себя подбор температур отжига праймеров, а также подбор концентраций кДНК. Данная процедура необходима для увеличения эффективности и специфичности ПЦР. Выбор необходимых параметров осуществлялся посредством проведения ПЦР-РВ с градиентами температур и концентраций до получения одного единственного пика.

Оптимизацию производили посредством постановки ПЦР-РВ на градиент температур отжига с постепенным снижением температуры в пределах от 63 до 58°C . Выбор температурного диапазона определяется предсказанной температурой плавления (T_m) праймеров: температура отжига (T_a) праймера должна быть на $2\text{--}4^{\circ}\text{C}$ ниже, чем T_m . При этом необходимо иметь в виду, что отжиг праймеров при наименьших температурах гради-

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для анализа уровней транскрипции генов γ М-кристаллина *Cyprinus carpio*

Ген	Номер NCBI	Primer sequences (5'-3')	Длина ампликона (п.о.)	Температура отжига, °С	Эффективность (%)
18S ribosomal RNA gene	JQ619778.1	F – GGCGGCGTTATTCCCATGAC R - GTGGTGCCCTTCCGTCAT	116	61.0	74.4
gamma-crystallin M1 (<i>LOC109097131</i>)	XM_019110801.2	F – ACAGCTGGTACAGTGAGCTG R - TCTGTAGGAACCCCTGTATGGA	329	59.7	79.0
gamma-crystallin M1-like (<i>LOC109087991</i>)	XM_019102168.2	F – ATACCTGAGCCGCGTTGGTT R - TGTAGGACCCCTGTATGGAG	194	61.0	84.2
gamma-crystallin M2-like (<i>LOC109112458</i>)	XM_019125381.1	F – CGACTGTGCCGATTTCTCCT R - GTCACAGTCATCGGTCAATTCG	271	60.0	79.8
gamma-crystallin M2-like (<i>LOC109049519</i>)	XM_019067197.1	F – GTCAGCCAACAAGCAGAATCA R - TGTCTCATAAAAGGTGACCCTC	94	59.5	88.6
gamma M6 (<i>Crygm6</i>)	XM_019110804.1	F – GCCGGATGATCCCTATGTATACTG R - GAGGGATCCGATTCTTGGGG	269	60.0	73.0

ента может обуславливать их неспецифичное связывание с матрицей.

Среднюю эффективность амплификации генов оценивали по относительным количественным ПЦР со стандартной кривой пяти последовательных 10-кратных разведений кДНК (в диапазоне от 1 нг до 1 пг) для измерения значения C_q . Эффективность амплификации рассчитывалась по формуле: $E = 10^{(1/\text{наклон})}$. Для всех генов значения эффективности амплификации варьировали от 73.0 до 89.0%.

После проведения ПЦР со всеми праймерами продукты амплификации анализировали с помощью гель-электрофореза в агарозном геле. Для чего использовали 1.5%-ный агарозный гель с добавлением бромистого этидия в качестве интеркалирующего красителя для визуализации двухцепочечных молекул ДНК и маркера длин ДНК “100+ DNA Ladder” (Евроген), а также 1x Трис-ацетатного-ЭДТА буфера (ТАЕ; рН = 7.6) – в качестве буфера для проведения электрофореза. Напряжение источника питания PowerPac Basic (Bio-Rad) было установлено 140 В, сила тока – 400 мА, продолжительность – 30 мин. Визуализация полученных данных проводилась с помощью системы гель-документирования Gel Doc EZ (Bio-Rad). На основании полученных электрофореграмм были выбраны оптимальные значения температуры для работы каждого праймера (рис. 1).

Анализ уровней транскрипций генов

Выделение РНК исследуемых образцов проводили с помощью реагента ExtractRNA (Евроген), следуя инструкции производителя с дополнитель-

ной обработкой ДНКазой. Для проведения обработки использовали 10x DNase buffer и DNase I (Thermo Fisher) с последующей инкубацией при 30°C в течение 10 мин. После этого проводили нейтрализацию реакции с помощью 0.5 М ЭДТА и инкубацию при 75°C, полученную очищенную РНК использовали для обратной транскрипции. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen) и набора реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen). Полученная РНК была использована для постановки реакции обратной транскрипции с целью получения кДНК. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов MMLV RT (Евроген) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, и использованием термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad). Реакция проводилась с использованием 50 мМ Oligo(dT)₁₅ праймера (Евроген) и 50 мМ Random(dN)₁₀ праймера (Евроген). Концентрация РНК для каждой реакции обратной транскрипции составляла 20 нг/мкл. Дополнительно проводились 3 отрицательных контроля с заменой РНК, праймеров и MMLV RT на деионизированную воду. Полученные образцы кДНК были использованы для постановки количественной ПЦР в реальном времени, с целью определения уровней транскрипции генов кристаллинов. Также были выполнены отрицательные контроли, в которых ДНК заменялась деионизированной водой, для проверки компонентов реакции.

Для проведения сравнительного анализа уровней транскрипции из генома *C. carpio* [15] были выбраны 5 генов γ М-кристаллинов и кристаллин-подобных белков, а также в качестве референсного –

