СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 1, 2021

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

ОБЗОРЫ

Концепции канализированности и генетической ассимиляции в биологии развития. Современные подходы и исследования

А. В. Спиров, В. Ф. Левченко, М. А. Сабиров 3

Тучные клетки в головном мозге позвоночных – локализация и функции

И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский 17

Роль мелатонина в пренатальном онтогенезе

И. И. Евсюкова 33

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Морфофункциональные особенности церкальных органов сверчков

А. М. Луничкин, М. И. Жуковская 44

Возраст-зависимые изменения роли калиевых каналов в дилатации пиальных артерий на ацетилхолин у крыс WKY и SHR

О. П. Горшкова 53

Гликоген как запасающий энергетический субстрат ядерных эритроцитов рыб

Ю. А. Силкин, Е. Н. Силкина, М. Ю. Силкин 63

Показатели тканевой микрогемодинамики крыс при действии ацетилсалициловой кислоты и ее комплексных соединений с металлами

М. Ю. Раваева, Е. Н. Чуян, И. С. Миронюк, И. В. Черетаев, Т. В. Гришина 71

Маркирование аденоассоциированными вирусными векторами гиппокампа мыши нейронов мезенцефалического тегментума молоди тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta*

Е. В. Пущина, И. А. Капустянов, Е. В. Шамшурина, А. А. Вараксин 83

Поправки 90

Contents

Vol. 57, No. 1, 2021

REVIEWS

Concepts of canalization and genetic assimilation in developmental biology. Current approaches and researches
A. V. Spirov, V. F. Levchenko, M. A. Sabirov 3

Mast cells in the vertebrate brain – localization and functions
I. P. Grigorev, D. E. Korzhevskii 17

The role of melatonin in prenatal ontogenesis
I. I. Evsyukova 33

EXPERIMENTAL ARTICLES

Morpho-functional characterization of cercal organs in crickets
A. M. Lunichkin, M. I. Zhukovskaya 44

Age-related changes in the role of potassium channels in acetylcholine-induced dilation of pial arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats
O. P. Gorshkova 53

Glycogen as an energy storage substrate in fish nucleated erythrocytes
Yu. A. Silkin, E. N. Silkina, M. Yu. Silkin 63

Indicators of tissue microhemodynamics in rats exposed to acetyl salicylic acid and metal salicylates
M. Yu. Ravaeva, E. N. Chuyan, I. V. Cheretaev, I. S. Mironyuk, T. V. Grishina 71

Labeling of mesencephalic tegmental neurons in a juvenile pacific chum salmon *Oncorhynchus keta* with mouse hippocampal adeno-associated viral vectors
E. V. Pushchina, I. A. Kapustyanov, E. V. Shamshurina, A. A. Varaksin 83

Erratum 90

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 3–16

ОБЗОРЫ

КОНЦЕПЦИИ КАНАЛИЗИРОВАННОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ В БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2021 г. А. В. Спиров[1,*], В. Ф. Левченко[1,], М. А. Сабиров[1,***]**

[1] *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44, 194223, Россия*

**e-mail: alexander.spirov@gmail.com*

***e-mail: lew@lew.spb.org*

****e-mail: ne-merr-eno@mail.ru*

Поступила в редакцию 08.02.2020 г.
После доработки 24.07.2020 г.
Принята к публикации 25.07.2020 г.

Две взаимосвязанные части концепции Конрада Уоддингтона – концепция канализированности (canalization) и концепция генетической ассимиляции (ассимиляции генов, genetic assimilation) – сформулированные в 40-е годы прошлого века, продолжают привлекать внимание исследователей. Это один из самых впечатляющих примеров трансдисциплинарного развития концепций.

Индивидуальное развитие любого организма происходит в условиях постоянных и неустранимых изменений факторов внешней среды и внутренних возмущений молекулярно-физиологических процессов. Учитывая, что организмы в популяции различаются генетически, реализация генетической программы должна быть поэтому относительно устойчива к генетической изменчивости.

По Уоддингтону индивидуальное развитие канализировано, т.е. происходит внутри некоторого канала условий, ограничивающего изменчивость траектории развития. Однако сильные изменения среды и значительные внутренние возмущения способны “выбрасывать” траектории индивидуального развития за пределы канала. При этом появляются аберрантные фенотипы, некоторые из которых способны участвовать в последующем отборе. При сохранении условий, систематически приводящих к такому смещению индивидуального развития, особенности этих фенотипов через ряд поколений могут зафиксироваться отбором и генетически. Иначе говоря, отбор приводит к появлению наиболее генетически подходящих при сложившихся обстоятельствах вариантов фенотипов, у которых траектории развития соответствующим образом изменены. Популяции организмов с измененными траекториями и отличающимися генотипами продолжают существовать и в дальнейшем, когда действие возмущающих факторов прекращается. Этот механизм, приводящий к ситуации “сходные фенотипы, но отличающиеся генотипы”, Уоддингтон называл ассимиляцией генов.

Недавние результаты из области системной эволюционной биологии позволили подвести количественную базу под классические концепции Конрада Уоддингтона об устойчивости индивидуального развития и генетической ассимиляции. Появилась возможность развивать эту концепцию дальше в свете новых экспериментальных и теоретических результатов. Особенный прогресс достигнут в анализе молекулярных механизмов канализированности. Обсуждение результатов этой области системной биологии, полученных средствами компьютерного моделирования в сравнении с заключениями по экспериментальным данным, и составляет предмет данной статьи.

Ключевые слова: концепции Уоддингтона, канализированность, фенотипическая пластичность, генетическая ассимиляция, моделирование генных сетей

DOI: 10.31857/S0044452920060091

1. ВВЕДЕНИЕ

Система воззрений Конрада Уоддингтона, известная по своим ключевым положениям о канализированности эмбрионального развития и об ассимиляции генов в микроэволюции, была сформулирована в 40–50-х годах прошлого века. Сам Уоддингтон исходил, в частности, из учения Шмальгаузена о стабилизирующем отборе, изложенного в его монографии на английском, выпущенной в Филадельфии (Пенсильвания) в 1949 г. Последующие десятилетия сам Уоддингтон и другие авторы с близкими воззрениями развивали это направление в эволюционной биологии [1–3], первые же публикации на эту тему можно найти еще в конце XIX века [4].

Идеи канализированности и ассимиляции были сформулированы изначально как остроумные заключения из небольшого числа экспериментов и наблюдений. Последующие десятилетия теоретической и экспериментальной работы позволили развить их в общебиологические учения и продемонстрировали их применимость в современной эволюционной биологии развития (т.н. “evo-devo”). Результатом работы недавних десятилетий стали не только детальные молекулярно-биологические исследования механизмов канализирования, но также и полевые исследования микроэволюционных процессов [5–11]. Не все авторы согласны с ключевыми выводами Уоддингтона и его последователей, и поэтому эта область требует новых исследований. Но сам масштаб исследований впечатляет и свидетельствует о непреходящем интересе к исходным идеям о канализированности и генетической ассимиляции.

Эти идеи получили свои, во многом неожиданные, интерпретации в областях молекулярной биологии и сравнительной молекулярной генетики в рамках направления evo-devo [5–7, 9–11] и в последние десятилетия были развиты и подтверждены экспериментально в новых принципиальных аспектах.

В настоящее время идеи Уоддингтона все больше анализируются методами современной вычислительной биологии, преимущественно средствами компьютерных моделей и, в частности, моделями эволюции генных регуляторных сетей (ГРС) [12–16]. В этом новом направлении наблюдается существенный прогресс (см. обзоры [17, 18]). Однако новые результаты компьютерных экспериментов нуждаются в экспериментальной верификации. И именно в этой области на стыке системной и вычислительной биологии[1] публикуется больше всего работ, которым посвящен этот обзор.

Стоит отметить, что компьютерное моделирование эволюции ГРС методологически относится к современной кибернетике (т.н. computer science) и в этом плане идеи Уоддингтона выходят за рамки теории биологической эволюции и рассматриваются также в области кибернетики в масштабных компьютерных экспериментах [17, 18].

Еще одно новое приложение идей Уоддингтона – экспериментальная эволюция биомолекул, известная как направленная эволюция или “эволюция в пробирке” [19, 20]. Здесь тоже наблюдается прогресс в обобщении этих идей и формировании новых направлений на стыке синтетической биологии и биоинженерии.

Наконец, сформулированная Уоддингтоном идея эпигенетического ландшафта, являющаяся, по-сути, визуализацией концепции канализированности, оказала влияние на разработку математической теории катастроф, что неоднократно отмечал ее автор, французский математик Рене Том [21].

Таким образом, история науки демонстрирует, как наблюдения за вылуплением птенцов страуса и эмбриогенезом мушек привели к формулировке таких концепций, область приложения и развития которых уже давно вышла за границы собственно биологии. На наш взгляд, было бы важно и интересно очертить эти области.