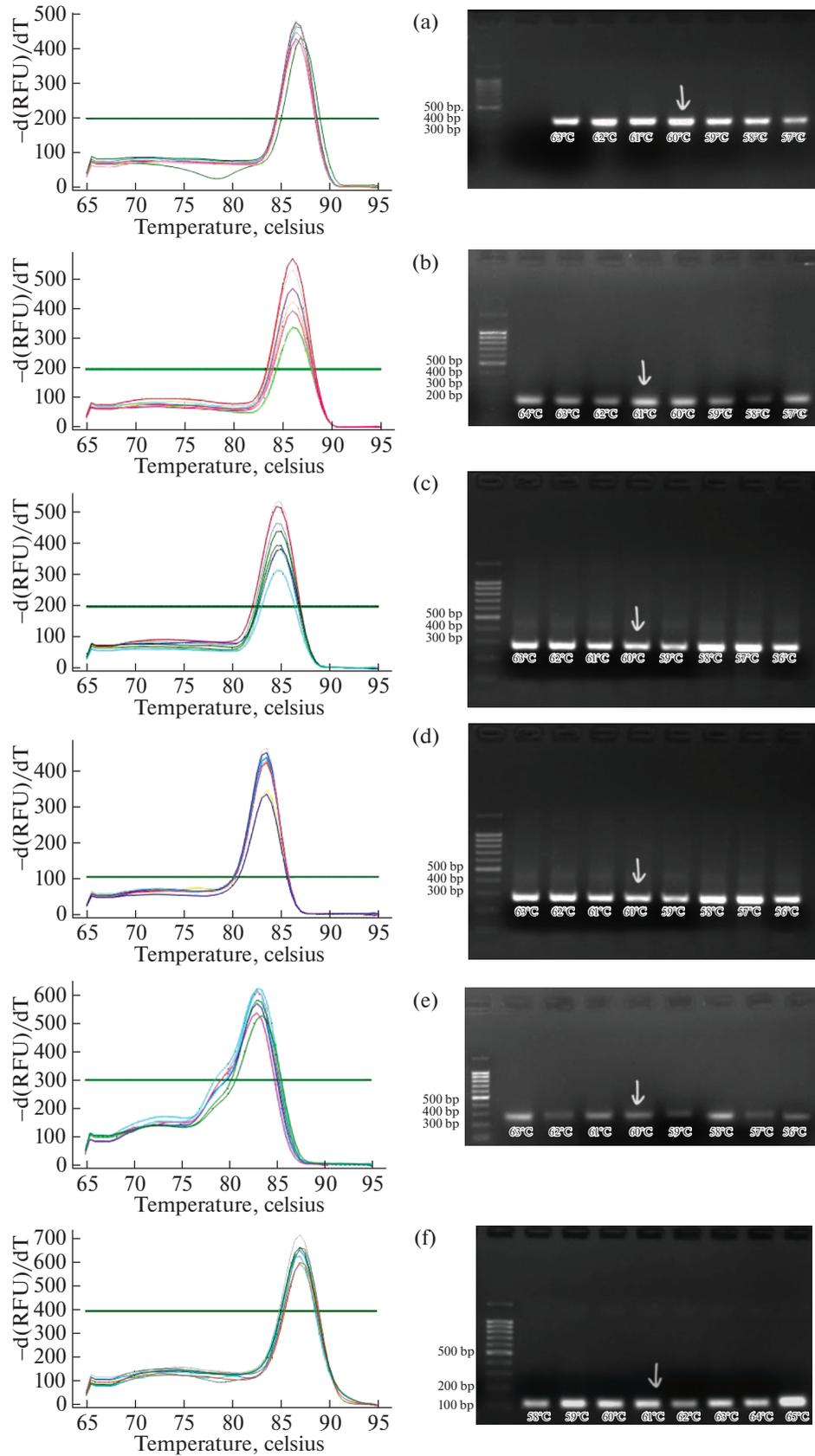


Рис. 1. Результаты оптимизации температур отжига праймеров генов *Gcm1*(a), *Gcm11* (b), *Gcm21* (c), *Gcm212* (d), *Gcm6* (e), а также референсного гена 18S рРНК (f).

ген 18S рРНК, как один из наиболее стабильно экспрессирующихся в организме рыб [16, 17]. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали ДНК-полимеразу Taq и 10x буфер Taq, 50x SYBR Green I, смесь dNTP (все Evrogen).

Аmplификацию проводили на термоциклере CFX96 Thermal cycler ("Bio-Rad", США) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей: 1x буфера Taq, 1x SYBR Green I, 0,25 мкМ смеси dNTP, 0,3 нМ смеси праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы. Процедуру количественной ПЦР проводили по следующему протоколу: 1) денатурация кДНК при 95°C в течение 3 мин; 2) 40 циклов денатурации при 95°C в течение 10 с с последующим отжигом праймеров при 59–61°C (в зависимости от используемых праймеров) в течение 40 с и элонгацией цепи при 72°C в течение 30 с. Исследуемые образцы амплифицировали в пятикратной повторности, принимали в расчет значения со стандартным отклонением не больше 0,2. Относительные уровни транскрипции выбранных генов определяли с помощью скорректированного метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [18].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Оценку достоверности различий между нормализованными уровнями транскрипции генов кристаллинов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post hoc* анализом с помощью критерия Тьюки, различия между сравниваемыми выборками считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Множественное выравнивание и филогенетический анализ

Для проведения филогенетического анализа и выполнения множественного выравнивания наряду с анализируемыми последовательностями *C. carpio* были выбраны последовательности кристаллинов (табл. 2), подтвержденные для хрусталиков взрослых особей *Danio rerio* (Hamilton, 1822) [7] и *Dissostichus mawsoni* (Norman, 1937) [8], а также кристаллины *Chiloscyllium indicum* (J.F. Gmelin, 1789) и *Latimeria chalumnae* (Smith, 1939). Выбор объектов для филогенетического анализа был обусловлен наличием сведений о белковом составе хрусталиков *D. rerio* и *D. mawsoni*. Акула *C. indicum* и латимерия *L. chalumnae* были выбраны для определения степени филогенетической близости/удаленности представителей этих наиболее древних таксономических единиц от современных костистых рыб. Поиск гомологов белков γ М-кристаллинов был выполнен с использованием базы данных

NCBI Protein Blast [19]. Отобранные таким образом последовательности использовались для проведения множественного выравнивания с применением алгоритма Clustal Omega в программном обеспечении UGENE [20], после чего выровненные последовательности визуализировали с помощью программного обеспечения Jalview [21]. По результатам множественного выравнивания строили филогенетическое дерево методом присоединения ближайших соседей с применением параметров по умолчанию с помощью программного обеспечения UGENE.

Расчет инкремента показателя преломления

Величину инкремента показателя преломления (dn/dc) кристаллинов рассчитывали как средневзвешенное значение dn/dc , определенное на основе аминокислотного состава белка. Для этого была использована модель, согласно которой показатель преломления раствора белка полностью объясняется аминокислотным составом последнего [22]. Процентное содержание каждой аминокислоты рассчитывали с помощью программного обеспечения ProtParam на сервере ExPASy [23], а затем умножали на индивидуальный показатель dn/dc для каждой аминокислоты [22] и полученные значения суммировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка уровня транскрипции генов γ -кристаллинов

Для анализа уровней транскрипции генов γ -кристаллинов у *C. carpio* в хрусталике, мозге, печени и мышцах были отобраны 5 генов: γ -кристаллин M1 (LOC109097131, *Gcm I*), γ -кристаллин подобный M1 (LOC109087991, *Gcm II*), 2 изоформы γ -кристаллина подобного M2: LOC109112458 (*Gcm 2I1*), LOC109049519 (*Gcm 2I2*) и γ -кристаллин M6 (*Crygm 6*). В результате проведенного анализа было установлено, что во всех четырех типах образцов тканей транскрибируется только 2-я изоформа гена γ -кристаллина подобного M2 (*Gcm 2I2*) (рис. 2), тогда как остальные гены являются хрусталик-специфичными.

При этом у 4-месячных *C. carpio* (рис. 2а) уровни транскрипции гена *Gcm 2I2* в мышцах и печени более высокие, чем в мозге и хрусталике. У 10-месячных карпов (рис. 2б) транскрипция гена *Gcm 2I2* в мозге повышается, а в мышцах понижается. У 14-месячных карпов (рис. 2с) наблюдается значимое повышение уровней транскрипции во всех тканях, а самый высокий рост происходит в мышцах ($p < 0,01$). Во всех возрастных категориях наименьший уровень транскрипции был установлен в образцах хрусталика.