2. ИСХОДНЫЕ ИДЕИ УОДДИНГТОНА

Две части учения Уоддингтона – концепция канализированности (canalization) индивидуального развития и концепция генетической ассимиляции (genetic assimilation) как процесса закрепления модифицированного признака – изначально взаимосвязаны. Уоддингтон заметил, что уровни фенотипических вариаций в природных популяциях обычно ниже по сравнению с ожидаемыми при наблюдаемых уровнях генетических вариаций и варьирования условий среды. Иначе говоря, хотя большинство видов, если не все, характеризуются значительной генетической вариабельностью, например, имеют разные аллели одного гена, отличающиеся из-за однонуклеотидного полиморфизма (single nucleotide polymorphism – SNP), и при этом постоянно подвергаются действию меняющихся факторов среды, фенотипическое разнообразие в пределах вида существенно ниже того, которое можно было бы ожидать по этим причинам. Из этого следует вывод, что индивидуальное развитие устойчиво к внутренним генетическим возмущениям и варьированию факторов среды. Этот эффект также называют устойчивостью (“робастностью” – robustness) индивидуального развития [1, 3, 22]. Идея канализированного развития дополнялась Уоддингтоном концепцией “генетической ассимиляции”, в соответствии с которой на генетическом уровне происходит стабилизация фенотипических изменений, вызванных действием среды [23].

Таким образом, концепция канализированного индивидуального развития исходит из наблюдений о низкой фенотипической изменчивости в популяциях, несмотря на заметное генетическое разнообразие и варьирование факторов среды [2]. В ее основу Уоддингтон положил результаты экспериментальных наблюдений за индивидуальным развитием организмов (в частности, развитие крыльев у дрозофилы), серьезные генетические или средовые (например, тепловой шок) возмущения обусловливали появление целого спектра аберрантных фенотипов, не наблюдаемых в норме. На основе наблюдений было сделано несколько выводов, в частности, о том, что индивидуальное развитие организма обладает “запасом прочности”,

[1] Под системной биологией понимают дисциплину на стыке биологии и теории сложных систем (см. https://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1358381).

иначе говоря, этот процесс в норме устойчив – когда организм испытывает не сильные, но повторяющиеся возмущающие воздействия. В то же время методом искусственного отбора Уоддингтон показал, что фенотипическая пластичность, изначально проявляющаяся только при сильном воздействии, имеет под собой генетическую основу и может быть усилена генетически изменением генетического фона[2].

Если бы процесс индивидуального развития не был канализирован, то вариабельность внутренних (включая генетические) и внешних факторов обусловливала бы целый спектр фенотипов. Такой спектр характеризовался бы, видимо, колоколообразной кривой частотного распределения, с редкими фенотипами по краям. Искусственный отбор позволял бы при этом отбирать желаемые редкие фенотипы и получать новые, необычные формы путем скрещивания носителей таких фенотипов. Если предположить, что аналогично может быть описан и естественный отбор (например, при резком и долговременном изменении среды или при колонизации новой территории), то должна была бы наблюдаться разница фенотипов в разных фрагментах популяции. Однако это не наблюдается, поскольку процесс индивидуального развития существенно канализирован и при отсутствии экстремальных внешних возмущений почти все особи в потомстве выглядят сходно, несмотря на генетическую вариабельность.

Из этого следует, что фактически генная организация жестко не детерминирует фенотип, а определяет его характеристики в пределах нормы реакции на варьирование факторов среды. Это называют фенотипической пластичностью.

При сохранении условий, приводящих к смещению траекторий индивидуального развития, особенности аберрантных фенотипов и их потомства через ряд поколений могут зафиксироваться отбором и генетически. Иначе говоря, отбор приведет к появлению наиболее генетически подходящих при сложившихся обстоятельствах вариантов фенотипов, у которых траектории развития соответствующим образом изменены. Со временем генетическая вариабельность уменьшится и канализированность установится в новых границах. В итоге подавляющее большинство потомства будет снова фенотипически сходно, хотя генетически будет уже отличаться от исходной популяции. Этот механизм вслед за Уоддингтоном называют ассимиляцией генов или генетической ассимиляцией [8, 22, 24].

Идея канализированности индивидуального развития непосредственно связана с концепцией Уоддингтона об эпигенетическом ландшафте. С ее помощью можно проиллюстрировать идею генетической ассимиляции. Идея эпигенетического ландшафта эволюционировала от начальных деклараций в 1940 г. не только благодаря Уоддингтону, но и многим другим авторам [2, 25–28].

Уоддингтон предложил представить развитие (эмбриона, зиготы, эмбриональной клетки) как движение шарика вниз по эпигенетическому ландшафту – генетически заданной поверхности со сложным рельефом, причем такой, что всегда имеется путь сверху, где изначально находится шарик, вниз, к “цели” развития – см. рис. 1. Таких путей (и соответственно потенциальных траекторий) может быть несколько, как и целей развития. Типичная картина событий выглядит так: шарик начинает катиться по наклонной “долине”, окруженной “холмами” – стенками долины. В этом случае развитие канализировано рельефом. За стенками-холмами находится соседняя долина. Шарик при движении подвергается возмущениям и поэтому может иногда быть выброшен за пределы своей долины и далее продолжить катиться по соседней долине с иными особенностями рельефа.

Данный наглядный подход позволяет проиллюстрировать основные идеи Уоддингтона относительно не только канализированности развития, но и генетической ассимиляции признаков. На рис. 1 сверху изображена переброска шарика сильным направленным импульсом среды из долины **x**, где формируется признак **X**, в долину **y** с признаком **Y**. Это иллюстрирует механизм приобретения признака под действием сильного и направленного внешнего фактора. Предполагается, что генетическая ассимиляция в процессе отбора связана с постепенной деформацией ландшафта таким образом, что шарик все чаще меняет траекторию и оказывается в долине **y**, где двигается по направлению к признаку **Y**, даже когда действие возмущающего фактора прекращается – рис. 1.

На протяжении последующих десятилетий идеи Уоддингтона развивались многими авторами по целому спектру новых направлений.

2.1. Развитие идей канализированности и ассимиляции в биологии

Эксперименты с искусственными возмущениями остаются главным подходом к выявлению механизмов устойчивости развития. Уоддингтон изучал простые внешние воздействия, такие как тепловой шок, эфир или разные концентрации тех или иных солей в среде [23], позднее исследователи применяли более сложные методы, приводящие к индуцированным мутациям в ключевых генах, отвечающих за процесс развития [6]. Новейшие экспериментальные подходы позволили расширить исследования до использования генетически мо-

[2] Под генетическим фоном понимается совокупность генов, взаимодействующих с данным геном и оказывающих влияние на реализацию контролируемого им признака (см. https://dic.academic.ru/dic.nsf/medic2/11625).

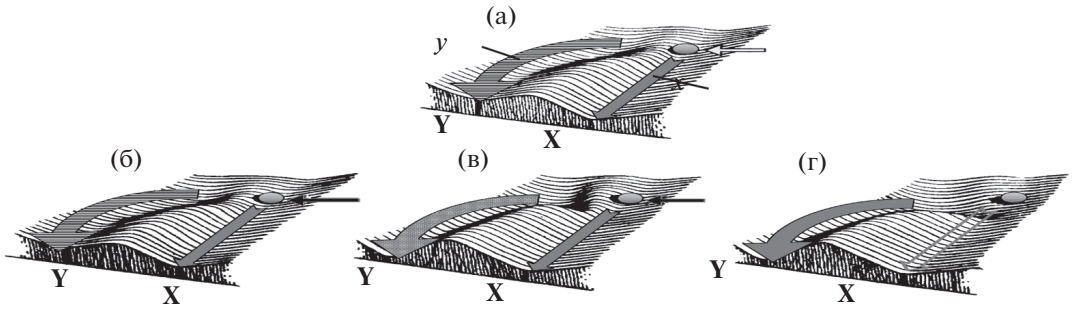

Рис. 1. Канализированность и генетическая ассимиляция в концепции эпигенетического ландшафта. (а) Обычное развитие, когда шарик скатывается по долине **x**. Показана часть эпигенетического ландшафта с основной долиной, ведущей к признаку взрослого организма **X** и другой ветви (слева), ведущей к **Y** (стрелки); структуры развивающегося эмбриона не попадут на путь к **Y**, если только сильное внешнее возмущение (полая стрелка) не вытолкнет развивающуюся систему за пределы основной долины **x**. (б–г) Разные сценарии, в которых приобретается признак **Y**, который далее может быть включен в генотип (ассимилирован генетически). (б) Исходное внешнее возмущение (как на (а)) заменяется мутантным аллелем (темная стрелка), который появляется случайно. (в) Порог, защищающий дикий тип **X**, понижается из-за изменения генетического фона, и вероятность переброски шарика в долину, ведущую к **Y**, повышается. (г) Генотип и генетический фон изменяются так, что порог исчезает, и шарик всегда попадает в долину **y**.

Fig. 1. Canalization and genetic assimilation in the Waddington's concept of epigenetic landscape. (a) Normal development, when the ball rolls down the valley **x**. The diagram shows a part of the epigenetic landscape with a main valley leading to the adult organism's trait **X** and another branch (left) leading to **Y** (arrows); structures of the developing embryo will not get on the trajectory to **Y** unless a strong external perturbation (hollow arrow) kicks the developing system out of the main valley **x**. (b–d) Different scenarios, in which the trait **Y** is acquired, being able to be then included in the genotype (i.e. genetically assimilated). (b) The initial external perturbation (as in (a)) is replaced by a mutant allele (dark arrow) which appears by accident. (c) The threshold protecting the wild type **X** decreases due to a change in the genetic background, and the probability of the ball being thrown to the valley leading to **Y** increases. (d) Genotype and genetic background change in such a way that the threshold disappears, and the ball invariably gets into the valley **y**.

дифицированных модельных организмов с мутантными генами, утратившими функцию (loss-of-function) или получившими новые функции (gain-of-function). Различные дозы малых интерферирующих РНК (small interfering RNA или siRNA) также использовались для модуляции активности конкретных генов (см. [32] и ссылки там). Все это позволило создать серию контролируемых по силе возмущений и тем самым увеличить разрешающую способность методов поиска изменений в регуляторных генах, обеспечивающих механизм устойчивости индивидуального развития. Во всех этих случаях относительную устойчивость оценивали количественно – как степень изменения специфических ("диагностических") признаков после проведения эксперимента с искусственным возмущением.

В последние годы наблюдается существенный прогресс как в области системных исследований эволюции генных и клеточных регуляторных сетей, так и в области системной биологии развития, начиная с Балдвина, Шмальгаузена, Уоддингтона, а также их современников и последователей [1–4].

3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КАНАЛИЗИРОВАННОСТИ

В современной молекулярной биологии индивидуального развития предложены механизмы, которые, как считается, обеспечивают канализированность развития. Это можно рассматривать как дальнейший прогресс в разработке концепций Уоддингтона.

3.1. Скрытая генетическая вариабельность

Скрытая генетическая вариабельность – СГВ (cryptic genetic variation), вместе с молекулярными механизмами ее обеспечивающими, рассматривается в биологии развития при обсуждении и конкретизации уоддингтоновских идей (см. [29]). Именно Уоддингтон описал проявление СГВ в своих пионерских работах [2, 22, 23].

Согласно определению Мэйзел и Троттера [30], скрытое генетическое разнообразие – имеющиеся в популяции генетические вариации, которые обычно не заметны в фенотипе. При сильных возмущениях система может потерять свою устойчивость, и тогда эффекты, связанные со скрытыми генетическими вариациями, могут проявиться в фенотипе.

Биологические системы организмов весьма устойчивы к мутационным нарушениям, генетической рекомбинации и возмущениям среды, такая устойчивость позволяет накапливать генетические вариации в скрытом состоянии. Считается, что СГВ вносит вклад в эволюционный ответ на изменения условий среды и последующий долговременный отбор. Это происходит, когда изменения условий среды ведут к сбоям в механизмах помехо-

устойчивости генома. Это ведет к тому, что скрытые до того мутации проявляются на уровне фенотипа, следовательно, становятся доступными для действия отбора [14, 31].

В ряде работ этот аргумент находит поддержку. Особи табачного бражника *Manduca sexta* с мутантным фенотипом черного цвета (нормальные особи зеленые) демонстрируют разные уровни температурной чувствительности: некоторые особи после воздействия теплового шока становятся зелеными [5]. Авторы исследования произвели селекцию этих типов и успешно основали две линии – одну с выраженной температурной чувствительностью, другую без нее.

Другой пример – эволюция глаз пещерных рыбок мексиканских тетр *Astyanax mexicanus* [9]. Для них триггером изменений в развитии может быть перенос рыб в среду пещеры. В этих условиях рыбы испытывают физиологический стресс, ведущий к нарушению функции шаперона Hsp90. Как следствие, проявляется накопленная СГВ: появляются особи как с маленькими, так и с большими глазами. Очевидно, в условиях пещеры преимущество получают мелкоглазые или незрячие формы. Постепенно в ходе отбора в новой среде генетическое разнообразие снижается, остаются только мелкоглазые формы.

Следовательно, СГВ, способствующие накоплению изменений генома в процессе стабилизирующего отбора, при резком изменении среды могут обеспечивать изменения фенотипа.

3.2. Гены – "фенотипические конденсаторы"

В недавнее время были выявлены биомолекулярные механизмы, ответственные за удержание генетической вариабельности именно в скрытой форме, нарушение таких механизмов может эту вариабельность высвобождать [32]. Уоддингтону удалось одному из первых "высвободить" СГВ в экспериментах. Работы в этом направлении привели к формированию понятия "фенотипического конденсатора" [6].

Фенотипический конденсатор – это биологический триггерный механизм, способный при определенных условиях активировать СГВ [6]. Понятие появилось по аналогии с электрическим конденсатором, который накапливает, хранит и отдает заряд. Некоторые такие конденсаторы – это протеины и РНК, кодируемые соответствующими генами. В норме они повышают устойчивость развития, блокируя работу некоторых генов, и поэтому их дисфункция приводит к проявлению СГВ.

Как отмечают Мэйзел и Сигал [32], существует, по крайней мере, три основанных на анализе мутаций подхода к изучению устойчивости и канализированности развития, с использованием фенотипических конденсаторов. Первый подход – скрининг всего генома на наличие генетических нарушений, влияющих на разброс характеристик рассматриваемого признака. Такие работы проведены на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и на арабидопсисе *Arabidopsis thaliana* [10] (см. также [32] и ссылки там).

Второй подход сосредотачивает внимание на конкретной модельной системе в процессе ее эмбрионального развития при воздействии разнообразных возмущений. Хорошим модельным объектом оказалось эмбриональное развитие вульвы у нематод рода *Caenorhabditis*. Эмбриогенез этого органа у нематод в норме жестко детерминирован конкретным порядком клеточных делений. Нарушение развития вульвы у *C. elegans* из-за мутаций или резкого изменения условий среды выявляет вариабельность в молекулярных механизмах клеточных сигнальных путей[3] [33]. Компенсаторные взаимодействия между этими сигнальными путями обеспечивают стабильное развитие фенотипа [33].

При третьем подходе рассматриваются определенный вид возмущений с хорошо изученным эффектом и разнообразные биологические системы, которые ему подвергаются. Широко известный пример – белок теплового шока, шаперон Hsp90, влияющий на многие процессы развития [6]. Наиболее хорошо он изучен у дрозофилы *(Drosophila melanogaster)*. Дисфункция Hsp90 ведет к проявлению скрытого генетического разнообразия для различных групп эволюционно далеких организмов: дрожжей, мух, позвоночных и некоторых растений [9].

Таким образом, современные молекулярно-генетические исследования демонстрируют, что канализированность реализуется функционированием фенотипических конденсаторов. Они демпфируют генотипические возмущения при нормальных условиях, тем самым способствуя накоплению СГВ. В случаях, когда нормальное функционирование такого конденсатора нарушается, наблюдается увеличение фенотипического разнообразия.

4. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АССИМИЛЯЦИЯ В ПРИРОДЕ

Уоддингтон показал, что искусственный отбор фенотипа, который проявляется лишь у нескольких особей после негенетических возмущений, может приводить к генетическому закреплению признака [22]. Позже другие исследователи наблюдали сходные эффекты для различных признаков, причем у разных видов [5, 34, 35]. Таким образом, ис-

[3] Сигнальный путь в случае клеток рассматривается как последовательность взаимодействующих молекул, посредством которых информация от клеточного рецептора передается внутри клетки.

кусственный отбор может превращать исходный фенотип через его альтернативные нестабильные варианты в новый стабильный фенотип. По результатам наблюдений природных популяций можно заключить, что во многих случаях появление фенотипа, отличающегося от предкового, может способствовать появлению новых, генетически зафиксированных адаптивных признаков [34]. Так, суровые среды обитания усиливают фенотипические различия между различными линиями плодовых мух, а увеличение температуры при отсутствии затенения приводит к увеличению частоты отклонений от нормы по морфологическим признакам [34].

Связь между устойчивостью и пластичностью может быть особенно важна для эволюции [7, 35]. Большое разнообразие фенотипов, образуемое за счет пластичности, может увеличивать выживаемость популяции в новых, враждебных для нее средах, что позволяет выигрывать время и накапливать адаптивные мутации [4]. Кратковременные возмущения, снижающие устойчивость, также могут делать в норме стабильные фенотипы пластичными, что создает материал для действия естественного отбора. Это может приводить к преимуществу нового фенотипа, или способствовать развитию механизма постепенного ответа – так называемого “генетического приспособления”, в том числе и в отсутствие исходных возмущений [5].