Возрастные изменения уровней транскрипции всех анализируемых генов γ -кристаллинов в хру-

Таблица 2. Перечень γ М-кристаллинов, использованных для множественного выравнивания

Вид	NCBI номер белка	Название белка
<i>Danio rerio</i>	AAU85786	Crystallin gamma M5
<i>Danio rerio</i>	AAU85783	Crystallin gamma M6
<i>Danio rerio</i>	AAU85782	Crystallin gamma M4
<i>Danio rerio</i>	AAU85781	Crystallin gamma M1
<i>Danio rerio</i>	AAU85774	Crystallin gamma M2b
<i>Danio rerio</i>	AAU85784	Crystallin gamma M7
<i>Danio rerio</i>	AAU25399	Crystallin gamma M2a
<i>Danio rerio</i>	AAU85788	Crystallin gamma M3
<i>Danio rerio</i>	AAH95103.1	Crystallin gamma Mx
<i>Danio rerio</i>	AAU85775.1	Crystallin gamma M2c
<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018980926.1	Crystallin gamma M2 like
<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018966346	Crystallin gamma M1
<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018957713	Crystallin gamma M1 like
<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018922742.1	M2-like isoform X2
<i>Cyprinus carpio</i>	XP_018966349.1	Crystallin gamma M6
<i>Chiloscyllium indicum</i>	CAA55809	Crystallin gamma
<i>Latimeria chalumnae</i>	XP_006013557	Crystallin gamma M2 like
<i>Latimeria chalumnae</i>	XP_006013359.1	Crystallin gamma M2 like isoform 2
<i>Latimeria chalumnae</i>	XP_006013358.1	Crystallin gamma M2 like isoform 1
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61356	Crystallin gamma M7
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61355	Crystallin gamma M5
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61350	Crystallin gamma M1
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61352	Crystallin gamma M3
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61353	Crystallin gamma M4
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABB59450.1	Crystallin gamma M8a
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61357.1	Crystallin gamma M8b
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61358.1	Crystallin gamma M8c
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61359.1	Crystallin gamma M8d
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61351.1	Crystallin gamma M8e
<i>Dissostichus mawsoni</i>	ABA61354.1	Crystallin gamma M9

сталиках представлены на рис. 3. Статистически значимым оказалось снижение транскрипции гена *Grym6* ($p < 0.05$) у 10-месячных карпов по сравнению с 4-месячными особями в процессе онтогенеза. Уровни транскрипции всех остальных генов не имеют между собой статистически значимых возрастных различий (рис. 3).

Филогенетический анализ генов кристаллинов *Cyprinus carpio*

Анализ аминокислотных последовательностей выбранных кристаллинов (табл. 2) показал высокий уровень сходства между ними (рис. 4).

Анализ сходства между аминокислотными последовательностями γ М-кристаллинов нескольких

таксономических групп показал наличие консервативных участков в структуре этих белков. Данные участки представлены:

1) 24 абсолютно консервативными позициями: 13Phe, 15Glu, 18Asn, 19Phe, 21Gly, 29Asp, 60Gly, 62Gln, 68Gly, 70Tyr, 88Ser, 111Gly, 115Glu, 120Cys, 134Ser, 137Val, 142Trp, 148Pro, 159Pro, 150Gly, 161Tyr, 178Ser, 180Arg, 181Arg, 182Ile;

2) 2 абсолютно функционально консервативными позициями: 103Ile, 140Gly;

3) 34 консервативными на более чем 70% позициями: 10Lys, 11Ile, 14Tyr, 17Arg, 25Glu, 32Asp, 33Leu, 40Cys, 44Arg, 45Val, 46Glu, 47Ser, 50Phe, 54Glu, 58Tyr, 67Arg, 69Glu, 90Arg, 99Tyr, 100Arg, 101Met, 102Arg, 105Glu, 109Phe, 118Glu, 122Asn,

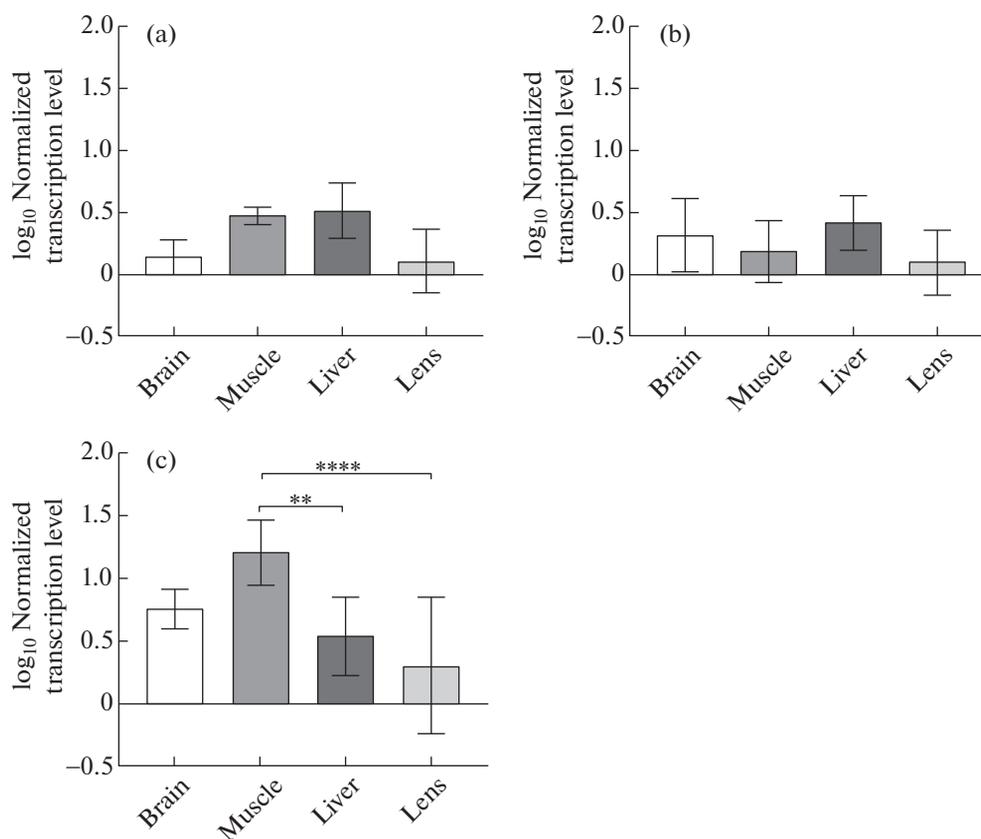


Рис. 2. Уровни транскрипции гена γ -кристаллина подобного M2 (*Gcm2l2*) в хрусталике (Lens), мозге (Brain), мышцах (Muscle) и печени (Liver) 4- (a), 10- (b) и 14- (c) месячных *Cyprinus carpio*, нормализованные на референсный ген и представленные в логарифмической шкале. Все результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение. ** – $p < 0.01$; **** – $p < 0.0001$.

125Asp, 143Leu, 145Tyr, 146Glu, 150Tyr, 156Tyr, 167Asp.

Большая часть консервативных участков представлена четырьмя аминокислотами: аргинином, тирозином, глицином и глутаминовой кислотой.

Рассчитанные показатели сходства между γ M1-кристаллином *Cyprinus carpio* и всеми остальными анализируемыми белками были определены с помощью ПО Protein BLAST и представлены в табл. 3.