4.1. Фенотипическая пластичность в популяциях: наблюдения и эксперименты

В последние десятилетия выполнено немало работ по полевым исследованиям и экспериментам с популяциями разных организмов с целью охарактеризовать фенотипическую пластичность и канализированность [36]. Пластичность может способствовать адаптации на примере различных фенотипов (см. [13] и ссылки там). В качестве некоторых примеров можно привести вариации поверхностного слоя клеток жабр рыб семейства цихлид *Cichlidae* [11], характера окраски рачков *Daphnia melanica*, размера головы змей *Notechis scutatus* [37]. Несмотря на множество подобных примеров, роль феномена пластичности в механизмах адаптивной эволюции не является общепризнанной. До сих пор не известно, представляют ли собой данные наблюдений природных популяций или результатов искусственного отбора просто нетипичные отклонения, или же они указывают на общие механизмы адаптивной эволюции [35].

Способность к ускоренной фенотипической адаптации путем изменения пластичности может играть важную роль в долговременной устойчивости вида. Внезапные изменения среды часто происходят при инвазиях чужеродных видов, а также при колонизациях новых местообитаний.

Успех колонизаций, а именно природных инвазий или искусственных интродукций может зависеть от уровня пластичности, реализуемой в процессе адаптации к новым биотопам за пределами сложившегося ареала вида [36]. Вариабельность генетической пластичности обычно наблюдается в пределах популяции или среди нескольких популяций вида. При этом популяции, заселяющие новые или экстремальные биотопы, часто (но не всегда) демонстрируют повышенную пластичность [11].

4.2. Ассимиляция генов в популяциях: наблюдения и эксперименты

Все больше фактов свидетельствует о том, что признаки, проявляющиеся при действии негенетических (средовых или экспериментальных) факторов, важны для эволюционных инноваций. Во-первых, теоретические исследования показывают, что ассимиляция может происходить в различных условиях [13, 15, 38, 39]. Во-вторых, эксперименты в лабораторных условиях также показывают ее возможность [5, 6, 23]. В-третьих, исследования природных популяций свидетельствуют, что генетическая ассимиляция признаков, вызванная негенетическими факторами, не является редкостью [31, 40].

Эксперименты с недавно возникшей, малой популяцией показывают, что сильный искусственный отбор может способствовать быстрым изменениям фенотипа ([15] и ссылки там). Часто такие изменения достигают значений нескольких стандартных отклонений от, условно говоря, “среднего” фенотипа в течение нескольких десятков поколений [41]. Для больших популяций, испытывающих стремительные изменения условий среды в месте своего обитания, постоянный сильный направленный отбор может привести к адаптации за счет редкой аллели. Однако если соответствующий ген в гомозиготном состоянии приводит к сильному снижению приспособленности, это может помешать фиксации аллели в новых условиях, и она будет элиминирована ([15] и ссылки там). Стоит также отметить, что большие популяции при резком изменении условий среды могут распадаться на несколько, с различными фенотипами и генотипами [42], причем для каждой из новых популяций верны указанные закономерности. Например, группы организмов с генетически контролируемой право- и левосторонней симметрией тела, часто развиваются от предковых групп, у которых направление симметрии пластично, т.е. генетически не закреплено [40]. Это в ряде случаев выражается для множества признаков, например, стороны, на которой развиваются глаза у плоских рыб (Pleuronectiformes), или стороны с более развитой передней клешней у десятиногих раков (Thalassinidea) ([40] и ссылки там). Это свидетель-

ствует, что генетическая ассимиляция варианта асимметрии признака изначально зависит от ненаследственных факторов, поскольку не детерминируется генетически. Наблюдения зависимости фенотипических и генотипических вариаций от условий среды (совместно с анализом генотипических вариаций в пределах нормы реакции) позволяют исследовать феномен канализированности и генетической ассимиляции в условиях нетипичных изменений среды.

Детальный анализ идеи генетической ассимиляции показывает, что для таковой требуется фенотипическая пластичность – способность одного генотипа давать различные фенотипы под воздействием факторов среды [31, 43]. Разнообразие ответов на внешние возмущения может также рассматриваться с позиций СГВ, которая способна проявляться в ответ на стрессирующие возмущения среды. Предполагается, что СГВ накапливается за счет нейтрального дрейфа и остается в скрытом состоянии до возмущающего воздействия [14].

Когда СГВ накапливаются, это вызывает увеличение вариантов генетического фона, в рамках которого могут проявляться новые мутации. Таким образом, появление новой мутации будет зависеть от генетического фона: могут быть варианты фона, где она будет иметь частичный эффект, будет полностью проявляться, или где она вовсе не будет вызывать какого-либо эффекта. Разнообразие вариантов генетического фона дает популяции как целому доступ к новым фенотипам [24]. Этот общий аргумент в пользу вовлеченности СГВ в эволюционные процессы был отражен в математических моделях так называемых нейтральных генных сетей в генотипическом пространстве (позднее названых генотипическими сетями), и находит некоторую поддержку в экспериментальных данных ([20], см. обзор [7]).

Эмпирические исследования показывают, что для эволюционной истории инвазивных видов характерны нарушения среды обитания (см. обзор [8]). Таким нарушениям соответствуют перемены направления отбора. В рамках эволюционной генетики предполагается, что профили флуктуирующего во времени отбора могут приводить к возникновению генетических архитектур трех типов. Если изменения среды обитания стремительны, преимущество имеют генетические архитектуры, соответствующие неспециализированному фенотипу, т.е. “генералисты”. Когда изменения внешних условий происходят часто, преимущества имеют быстро эволюционирующие популяции. Наконец, если такие изменения редки – оптимизация приспособленности популяции происходит в сторону “специалистов” за счет единственного “надежного” фенотипа. Балдуин [4], Симпсон [44], а также Уоддингтон [22] предполагали, что фенотипическая пластичность может быть выгодна при появлении новых условий.

Наблюдения Уоддингтона, что искусственный отбор способен приводить к генетической ассимиляции редких фенотипов, позволяют ожидать сходного эффекта от действия естественного отбора. Наблюдения в природе и эксперименты, когда стрессирующие воздействия на популяции приводили к генетической ассимиляции, подтверждают такие ожидания. Однако оценка значимости таких механизмов в эволюции требует дальнейших исследований.

5. КАНАЛИЗИРОВАННОСТЬ В ИСКУССТВЕННОМ ОТБОРЕ МАКРОМОЛЕКУЛ

Соотношения между генотипом и фенотипом, которые лежат в основе многих разбираемых в этой статье аспектов развития концепций Уоддингтона, могут быть отслежены и для соотношений структуры и функций РНК и полипептидов.

5.1. “Фенотипическая” пластичность и устойчивость к мутациям формы молекул РНК

Первым, кто обратил внимание на применимость концепции канализированности к эволюции РНК, был Уолтер Фонтейн [19]. Известно, что первичная структура молекулы РНК (последовательность оснований) определяет в конечном итоге варианты ее геометрии (конформеры), т.е. вторичную и третичную структуры. Именно пространственная структура молекулы (ее форма и расположение активных центров) ответственна за ее функции (см., напр., [45]). Соответственно, как указал Фонтейн, с эволюционных позиций можно интерпретировать последовательность оснований как “генотип”, который подвергается мутациям, а форму молекулы (основа ее функций) как ее фенотип, подверженный возмущениям среды. Ключевым для рассуждений Фонтейна было то наблюдение, что отнюдь не всякая мутация данной РНК приводит к изменению ее конформации – вариантов конформеров может быть меньше, чем возможных последовательностей данной длины. Он показал численными экспериментами, что так понимаемое соотношение “генотип–фенотип” для РНК позволяет исследовать молекулярную эволюцию в понятиях фенотипической пластичности, эпистаза[4] и канализированности.

Известные в эволюционной биологии понятия канализированности к возмущениям факторов среды и к генетическим возмущениям на уровне РНК понимаются так: средовая канализированность – это устойчивость формы молекулы к шуму факторов среды, а генетическая канализирован-

[4] Эписта́з — тип взаимодействия генов, при котором аллели одного гена подавляют проявление аллелей других генов.

ность – это устойчивость формы молекулы к мутациям генотипа.

Ключевое обобщение своих исследований Фонтэйн сформулировал как представление о пластогенной конгруэнтности (plastogenetic congruence) [19]. Это понятие отражает коррелированность, сопряженность низкой фенотипической пластичности и низкой генетической вариабельности (нечувствительности к мутациям). Для молекулы РНК канализированность к факторам среды – это редукция пластичности посредством приобретения большей устойчивости, приводящая к единственности формы молекулы (что соответствует глубокому минимуму свободной энергии). Средовая канализированность влечет за собой генетическую канализированность в виде сокращения фенотипической новизны, возможной посредством мутаций.

При пластогенной конгруэнтности генетическая канализированность обеспечивает отбор в направлении большей канализированности к факторам среды как побочный продукт. Сходная гипотеза была выдвинута Гюнтером Вагнером и соавт. [38] на основании анализа моделей популяционной генетики. А именно: давление отбора, приводящее к редукции пластичности, может быть обусловлено снижением выживаемости (fitness cost) организмов с большей фенотипической пластичностью.