С целью демонстрации филогенетических отношений между отобранными нами кристаллинами было построено филогенетическое дерево с использованием метода ближайших соседей (рис. 5).

Инкремент показателя преломления

Анализ рассчитанных значений инкремента показателя преломления (табл. 4) показал, что среди γ -кристаллинов *S. carpio* наибольшим значением dn/dc обладают белки группы M. В то же время значения dn/dc γ M-кристаллинов хрусталиков *D. rerio* превышают значение такового у α и β -кристаллинов лишь в тысячных долях.

Значение инкремента показателя преломления dn/dc (мл/г) представлено как среднее \pm стандартное отклонение. Для получения каждого значения использовались аминокислотные последовательности 7 белков.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной результат данной работы заключается в установлении генов γ M-кристаллинов, транскрипция которых характерна для хрусталика карпа, по крайней мере, на возрастном периоде от 4 до 14 мес. Из выбранных для анализа генов четыре являются специфическими для хрусталика на данном этапе онтогенеза. Это заметно меньше, чем у *D. rerio*, у которой в сопоставимом возрасте (около 6 мес) в хрусталике синтезируются 12 точно установленных и 6 предполагаемых форм γ M-кристаллинов [7], а также, по-видимому, чем у взрослых *D. mawsoni* – 11 [8].

D. rerio пока является единственным видом рыб, у которых прослежена онтогенетическая динамика синтеза кристаллинов в хрусталиках. Так, по результатам анализа методом гель-проникающей

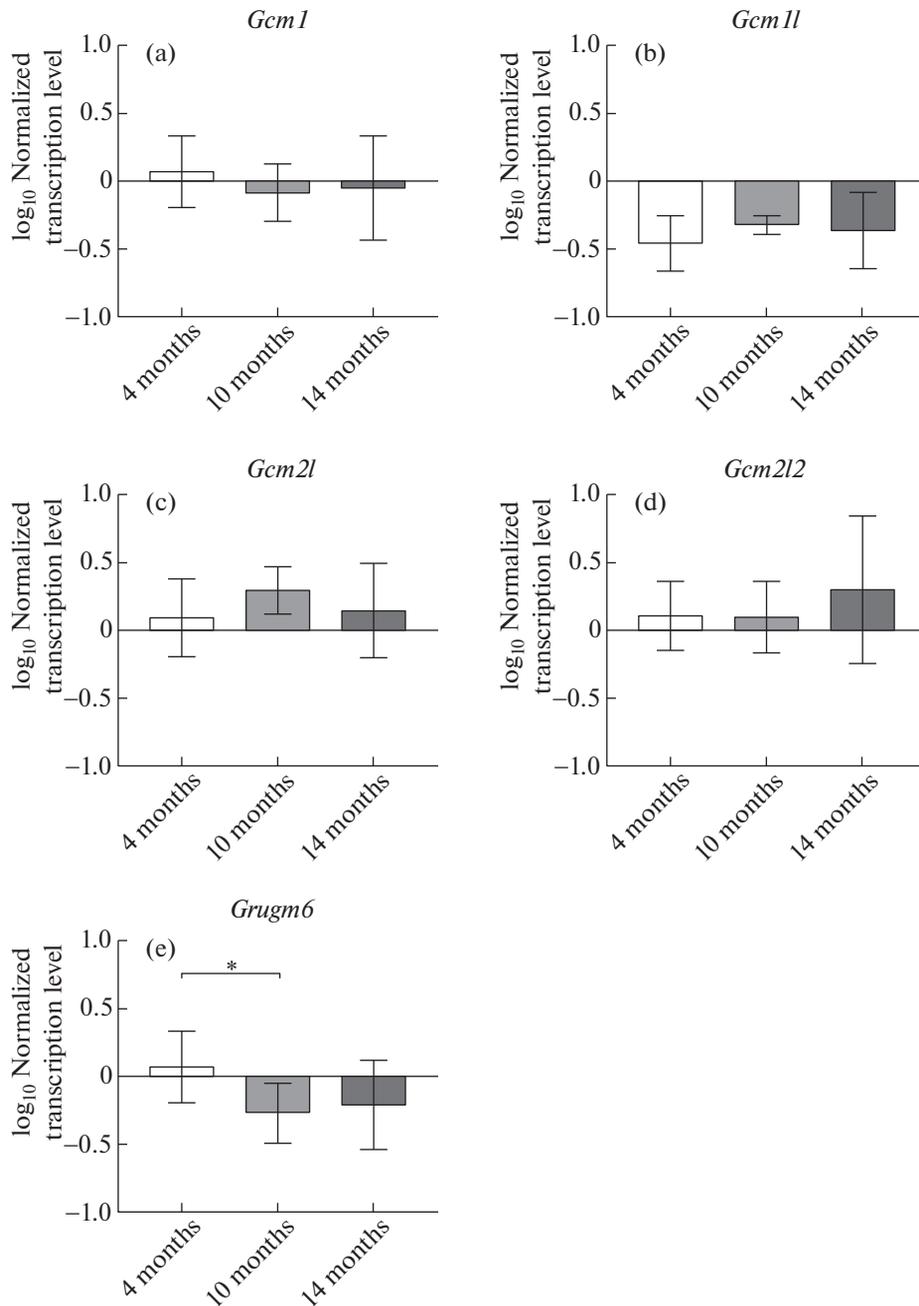


Рис. 3. Возрастная гетерогенность в уровнях транскрипции генов γ -кристаллинов в хрусталике *Cyprinus carpio*, нормализованных на референсный ген и представленные в логарифмической шкале. Все результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * – $p < 0.05$.

хроматографии в сочетании с ультра масс-спектрометрией обнаружено возрастание в хрусталике числа разновидностей γ М-кристаллинов на возрастном этапе от 4.5 дней до 6 мес [7]. Однако у взрослых особей дикого типа количественно определяемыми γ -кристаллинами остаются только γ М7, Мх, а также γ S 2-4 и γ N1-2, при том, что общее их количество составляет 32% от общей массы белков хрусталика [6].