5.2. Пластичность и робастность для рибозимов

В последние годы лаборатория Андреа Вагнера [20, 46] выполнила серию работ по экспериментальному анализу эволюции рибозимов[5]. Общая методология этих экспериментов такова: популяции молекул рибозимов подвергаются направленной эволюции (мутированию с последующим искусственным отбором), при этом отслеживаются разнообразие конкретных последовательностей в популяции, уровень, а также специфика их ферментативной активности.

Для своих экспериментов авторы выбрали хорошо изученный рибозим из бактериальной молекулы-предшественника транспортной РНК для изолейцина. Этот рибозим катализирует сплайсинг интронов группы 1. Он очень устойчив и сохраняет активность в широком диапазоне параметров среды. Авторы рассчитывали, что такой рибозим способен накапливать мутации без потери каталитической активности (т.е. в рамках представлений о СГВ – см. выше).

Для накопления СГВ популяция рибозимов подвергалась мутагенезу, после которого производился отбор молекул, сохранивших исходную активность. Хотя накопленные мутации действительно остались скрытыми и не сказывались на каталитической активности, авторы предположили, что СГВ в этом случае могли бы влиять на скорости искусственного отбора. Далее отбор производился на каталитическую активность с химически модифицированным субстратом этого рибозима [20].

Эволюционные эксперименты “в пробирке” показали, что у популяций рибозимов с предварительно накопленными СГВ модификации каталитической активности были более вероятны, нежели у популяции без СГВ, т.е., условно говоря, они могли быстрее “находить” решение эволюционной задачи. Более того, эксперименты показали, что варианты последовательностей, пригодных для изменения каталитической активности, имелись в больших количествах в популяциях с СГВ. Таким образом, роль СГВ в адаптации к новым условиям была показана на уровне молекулярной эволюции [20, 46].

Последующие эксперименты также показали, что с помощью направленного отбора РНК можно добиться повышения чувствительности отбираемых молекул как к мутациям, так и к возмущениям факторов среды (что определяют как состояние деканализированности) [20, 46].

6. ИДЕИ УОДДИНГТОНА И МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ

В современной системной биологии математические модели создаются на основе эмпирических данных. Далее результаты моделирования верифицируются новыми наблюдениями и экспериментами, дающими новый задел для развития моделей (см. обзоры [17, 47, 48]).

Можно сказать, что стержневыми для данной области являются именно работы по исследованию эволюции эмбриональных ГРС и их молекулярных компонент. Такие работы дополняются исследованиями из смежных областей (например, исследования метаболических сетей и их компонент). Недавние результаты в данной области позволили подвести количественную базу под классические концепции Конрада Уоддингтона об устойчивости индивидуального развития и ассимиляции некоторых мутационных изменений. Более того, появилась возможность развивать эту концепцию дальше в свете новых результатов [18].

6.1. Канализированность в моделях эволюции

Понимание феномена канализированности развития значительно продвинулось вперед в последние годы благодаря развитию эволюционного моделирования (обзор [17, 18]). Ряд различных вычислительных подходов подводил к идее о канализированности, выявляя различные аспекты моделируемых эволюционных механизмов. Мо-

[5] Рибозим – это молекула РНК, обладающая каталитическим действием.

делирование процессов, приводящих к феномену канализированности и устойчивости, – одна из доминирующих тем в области системной биологии.

Исследованиям концепций Уоддингтона в рамках этого направления было посвящено немало работ. Современные теоретические исследования в этой области резонно начать рассматривать с работ Андреа Вагнера, начиная с его первых публикаций [49]. В дальнейшем подход был развит Вагнером и соавт., а также другими исследователями (в частности [12, 13, 20, 24, 29]).

Конкретизируя идеи Уоддингтона и близких к нему авторов, Вагнер использует термин "эпигенетической стабильности" [49]. Он трактует ее как важную составляющую уоддингтоновской канализированности развития на метафорическом эпигенетическом ландшафте. Под ней он понимает такую организацию эпигенетических взаимоотношений в индивидуальном развитии (а именно, особенностей организации ГРС), которая способна сглаживать или компенсировать генные мутации. Однако, поскольку эпигенетическая стабильность, зависящая от особенностей ГРС, сама предопределяется генетически, то естественно ожидать, что и она подвержена действию отбора. В компьютерных экспериментах Вагнер [49] показал, что длительный стабилизирующий отбор приводит к снижению доли мутаций, вызывающих серьезные нарушения паттернов генной экспрессии. Хотя при моделировании приходится абстрагироваться от ряда деталей, вывод о том, что стабилизирующий отбор приводит к эпигенетической стабильности, выглядит весьма правдоподобным.

Многие авторы в этой области рассматривают стабилизирующий отбор как одну из самых значимых эволюционных сил (например, [24, 38, 50]). Его вклад в процесс канализирования (приводящий к фенотипической устойчивости) был показан при моделировании на разных уровнях (особи, популяции). Так, Гаврилец и Хэстингс [50] моделировали ситуацию, когда генотипы производят фенотипы с различающейся чувствительностью к внутренним возмущениям процессов индивидуального развития (так называемый "шум развития"), и показали, что под действием стабилизирующего отбора канализированность развития усиливается. Моделирование на популяционно-видовом уровне в работе Вагнера и соавт. [38] показало, что канализированность, рассматриваемая в этом случае как нечувствительность по отношению к варьированию факторов среды, увеличивается с ростом силы стабилизирующего отбора. Однако нечувствительность по отношению к факторам "шума" из-за мутационного процесса увеличивается лишь ограниченно.

6.2. Канализированность и генетическая ассимиляция в моделях

В ходе классического эксперимента Уоддингтона 1953 г. личинки мухи-дрозофилы подвергались тепловому шоку, в том числе особи, представляющие фенокопии мутации, при которой нет поперечных жилок на крыльях. После отбора данного фенотипа в условиях шока далее он воспроизводился и в отсутствие возмущения. Предполагалось, что появление данных фенотипов определяется вкладом множества генов. Оказалось, что отбор в условиях теплового шока увеличивает частоту аллелей, определяющих отсутствие жилок, преодолевая барьер и обусловливая фенотип без жилок также и в отсутствие шока. В попытке альтернативного объяснения Фелконер и МакКей предположили, что тепловой шок понижает порог экспрессии этих генов (пороговая модель [41]), которая предполагает, что если отбор ассимилирующего фенотипа без жилок будет ослаблен, генетической ассимиляции не произойдет.

Джоанна Мейзел в 2004 г. [39] опубликовала результаты компьютерных экспериментов с модифицированной моделью Вагнера, выполненные с целью исследовать возможные механизмы, повлиявшие на результаты Уоддингтона. Ее работа продемонстрировала, что эффект генетической ассимиляции (в данном случае, когда приобретаемый признак теряет зависимость от "включающего" действия среды и становится наследуемым) может проявляться и без действия отбора по рассматриваемому признаку. Такой результат соответствует концепции Уоддингтона, но не соответствует объяснениям Фэлконера и МакКея [41].

Эспиноза-Сото и соавт. [13], используя классическую модель Вагнера, показали, что фенотипическая пластичность на уровне эмбриональных ГРС способна обусловливать появление новых паттернов генной активности, дающих селективные преимущества. Генотипы в данной версии модели рассматриваются как порождающие простые эмбриональные ГРС. Основной вывод авторов – генотипы, способные с некоторой вероятностью обусловливать более благоприятные в данных условиях фенотипы, при накоплении мутаций оказываются способными быстрее порождать новые генотипы, для которых более благоприятный фенотип становится генетически обусловленным [13].

Далее Эспиноза-Сото и соавт. изучали взаимоотношения между устойчивостью фенотипа по отношению к мутациям и потенциальной способностью популяции производить новый фенотипический вариант [13]. Они показали, что индивиды, характеризующиеся устойчивостью фенотипа в ответ на негенетические возмущения, эффективнее обеспечивают фенотипическую вариабельность потомков, тогда как мутации такого эффекта не да-

ют. Авторы делают вывод, что негенетические возмущения способны чаще инициировать инновации в случае мутационной устойчивости эмбриональных ГРС.

6.3. Скрытая генетическая вариабельность в моделях

Ивасаки и соавт. [14] методом численных эволюционных экспериментов на популяциях моделей ГРС анализировали, как мутации и факторы среды влияют на уровень СГВ. Разные ГРС в модели рассматривались как отдельные особи, причем популяции ГРС эволюционировали при различных условиях стабилизирующего отбора. В данном случае приспособленность особи количественно оценивалась по близости поведения ГРС к эталонному, при низкой приспособленности шансы элиминации особи были выше. По окончании теста оценивалась их генетическая и фенотипическая вариабельность.