Сопоставляя состав и относительную численность обнаруженных нами транскриптов генов γ -кристаллинов в хрусталике *C. carpio* с идентифицированными белками этого семейства у *D. rerio*, следует учитывать различную продолжительность жизни рыб. У *D. rerio* она составляет от 36 до 66 мес [24], в то время как отдельные особи карпа могут доживать до 47 лет [25], что сопоставимо с продолжительностью жизни *D. mawsoni* [26]. Не исключено,

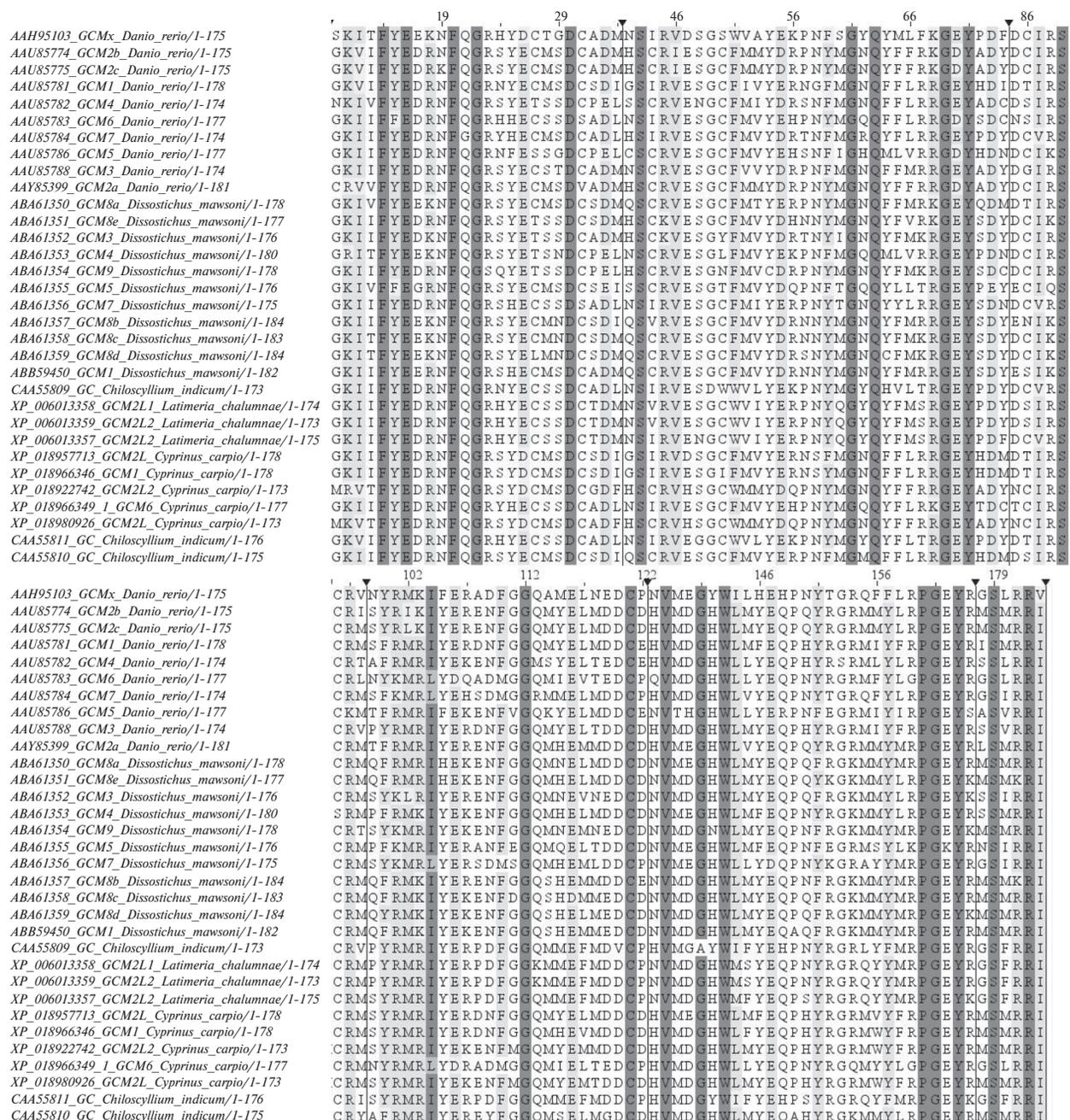


Рис. 4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков γ М-кристаллинов *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Dissistichus mawsoni*, *Chiloscyllium indicum* и *Latimeria chalumnae*. ▼ — скрытые неконсервативные и пустые участки.

что сильное различие в продолжительности онтогенеза может находить свое отражение в динамике транскрипции генов кристаллинов хрусталика. Если учитывать только уверенно определенные группы γ М-кристаллинов, то у *D. rerio* в возрасте 4.5 дней экспрессируется 4 гена γ М-кристаллинов, а в 3-недельном — 12. Полученные же нами результаты показывают, что на возрастном этапе развития карпа от 4 до 14 мес набор генов кристаллинов, экспрессирующихся в хрусталике карпа, остался

тем же, но изменился относительный уровень их транскрипции. Однако очевидно, что для создания полной картины онтогенетических изменений транскрипции генов кристаллинов хрусталика карпа необходимо не только увеличить временной диапазон наблюдений, но и исследовать полный список генов, которые могут включаться и выключаться на различных стадиях онтогенеза. Не исключено, что при большой продолжительности жизни карпов с возрастом у них будет меняться со-

Таблица 3. Степень сходства белков γ М-кристаллинов *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Dissostichus mawsoni*, *Chiloscyllium indicum* и *Latimeria chalumnae* относительно γ М1-кристаллина *Cyprinus carpio*

γ М-кристаллины	γ М1-кристаллин <i>Cyprinus carpio</i>
γ М1-кристаллин <i>Cyprinus carpio</i>	100%
GCM6 <i>Cyprinus carpio</i>	60.00%
GCM1L <i>Cyprinus carpio</i>	92.70%
GCM5 <i>Danio rerio</i>	56.18%
GCM6 <i>Danio rerio</i>	59.43%
GCM1 <i>Danio rerio</i>	87.08%
GCM2b <i>Danio rerio</i>	72.00%
GCM7 <i>Danio rerio</i>	62.71%
GCM3 <i>Danio rerio</i>	75.28%
GCM5 <i>Danio rerio</i>	56.18%
GCM2a <i>Danio rerio</i>	69.54%
GCM4 <i>Danio rerio</i>	62.92%
GCM1 <i>Dissostichus mawsoni</i>	75.84%
GCM3 <i>Dissostichus mawsoni</i>	69.49%
GCM9 <i>Dissostichus mawsoni</i>	66.29%
GCM4 <i>Dissostichus mawsoni</i>	62.01%
GCM7 <i>Dissostichus mawsoni</i>	61.58%
GCM2L <i>Latimeria chalumnae</i>	61.80%
GCM5 <i>Dissostichus mawsoni</i>	55.43%
GC <i>Chiloscyllium indicum</i>	54.55%
GCM6 <i>Danio rerio</i>	46.02%
GCM2c <i>Danio rerio</i>	72.00%
GCM2L2 <i>Latimeria chalumnae</i>	59.89%
GCM2L1 <i>Latimeria chalumnae</i>	61.02%
GCM8a <i>Dissostichus mawsoni</i>	71.35%
GCM8b <i>Dissostichus mawsoni</i>	72.32%
GCM8c <i>Dissostichus mawsoni</i>	68.36%
GCM8d <i>Dissostichus mawsoni</i>	67.80%
GCM8e <i>Dissostichus mawsoni</i>	70.79%
GCM9 <i>Dissostichus mawsoni</i>	66.29%

став ансамбля генов из числа γ М-кристаллинов. Поэтому выявленное нами различие уровней транскрипции генов γ -кристаллинов карпов возрастом до 14 мес вряд ли корректно сопоставлять с динамикой синтеза соответствующих белков в хрусталике *D. rerio*. Главное сходство заключается лишь в отсутствие однозначной направленности изменений транскрипции генов различных γ М-кристаллинов у этих рыб [7, 27].