Авторы показали, что СГВ способна накапливаться и приводить к фенотипическому разнообразию в популяциях, внося свой вклад в их эволюцию [14]. Этот результат соответствует широко обсуждаемым гипотезам о роли СГВ в появлении новых признаков [29–32].

6.4. Пластичность и ассимиляция в моделях

Очевидно, что масштабные интродукции, реинтродукции и масштабные полевые исследования очень ресурсоемки. Поэтому использование компьютерных моделей изменчивости популяций помогает выявлять ключевые моменты процессов изменчивости, чтобы затем прицельно их исследовать в полевых условиях.

Численные эволюционные эксперименты Ленде [15, 43] имели целью оценить связь между динамикой фенотипической пластичности и генетической ассимиляцией. Рассматривалась возрастающая пластичность, когда возможны эволюционные преобразования в условиях возмущений параметров среды. Далее пластичность снижалась для фиксации и поддержания нового оптимума. В эксперименте у первого поколения в новой среде приспособленность резко падала, а типичный фенотип имел тенденцию быстро изменяться, чтобы лучше соответствовать новому оптимуму. Последующая адаптация популяции происходила в две фазы. Фаза быстрой эволюции посредством выросшей фенотипической пластичности позволяла фенотипу быстро приблизиться к новому оптимуму. Во второй фазе новый фенотип подвергался более медленному процессу генетической ассимиляции, с уменьшением пластичности. При этом происходил отбор подходящих генных мутаций, формирующих границы нового “канала”.

Лэнде дает свое определение генетической ассимиляции – это уменьшение фенотипической пластичности и замещение этой пластичности отбором генетических мутаций в изменяющейся среде. При этом подходящий фенотип, первоначально предоставленный пластичностью, закрепляется отбором для существования в условиях изменившейся среды. Это первоначальное резкое увеличение пластичности в модели и ее снижение во второй фазе эволюционных изменений весьма принципиальны. Поэтому возникает вопрос о проверке таких выводов в реальных экспериментах с реальными популяциями. Имеющиеся экспериментальные данные (как это позднее отмечал и сам Лэнде) демонстрируют более сложную картину (см. обзор [43 и ссылки там]).

В какой степени эволюционная история фенотипической пластичности может влиять на скорость адаптации к новым условиям среды? Является ли такая пластичность условием для генетической ассимиляции, или же изменения условий среды вызывают ее, увеличивая вероятность генетических изменений? Жоанна Фёрст [16], используя модель Вагнера, попыталась ответить на эти вопросы. Она, постоянно варьируя параметры среды, сравнивала популяцию, проходящую отбор на фенотипическую пластичность, с популяцией в константных условиях. Было показано, что эволюционная предыстория фенотипической пластичности может сокращать время проявления тех или иных фенотипов в результате новых мутаций и рекомбинаций. Иначе говоря, популяция, отбиравшаяся на фенотипическую пластичность, быстрее адаптируется в новой среде, и чем более жестким был такой отбор, тем быстрее идет адаптация. Вероятно, фенотипическая пластичность играет роль краткосрочной альтернативы и может облегчать адаптацию и эволюцию генотипа в дальнейшем. Как отмечает Фёрст [16], процесс адаптации популяции к новой среде предполагает в конечном итоге процессы генетической ассимиляции по Уоддингтону.

Таким образом, согласно современным системным исследованиям, когда результаты компьютерного моделирования верифицируются последующими экспериментами, генетическая ассимиляция должна существенно зависеть от таких факторов, как фенотипическая пластичность, СГВ, а также канализированность по Уоддингтону.

7. РАСШИРИТЕЛЬНЫЕ ТОЛКОВАНИЯ ИДЕЙ УОДДИНГТОНА

Возрастающий интерес к концепциям Уоддингтона в последние десятилетия нашел свое выражение и в попытках расширительных толкований и обобщений идей канализации и ассимиляции. Здесь уместно упомянуть работы Евы Яблóнки (в соавторстве с Мэрион Лэмб), где концепция асси-

миляции распространяется на механизмы эпигенетического наследования в эволюции, в частности, на передачу "негенетической наследственности" на уровне поведения в эволюции животных (известная монография [51]). Труды Яблонки привлекли внимание эволюционистов, хотя и оцениваются неоднозначно [52]. Сама Яблонка всегда уделяла внимание концепциям Уоддингтона (см., например, недавнюю статью [53]).

В этой связи интересно отметить, что именно Уоддингтон предложил в 1942 г. термины эпигенотип и эпигенетика, которые он использовал в качестве концептуальной модели взаимодействия генов со своим окружением при формировании фенотипа [54]. В настоящее время эпигенетика привлекает все большее внимание, число публикаций по этой тематике растет стремительно (см., например, недавние обзоры [55, 56]). Отметим здесь же, что идея эпигенетики в последнее время активно развивается в области медицинской биологии (например, [57] и ссылки там).

Еще одним из направлений, где используются идеи Уоддингтона, является исследование гомеореза[6] и устойчивости гомеостаза в процессе онтогенеза (см., например, [58]). Детальное рассмотрение этой обширной области биологии развития выходит за рамки нашего обзора.

8. ИДЕИ УОДДИНГТОНА ЗА ПРЕДЕЛАМИ БИОЛОГИИ

Как уже говорилось выше, Уоддингтон, развивая идею канализированности, ввел понятие эпигенетического ландшафта, метафорически отображающего канализированное развитие организма и влияние на развитие внутренних и внешних возмущений – см. рис. 1 [2, 25–28, 59]. Гильберт оценил ее как одно из средств интеграции генетики, эмбриологии и теории эволюции [26]. Визуализация эпигенетического ландшафта, как способ иллюстрации не только качественных, но и количественных данных, используется и в современных работах (например, [28]).

На создание и развитие Уоддингтоном идеи эпигенетического ландшафта как модели индивидуального развития повлияла теория динамических систем, истоки которой связаны с именем А. Пуанкаре. Поэтому можно сказать, что эпигенетический ландшафт – метафора динамической системы (см. [27]). Это влияние особенно заметно в поздних публикациях Уоддингтона. Так, к началу 70-х годов прошлого столетия Уоддингтон писал, что фенотип можно представить в виде ветвящейся системы траекторий, распространяющихся в фазовом пространстве вдоль временной оси [25].

Взгляды Уоддингтона близки современным представлениям о развитии нелинейных динамических систем [59]. Применение концепций нелинейной динамики для понимания функционирования генных сетей дает возможность установить соответствие между ГРС и эпигенетическим ландшафтом Уоддингтона. Последний можно представить как пространство для реализации ГРС, что объясняет множественность и гетерогенность клеточных фенотипов, определяемых одним генотипом.

Концепция эпигенетического ландшафта способствовала разработке французским математиком Рене Томом теории катастроф [21, 60]. Как отмечал сам Том [60], разработке его теории способствовало чтение руководств по эмбриологии, в частности, книг Уоддингтона, представления которого о так называемых "креодах[7]" и "эпигенетическом ландшафте" хорошо укладываются в абстрактную конструкцию его теории. Это, безусловно, впечатляющий случай влияния биологических идей на разработку такой общей математической теории, как теория катастроф.

Отметим также, что развитие компьютерного моделирования в связи с разработками концепций Уоддингтона приводит к результатам, интересным не только биологам, но и перспективным в области эволюционной робототехники [61].

Таким образом, за прошедшие почти восемь десятилетий концепции Конрада Уоддингтона развивались как вглубь, так и вширь, оказывая влияние не только на развитие эволюционной биологии, но и на кибернетику, некоторые разделы компьютерных наук и математики.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа по подразделам 4 и 5 проводилась в рамках государственного задания ФАНО России (проект № 01201351572). Исследование по остальным разделам выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-18-01536).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schmalhausen I.I.* Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection. Chicago. University of Chicago Press. 1949.

[6] Гомеорез – существование определенных онтогенетических путей, приводящих к возникновению стандартных фенотипов независимо от внешней среды и генетических воздействий (см. https://dic.academic.ru/dic.nsf/genetics/1768/).

[7] Креод – структурно-устойчивый путь развития живых систем. Понятие К. введено К. Уоддингтоном (1940) для описания одного из основных свойств развивающихся систем – способности сохранять типичный ход (или результат) развития при наличии существенных естественных или искусственных возмущений, напр. резких колебаний условий внешней среды (см. https://dic.academic.ru/dic.nsf/dic_biology/2671).