Изменение набора транскрибируемых генов γ -кристаллинов и уровня их транскрипции в онтогенезе могут обеспечивать формирование радиального градиента показателя преломления хрустали-

ка рыб [28]. По-видимому, так происходит у амфибий, у которых в радиальном направлении к центру хрусталика относительная доля γ -кристаллинов возрастает, обеспечивая увеличение коэффициента рефракции [29].

Предполагается, что обилие в хрусталике рыб небольших молекул γ -кристаллинов способствует более плотной упаковке белковых молекул и формированию материала с высокими значениями коэффициента преломления, что необходимо для обеспечения зрения в водной среде. При этом формированию на сетчатке глаза рыб качественного изображения, не искаженного сферической аберрацией, способствует высокое значение радиального градиента коэффициента рефракции хрусталика. Например, у золотой рыбки *Carassius auratus auratus* индекс преломления вещества хрусталика имеет значения 1.55–1.57 в центральной и 1.35–1.38 в краевой части для $\lambda = 633$ нм при среднем диаметре 2.2 мм [4]. Близкие значения получены для хрусталиков и других исследованных рыб [30]. Возможно, что такие значения радиального градиента коэффициента рефракции достигаются изменением плотности упаковки белков, что обусловлено изменением набора и уровня транскрипции достаточно многочисленных генов γ -кристаллинов в морфогенезе хрусталика. Для сравнения хрусталик крыс имеет перепад градиента преломления от 1.38 до 1.5 на расстоянии 2 мм [31], и в нем на разных стадиях онтогенеза экспрессируются все 6 генов γ -кристаллинов млекопитающих γ A–F [32]. Схожая картина наблюдается и в отношении хрусталика мышей [33]. При этом в хрусталике человека с меньшим значением градиента показателя преломления: от 1.36 до 1.41 на расстоянии 1.8 мм [34] экспрессируется только три γ -кристаллина, из которых два в эмбриогенезе [35].

Предполагалось, что высокое значение показателя преломления вещества хрусталика обусловлено свойствами γ -кристаллинов, в составе которых относительно велика доля метионина [3]. Исходя из того факта, что γ М-кристаллины являются характерной чертой рыб, можно было бы предполагать, что именно они ответственны за высокое значение показателя преломления вещества их хрусталиков. При этом сам метионин имеет не самое большое значение ни величины мольной рефракции, ни значения концентрационного инкремента показателя преломления, dn/dc [10, 13]. Более того, рассчитанные нами значения dn/dc γ М-кристаллинов хрусталиков *D. rerio* превышают значение такого у α и β -кристаллинов лишь в тысячных долях. Вероятно, для получения высоких значений показателя преломления более значимую роль играет упаковка белков по сравнению с их аминокислотным составом. По-видимому, эволюционное закрепление γ М-кристаллинов в качестве доминирующих белков хрусталиков рыб является наиболее оптимальным сочетанием последовательности

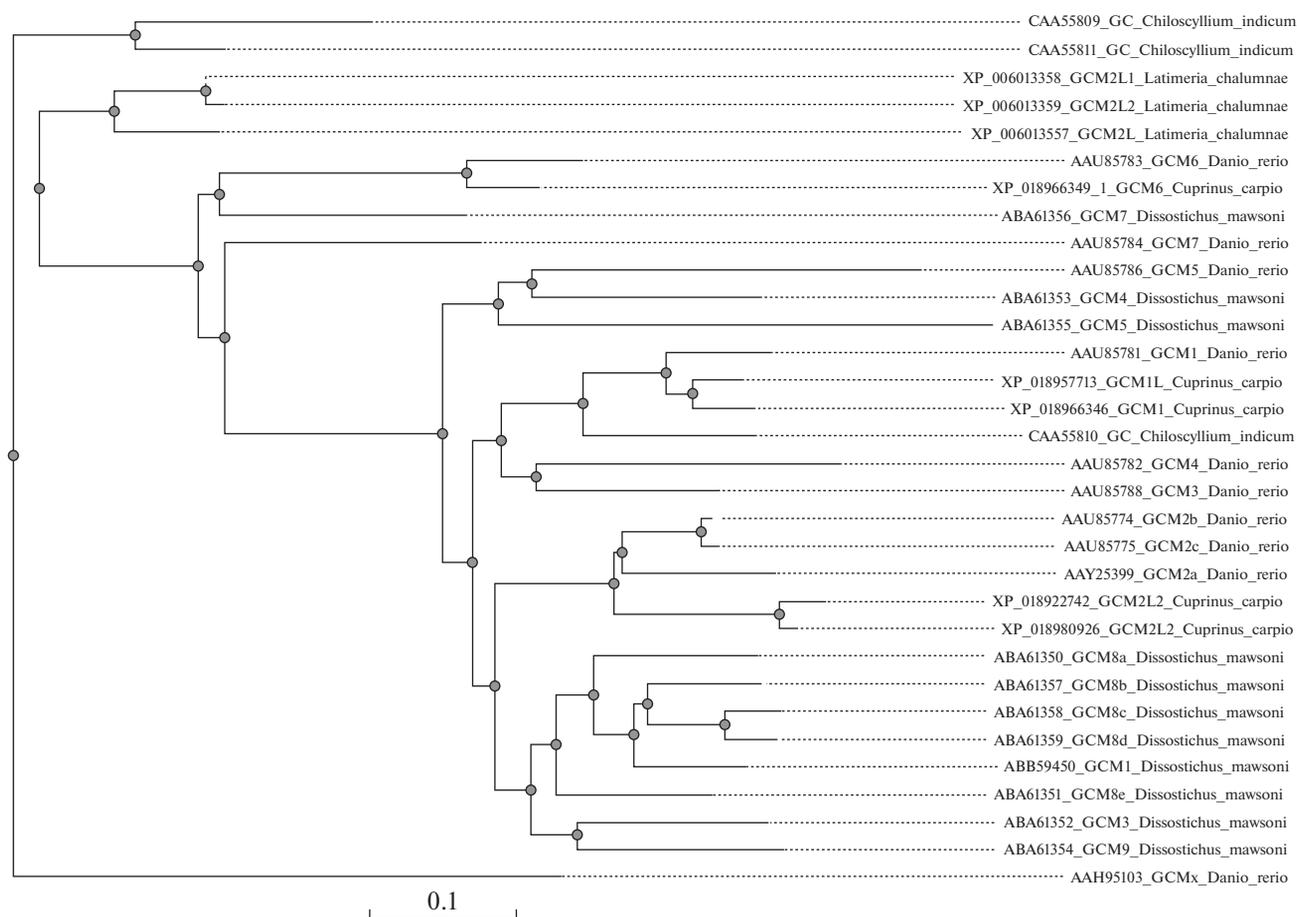


Рис. 5. Филограмма γ М-кристаллинов *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Dissostichus mawsoni*, *Chiloseyllum indicum* и *Latimeria chalumnae*.

аминокислот, определяющих специфику их вторичной и третичной структуры. Последнее обеспечивает плотную упаковку белков в центральной зоне хрусталика, что в конечном итоге приводит к большому значению радиального градиента. Возможно, что особые оптические свойства хрусталиков рыб объясняются не столько рефрактивными свойствами γ М-кристаллинов, но скорее количеством этих белков и плотностью упаковки их молекул, что, возможно, объясняется особенностями их третичной структуры [4, 36].

К настоящему времени уже сложилось мнение о том, что оценка показателя преломления водного раствора белка по его первичной структуре является не совсем адекватным и требует расчетов на основе вторичной и третичной структуры молекул [37]. В представляемой работе расчет носит лишь характер предварительной оценки и его результаты не являются основанием для окончательных выводов. Однако на текущий момент в литературе пока отсутствуют результаты анализа связи фолдинга

Таблица 4. Рассчитанные значения инкремента показателя преломления (dn/dc, мл/г) для групп кристаллинов хрусталика глаз рыб

Кристаллины		<i>Danio rerio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Dissostichus mawsoni</i>
α		0.190 ± 0.002	—	0.189 ± 0.001
β		0.192 ± 0.001	—	0.190 ± 0.002
$\beta\gamma X$		—	—	—
γ	γM	0.197 ± 0.003	0.194 ± 0.001	0.194 ± 0.002
	γN	0.195 ± 0.001	0.192 ± 0.001	—
	γS	0.194 ± 0.001	0.193 ± 0.001	0.194 ± 0.001

кристаллинов с оптическими свойствами их растворов.

Не исключено также, что γ -кристаллины могут выполнять и другие функции, такие, как, например, устойчивость вещества хрусталика рыб к низким температурам [38]. В целом пока вопрос о вкладе свойств γ М-кристаллинов в формирование градиента показателя преломления хрусталика остается открытым. Несомненно, что его решение требует комплексного анализа, включающего онтогенетический мониторинг преломляющих свойств хрусталика, а также динамики синтеза его специфических белков.

Множественное выравнивание отобранных кристаллинов нескольких видов рыб показало, что среди консервативных аминокислот наибольшую долю занимают аргинин, тирозин, глицин и глутаминовая кислота. Две из них, а именно аргинин и тирозин, входят в группу семи аминокислот с наибольшим значением инкремента коэффициента преломления. Этим можно было бы объяснить эволюционное закрепление этих аминокислот в филогенезе, однако этому препятствуют низкие значения соответствующего показателя глицина и глутаминовой кислоты. Поэтому, вероятно, ответ на вопрос о причинах консервативности именно этих аминокислот лежит в другой плоскости и, вероятно, может быть прояснен после анализа фолдинга белков.

Анализ полученного филогенетического дерева показывает, что некоторые белки семейства γ М-кристаллинов (например, γ М1, γ М2, γ М8) укладываются в общие близкородственные клады у лучеперых рыб (*Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Dissostichus mawsoni*), в отличие от древних представителей лопастеперых рыб, например, *Latimeria chalumnae*, γ М2-кристаллины которой располагаются на значительном удалении не только от остальных γ М2-кристаллинов, но всех других кристаллинов. Также на значительном удалении располагаются кристаллины костистых и хрящевых (*Chiloscyllium indicum*) рыб, что свидетельствует об эволюционном изменении молекулярной структуры этих белков.

Проведенное исследование показало наличие специфической транскрипции отдельных γ М-кристаллинов в хрусталике *C. carpio*, что в общем соответствует картине, сложившейся по результатам изучения белков этой группы у *D. rerio* и *D. mawsoni*. Высокая степень сходства аминокислотной последовательности и филогенетическая близость этих белков у *Teleostei*, вероятно, указывают на их важность в определении специфических оптических свойств, присущих хрусталикам этой группы рыб. Однако точный механизм роли транскрипции γ М-кристаллинов и ее динамики в формировании преломляющих свойств хрусталиков рыб пока остается неясным и нуждается в дальнейших более комплексных исследованиях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.В.Ж., И.Н.Д.), сбор данных (А.И.К., И.Н.Д.), обработка данных (И.Н.Д., А.И.К.), написание и редактирование манускрипта (А.И.К., И.Н.Д., В.В.Ж.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность директору учебно-опытного рыболовного хозяйства ФГБОУ ВО «КГТУ» П.П. Жданову за предоставленную возможность сбора биологического материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Land MF, Nilsson D-E (2012) Animal Eyes. Oxford. Oxford University Press.
2. Kröger RHH (2013) Optical plasticity in fish lenses. Prog Retin Eye Res 34: 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.12.001>
3. Pierscionek BK (2009) Gradient index of refraction (GRIN) profiling of the eye lens. In Ed. Michael Bass. The Optical Society of America Handbook of Optics. Volume III: Vision and Vision Optics. New York. McGraw-Hill. 19.1–19.18.
4. Pierscionek BK, Regini JW (2012) The gradient index lens of the eye: an opto-biological synchrony. Prog Retin Eye Res 31 (4): 332–349. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.03.001>
5. Lin Y-R, Mok H-K, Wu Y-H, Liang S-S, Hsiao C-C, Huang C-H, Chiou S-H (2013) Comparative proteomics analysis of degenerative eye lenses of nocturnal rice eel and catfish as compared to diurnal zebrafish. Mol Vis 19: 623–637.
6. Posner M, Hawke M, LaCava C, Prince CJ, Bellanco NR, Corbin RW (2008) A proteome map of the zebrafish (*Danio rerio*) lens reveals similarities between zebrafish and mammalian crystallin expression. Mol Vis 14: 806–814.
7. Greiling TM, Houck SA, Clark JI (2009) The zebrafish lens proteome during development and aging. Mol Vis 15: 2313–2325.
8. Kiss AJ, Cheng CH (2008) Molecular diversity and genomic organisation of the alpha, beta and gamma eye lens crystallins from the Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni*. Comp Biochem Physiol Part D Genomics and Proteomics 3 (2): 155–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.02.002>
9. Chiou SH, Chang WC, Pan FM, Chang T, Lo TB (1987) Physicochemical characterization of lens crystallins from the carp and biochemical comparison with other vertebrate and invertebrate crystallins. J Biochem 101 (3): 751–759. <https://doi.org/10.1093/jb/101.3.751>
10. Zhao H, Chen Y, Rezabkova L, Wu Z, Wistow G, Schuck P (2014) Solution properties of γ -crystallins: hydration of