2. *Waddington C.H.* The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology. London. Allen and Unwin. 1957.
3. *Rendel J.M.* Canalization of the scute phenotype of Drosophila. Evolution 13: 425–439. 1959. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1959.tb03033.x
4. *Baldwin J.M.* A new factor in evolution. Am. Nat. 30: 441–451, 536–553. 1896.
5. *Suzuki Y., Nijhout H.F.* Evolution of a polyphenism by genetic accommodation. Science. 311 (5761): 650–652. 2006. https://doi.org/10.1126/science.1118888
6. *Rutherford S.L., Lindquist S.* Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. Nature. 396: 336–342. 1998. https://doi.org/10.1038/24550
7. *Siegal M.L., Leu J.Y.* On the nature and evolutionary impact of phenotypic robustness mechanisms. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 45: 496–517. 2014. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091705
8. *Lee C.E., Gelembiuk G.W.* Evolutionary origins of invasive populations. Evol. Appl. 1: 427–448. 2008. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2008.00039.x
9. *Rohner N., Jarosz D.F., Kowalko J.E., Yoshizawa M., Jeffery W.R., Borowsky R.L., Lindquist S., Tabin C.J.* Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. Science. 342: 1372–1375. 2013. https://doi.org/10.1126/science.1240276
10. *Hall M.C., Dworkin I., Ungerer M.C., Purugganan M.* Genetics of microenvironmental canalization in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 13717–13722. 2007. https://doi.org/10.1073/pnas.0701936104
11. *Chapman L.J., Galis F., Shinn J.* Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: Hypoxia–induced trade–offs in the morphological traits of an African cichlid. Ecol. Lett. 3 (5): 387–393. 2000. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00160.x
12. *Siegal M.L., Bergman A.* Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99: 10528–10532. 2002. https://doi.org/10.1073/pnas.102303999
13. *Espinosa-Soto C., Martin O.C., Wagner A.* Phenotypic plasticity can facilitate adaptive evolution in gene regulatory circuits. BMC Evol. Biol. 11: 5. doi:. 2011a. https://doi.org/10.1186/1471–2148–11–5
14. *Iwasaki W.M., Tsuda M.E., Kawata M.* Genetic and environmental factors affecting cryptic variations in gene regulatory networks. BMC Evol. Biol. doi:. 2013. https://doi.org/10.1186/1471–2148–13–91
15. *Lande R.* Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. J. Evol. Biol. 22: 1435–1446. 2009. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01754.x
16. *Fierst J.L.* A history of phenotypic plasticity accelerates adaptation to a new environment. J. Evol. Biol. 24:1992–2001. 2011. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02333.x
17. *Spirov A., Holloway D.* Using EA to study the evolution of GRNs controlling biological development. In: *Noman N., Iba H.* eds. Evolutionary Algorithms in Gene Regulatory Network Research. Wiley Interscience. 2015. pp. 240–268. https://doi.org/10.1002/9781119079453.ch10
18. *Spirov A.V., Sabirov M.A., Holloway D.M.* Systems evolutionary biology of Waddington's canalization and genetic assimilation. In: Evolutionary Physiology and Biochemistry – Advances and Perspectives, Levchenko V.F. ed. InTech Press. 2018. pp. 167–185. https://doi.org/10.5772/intechopen.73662
19. *Ancel L., Fontana W.* Plasticity, evolvability and modularity in RNA. J. Exp. Zool. 288: 242–283. 2000. https://doi.org/10.1002/1097-010X(20001015)288
20. *Hayden E.J., Ferrada E., Wagner A.* Cryptic genetic variation promotes rapid evolutionary adaptation in an RNA enzyme. Nature. 474: 92–95. 2011. https://doi.org/10.1038/nature10083
21. *Том Р.* Структурная устойчивость и морфогенез. М. Логос. 2002. [René Thom. *Stabilité structurelle et morphogenèse*, InterÉditions, Paris, 1972].
22. *Waddington C.H.* Canalization of development and the inheritance of acquired characters. Nature. 150: 563–565. 1942. https://doi.org/10.1038/150563a0
23. *Waddington C.H.* Genetic assimilation of the bithorax phenotype. Evolution 10: 1–13. 1956. https://doi.org/0.1111/j.1558-5646.1956.tb02824.x
24. *Wagner A.* The role of robustness in phenotypic adaptation and innovation. Proc. Biol. Sci. 279: 1249–1258. 2012. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2293
25. *Уоддингтон К.Х.* Основные биологические концепции. На пути к теоретической биологии. I. Пролегомены. Ред. Астауров Б.Л. М. Мир. 1970. [*Waddington C.H.* (Editor). Towards a Theoretical Biology. vol. I. Edinburgh: Edinburgh University Press. 1968-72].
26. *Gilbert S.F.* Epigenetic landscaping: Waddington's use of cell fate bifurcation diagrams. Biol. Philos. 6: 135–154. 1991. https://doi.org/10.1007/BF02426835
27. *Slack J.M.M.* Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? Nature Reviews Genetics. 3: 889–695. 2002. https://doi.org/10.1038/nrg933
28. *Jamniczky H.A., Boughner J.C., Rolian C., Gonzalez P.N., Powell C.D., Schmidt E.J., Parsons T.E., Bookstein F.L., Hallgrímsson B.* Rediscovering Waddington in the post–genomic age. Operationalising Waddington's epigenetics reveals new ways to investigate the generation and modulation of phenotypic variation. Bioessays. 32: 1–6. 2010. https://doi.org/10.1002/bies.200900189
29. *Zheng J., Payne J.L., Wagner A.* Cryptic genetic variation accelerates evolution by opening access to diverse adaptive peaks. Science. 365 (6451): 347–353. 2019. https://doi.org/10.1126/science.aax1837
30. *Masel J., Trotter M.V.* Robustness and Evolvability. Trends Genet. 26 (9): 406–414. 2010. https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.06.002
31. *Pigliucci M., Murren C.J.* Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? Evolution. 57 (7): 1455–1464. 2003. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00354.x

32. *Masel J., Siegal M.L.* Robustness: mechanisms and consequences. Trends Genet. 25 (9): 395–403. 2009. https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.07.005

33. *Braendle C., Felix M.A.* Plasticity and Errors of a Robust Developmental System in Different Environments. Dev. Cell 15: 714–724. 2008. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.09.011

34. *Kelly M.* Adaptation to climate change through genetic accommodation and assimilation of plastic phenotypes. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 374 (1768): 20180176. 2019. https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0176

35. *Levis N.A., Pfennig D.W.* Plasticity-led evolution: A survey of developmental mechanisms and empirical tests. Evol. Dev. doi.org/. 2019. https://doi.org/10.1111/ede.12309

36. *Price T., Sol D.* Introduction: Genetics of colonizing species. Am. Nat. 172: S1–S3. 2008. https://doi.org/10.1086/588639

37. *Aubret F., Shine R.* Genetic assimilation and the postcolonization erosion of phenotypic plasticity in island tiger snakes. Curr. Biol. 19: 1932–1936. 2009. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.061

38. *Wagner G.P., Booth G., Bagheri–Chaichian H.* A population genetic theory of canalization. Evolution. 51: 329–347. 1997. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1997.tb02420.x

39. *Masel J.* Genetic assimilation can occur in the absence of selection for the assimilating phenotype, suggesting a role for the canalization heuristic. J. Evol. Biol. 17 (5): 1106–1110. 2004. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00739.x

40. *Palmer A.R.* Symmetry breaking and the evolution of development. Science. 306 (5697): 828–833. 2004. https://doi.org/10.1126/science.1103707

41. *Falconer D.S., Mackay T.F.C.* Introduction to Quantitative Genetics. Essex. Longman. 1996.

42. *Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В.* Краткий очерк теории эволюции. М. “Наука”. 1977. [*Timofeev-Ressovsky N.V., Vorontsov N.N., Yablokov A.V.* Kratkiy ocherk teoriyi evoluciyi [Short Essay on Evolution Theory]. Moscow. Nauka. 1977.]

43. *Lande R.* Evolution of phenotypic plasticity in colonizing species. Mol. Ecol. doi.org/. 2015. https://doi.org/10.1111/mec.13037

44. *Simpson G.G.* The Baldwin effect. Evolution. 7: 110–117. 1953. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1953.tb00069.x

45. *Тихонов Д., Жоров Б.* Методы молекулярного моделирования в изучении строения ионных каналов и их модуляции лигандами. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105: 1333–1348. 2019. *Tikhonov D., Zhorov B.* Methods of Molecular Modeling in Studies of Ion Channels and their Modulation by Ligands. Russ. J. Physiol. 105: 1333–1348. 2019. (In Russ.)] https://doi.org/10.1134/S0869813919110116

46. *Hayden E.J., Wagner A.* Environmental change exposes beneficial epistatic interactions in a catalytic RNA. Proc. R. Soc. B. 279: 3418–3425. 2012. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0956

47. *Spirov A.V., Holloway D.M.* New approaches to designing genes by evolution in the computer. In Real–World Applications of Genetic Algorithms. In: InTech Press (O. Roeva ed.). 2012. https://doi.org/10.5772/36817

48. *Spirov A.V., Holloway D.M.* Using evolutionary computations to understand the design and evolution of gene and cell regulatory networks. Methods. 62: 39–55. 2013. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.013

49. *Wagner A.* Does evolutionary plasticity evolve? Evolution. 50: 1008–1023. 1996. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02342.x

50. *Gavrilets S., Hastings A.* A Quantitative–Genetic Model for Selection on Developmental Noise. Evolution. 48: 1478–1486. 1994. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02190.x

51. *Jablonka E., Lamb M.J.* Evolution in Four Dimensions: Genetic, Epigenetic, Behavioral, and Symbolic Variation in the History of Life. MIT Press. 2005.