- fish and mammal γ -crystallins. *Protein Sci* 23 (1): 88–99. <https://doi.org/10.1002/pro.2394>
11. Pan FM, Chang WC, Lin CH, Hsu AL, Chiou SH (1995) Characterization of gamma-crystallin from a catfish: structural characterization of one major isoform with high methionine by cDNA sequencing. *Biochem Mol Biol Int* 35 (4): 725–732. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7627123/>
 12. Mahler B, Chen Y, Ford J, Thiel C, Wistow G, Wu Z (2013) Structure and dynamics of the fish eye lens protein, γ M7-crystallin. *Biochemistry* 52 (20): 3579–3587. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi400151c>
 13. Zhao H, Brown PH, Magone MT, Schuck P (2011) The molecular refractive function of lens γ -crystallins. *J Mol Biol* 411 (3): 680–699. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146585/>
 14. Глоссарий параметров ПЦР [Электронный ресурс]. Режим доступа - <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/200/845/oligo-architect-glossary-br3011en-mk.pdf> (Дата обращения 05.05.2022) [Glossarij parametrov PCR [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa - <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/200/845/oligo-architect-glossary-br3011en-mk.pdf> (Data obrasheniya 05.05.2022)]
 15. Kolder ICRM, van der Plas-Duivesteyn J, Tan G, Wiegertjes GF, Forlenza M, Guler AT, Travin DY, Nakao M, Moritomo T, Irnazarow I, den Dunnen JT, Anvar SY, Jansen H., Dirks RP, Palmblad M, Lenhard, Henkel CV, Spaink HP (2016) A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp. *BMC Genomics* 17: 701. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3038-y>
 16. Filby AL, Tyler CR (2007) Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Mol Biol* 8: 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-10>
 17. Liu W, Yuan X, Yuan S, Dai L, Dong S, Liu J, Peng L, Wang M, Tang Y, Xiao Y (2020) Optimal reference genes for gene expression analysis in polyploid of *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*. *BMC Genet* 21: 107. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00915-6>
 18. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
 19. NCBI // URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (дата обращения: 09.02.2022).
 20. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28 (8): 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
 21. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9):1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
 22. Zhao H, Brown PH, Schuck (2011) On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys J* 100(9):2309–2317.
 23. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In Ed. J.M. Walker The proteomics protocols handbook. Totowa, New Jersey. Humana Press Inc. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
 24. Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, Demidenko E, Cheng KC (2002) Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol* 37 (8–9): 1055–1068. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00088-8)
 25. Carey JB, Judge DS (2000) Longevity Records: Monographs on Population Aging. Vol 8: Life Spans of Mammals, Birds, Amphibians, Reptiles, and Fish. Univer Press of Southern Denmark.
 26. Brooks CM, Andrews AH, Ashford JR, Ramanna N, Jones CD, Lundstrom CC, Cailliet GM (2011) Age estimation and lead–radium dating of Antarctic toothfish (*Disostichus mawsoni*) in the Ross Sea. *Polar Biol* 34 (3): 329–338. <https://doi.org/10.1007/s00300-010-0883-z>
 27. Wages P, Horwitz J, Ding L, Corbin RW, Posner M (2013) Changes in zebrafish (*Danio rerio*) lens crystallin content during development. *Mol Vis* 19:408–417.
 28. Wang K, Vorontsova I, Hoshino M, Uesugi K, Yagi N, Hall JE, Schilling TF, Pierscionek BK (2020) Optical development in the zebrafish eye lens. *FASEB J* 34 (4): 5552–5562. <https://doi.org/10.1096/fj.201902607R>
 29. Keenan J, Manning G, Elia G, Dunn MJ, Orr DF, Pierscionek BK (2012) Crystallin distribution patterns in *Litoria infrafrenata* and *Phyllomedusa sauvagei* lenses. *Proteomics* 12 (11): 1830–1843. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100393>
 30. Axelrod D, Lerner D, Sands PJ (1988) Refractive index within the lens of a goldfish eye determined from the paths of thin laser beams. *Vis Res* 28 (1): 57–65. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(88\)80006-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(88)80006-3)
 31. Campbell MC (1984) Measurement of refractive index in an intact crystalline lens. *Vis Res* 24 (5): 409–415. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(84\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0042-6989(84)90039-7)
 32. Van Leen RW, Breuer ML, Lubsen NH, Schoenmakers JG (1987) Developmental expression of crystallin genes: *in situ* hybridization reveals a differential localization of specific mRNAs. *Dev Biol* 123 (2): 338–345. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90392-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90392-7)
 33. Ueda Y, Duncan MK, David L (2002) Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (1): 205–215.
 34. Pierscionek B, Bahrami M, Hoshino M, Uesugi K, Regini J, Yagi N (2015) The eye lens: age-related trends and individual variations in refractive index and shape parameters. *Oncotarget* 6 (31): 30532–30544.
 35. Vendra VP, Khan I, Chandani S, Muniyandi A, Balasubramanian D (2016) Gamma crystallins of the human eye lens. *Biochim Biophys Acta* 1860 (1 Pt B): 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.007>

36. *Slingsby C, Wistow GJ, Clark AR* (2013) Evolution of crystallins for a role in the vertebrate eye lens. *Protein Sci* 22 (4): 367–380. <https://doi.org/10.1002/pro.2229>
37. *Houston P, Macro N, Kang M, Chen L, Yang J, Wang L, Wu Z, Zhong D* (2020) Ultrafast Dynamics of Water-Protein Coupled Motions around the Surface of Eye Crystallin. *J Am Chem Soc.* 142 (8): 3997–4007. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13506>
38. *Kiss AJ, Mirarefi AY, Ramakrishnan S, Zukoski CF, Devries AL, Cheng CH* (2004) Cold-stable eye lens crystallins of the Antarctic nototheniid toothfish *Dissostichus mawsoni* Norman. *J Exp Biol* 207 (Pt 26): 4633–4649. <https://doi.org/10.1242/jeb.01312>

γ M-Crystallin Genes in the Eye Lens of a Common Carp *Cyprinus carpio*: Transcription Levels and Phylogenetic Aspect

A. I. Kapitonova^a, I. N. Dominova^a, and V. V. Zhukov^{a,#}

^a *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

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

The study was focused on determining transcription levels of γ M-crystallin genes in the eye lens of a common carp *Cyprinus carpio*. The transcription was detected by quantitative RT-PCR, and its relative level was quantified in 5 genes of γ M-crystallins and crystallin-like proteins in *C. carpio* aged 4, 10 and 14 months. In all age groups, the specificity of *GCM1*, *GCM1L*, *GCM2L*, *GCM2L3* gene expression in the lenses was found. *GCM2* gene expression, apart from the lenses, was also detected in the muscles, liver, and brain. Analysis of the role of the amino acid sequence of the identified γ M-crystallins in the formation of the refractive properties of the lens was performed based on the assessment of calculated refractive index increments. It is assumed that high values of the refractive index of the lens in *C. carpio* are due not so much to a relative content of amino acids in γ M-crystallins as to their sequences, which ensure the tertiary packing density of these proteins, as well as by γ M-crystallin concentrations. To identify conserved domains and evolutionary relationships between γ M-crystallins in fish of different taxa, a multiple alignment of amino acid sequences was performed, and a phylogenetic tree was constructed using the nearest neighbor algorithm. The high level of homology, the presence of 26 conserved regions, and the phylogenetic similarity of the compared proteins in the given teleost group may indicate an evolutionary fixation of the spatial structure of γ M-crystallins and an important role in determining the specific properties of lenses in *Teleostei*.

Keywords: *Cyprinus carpio*, lens, γ M-crystallins, tissue specificity, conserved protein domains