52. *Dickens T., Rahman Q.* The extended evolutionary synthesis and the role of soft inheritance in evolution. Proc. Biol. Sci. 279 (1740): 2913–2921. 2012. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0273

53. *Jablonka E., Noble D.* Systemic Integration of Different Inheritance Systems. Current Opinion in Systems Biology. 13: 52–58. 2019. https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.10.002

54. *Waddington C.H.* The epigenotype (1942). Int. J. Epidemiol. 41 (1): 10–13. 2012. https://doi.org/10.1093/ije/dyr184

55. *Noble D.* Conrad Waddington and the origin of epigenetics. J. Exp. Biol. 218: 816–818. 2015. https://doi.org/10.1242/jeb.120071

56. *Duclos K.K., Hendrikse J.L., Jamniczky H.A.* Investigating the evolution and development of biological complexity under the framework of epigenetics. Evol. Dev. e12301. doi:. 2019. https://doi.org/10.1111/ede.12301

57. *Cavalli G., Heard E.* Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease, Nature. 571: 489–499. 2019. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0

58. *Котолупов В.А., Левченко В.Ф.* Мультифункциональность и гомеостаз. Закономерности функционирования организма, важные для поддержания гомеостаза. Ж. эвол. биохим. физиол. 45: 443–451. 2009. [*Kotolupov V.A., Levchenko V.F.* Multifunctionality and homeostasis. Regularities of the body’s functioning, important for maintaining homeostasis. J. Evol. Biochem. and Physiol. 45: 538–547. 2009. https://doi.org/10.1134/S0022093009040148

59. *Озернюк Н.Д., Исаева В.В.* Эволюция онтогенеза. М. КМК. 2016.

60. *Том Р.* Комментарии. Динамическая теория морфогенеза. На пути к теоретической биологии. I. Пролегомены (Ред. Астауров Б.Л.) М. Мир. 1970.

61. *Kriegman S., Cheney N., Bongard J.* How morphological development can guide evolution. Sci. Rep. 8 (1): 13934. 2018. https://doi.org/10.1038/s41598–018–31868–7

CONCEPTS OF CANALIZATION AND GENETIC ASSIMILATION IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY: CURRENT APPROACHES AND STUDIES

A. V. Spirov[a,#], V. F. Levchenko[a,##], and M. A. Sabirov[a,###]

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

[#]*e-mail: alexander.spirov@gmail.com*

[##]*e-mail: lew@lew.spb.org*

[###]*e-mail: ne-merr-eno@mail.ru*

The two related parts of the Conrad Waddington's proposal, the concepts of canalization and genetic assimilation, formalized yet in the 1940s continue to arouse great interest among professionals, representing one of the most impressive examples of the transdisciplinary development of ideas.

Individual development of any organism proceeds in the context of permanent and unavoidable changes in the factors of the external environment and internal perturbations of molecular and physiological processes. Considering that in any population organisms differ genetically, the implementation of the genetic program must therefore be relatively resistant to genetic variability.

According to Waddington, individual development is canalized, i.e. occurs within a certain canal of environmental conditions that limits the variability in the developmental trajectory. However, strong environmental changes and considerable internal perturbations are able to "throw" some trajectories outside the walls of this canal. As a result, aberrant phenotypes may emerge, with some of them being able to get involved in subsequent selection. If the conditions that systematically lead to such an aberrant development persist, the features of these phenotypes can be fixed genetically by selection after a few generations. In other words, selection leads to the emergence of phenotype variants, most genetically suitable to the current circumstances, in which developmental trajectories are altered appropriately. Populations of organisms with altered trajectories and different genotypes continue to exist even when the impact of perturbing factors ceases. Waddington called the mechanism underlying the "same phenotype but different genotypes" evolutionary scenario genetic assimilation.

Recent outcomes of evolutionary systems biology have provided a quantitative basis for Waddington's classical concepts on the robustness of individual development and genetic assimilation. It has become possible to further develop these concepts in the light of new experimental results and theoretical ideas. Particular progress has been achieved in analyzing the molecular machinery of canalization. This paper aims to discuss the results obtained in this area of systems biology by computer modeling in comparison with experimental data.

Keywords: Waddington's concepts, canalization, genetic assimilation, phenotypic plasticity, modeling of gene networks

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 17–32

ОБЗОРЫ

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПОЗВОНОЧНЫХ – ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ

© 2021 г. И. П. Григорьев[1,*], Д. Э. Коржевский[1]

[1] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Институт экспериментальной медицины", Санкт-Петербург, Россия*

**e-mail: iemmorphol@yandex.ru*

Поступила в редакцию 12.02.20 г.
После доработки 19.03.20 г.
Принята к публикации 11.04.2020 г.

В обзоре представлены сведения о тучных клетках (мастоцитах), которые присутствуют в ЦНС у различных представителей млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, земноводных и рыб. Подробно рассмотрено их распределение в мозге различных видов животных. У млекопитающих они располагаются чаще всего в сосудистом сплетении, мозговых оболочках, таламусе, медиальном ядре поводка, гипоталамусе и циркумвентрикулярных органах, причем, как правило, в непосредственной близости от сосудов и часто вблизи ликвороносных пространств. Количество их непостоянно и меняется в ходе постнатального онтогенеза и под действием гормональных и иммунных факторов. Описаны различные способы выброса медиаторов из цитоплазматических гранул мастоцитов, которые обеспечивают точечное или диффузное действие на окружающие клетки. Тучные клетки обладают большим числом рецепторов к иммуноглобулинам, многим нейромедиаторам и гормонам, что делает их высокочувствительными к изменениям внешней и внутренней среды организма. Множество медиаторов, содержащихся в мастоцитах, позволяют им вызывать воспалительный, противовоспалительный, иммуно-, васкуло-, глиоцито- и/или нейрономодулирующий эффект, интенсивность и направленность которого зависит от состава и количества экскретируемых медиаторов и способа их выброса, что, в свою очередь зависит от того, какие именно рецепторы на тучных клетках активируются. Тучные клетки контролируют проницаемость гемато-энцефалического и гемато-ликворного барьеров, участвуют в ангиогенезе и, совместно с глиальными клетками, участвуют в регуляции нейровоспаления (которое является ведущим фактором патогенеза ряда нервных и психических заболеваний) и защите ЦНС от патогенных факторов. Тучные клетки мозга играют роль нейроиммунных центров с афферентными и эфферентными функциями, которые связывают периферические органы со специализированными клетками ЦНС и активно участвуют в поддержании гомеостаза ЦНС в физиологических условиях и при действии патологических факторов.

Ключевые слова: тучные клетки, головной мозг, позвоночные, нейровоспаление

DOI: 10.31857/S0044452921010046

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия появились многочисленные данные о влиянии иммунной системы на различные функции нервной системы. Одной из популяций иммунных клеток, которые постоянно присутствуют в центральной нервной системе (ЦНС) являются тучные клетки, или мастоциты. Уже в силу своей локализации они могут быть и действительно являются посредниками влияний иммунной системы на нервную. Однако этим, по-видимому, их роль в ЦНС не ограничивается. В настоящем обзоре рассмотрены имеющиеся на сегодня данные о механизмах участия тучных клеток в функционировании ЦНС.

Общая характеристика. Тучные клетки были впервые описаны Паулем Эрлихом в 1878 г. в соединительной ткани человека и с тех пор были обнаружены во многих органах позвоночных животных и человека. Выделяют два типа тучных клеток: слизистые, или мукозные и соединительнотканные, или серозные. Их названия отражают преимущественную локализацию в организме: мукозные мастоциты чаще встречаются в слизистой оболочке кишечника и дыхательных путей, а соединительнотканные – в коже, подслизистом слое кишечника и небных миндалинах. Помимо локализации два типа тучных клеток различаются по имеющимся у них протеазам: в серозных мастоцитах человека, мышей и крыс содержится триптаза (КФ 3.4.21.59)

и химаза (КФ 3.4.21.39), в мукозных – только триптаза у человека, только химаза – у крыс и мышей. Имеются различия и по составу некоторых других химических соединений, синтезируемых и секретируемых этими клетками [1].

Методы выявления. В головном мозге человека тучные клетки были выявлены еще в конце XIX века при некоторых нервных заболеваниях. Позже, однако, присутствие мастоцитов в центральной нервной системе либо отрицалось, либо, вплоть до 1970 г., они упоминались в исследованиях лишь эпизодически – их находили редко и в малом числе. Такая ситуация была связана с несовершенством использовавшегося гистохимического метода окраски препаратов анилиновыми красителями (такими, как толуидиновый синий, альциановый синий, крезиловый фиолетовый и ряд других), предложенного еще Эрлихом. Он показал, что при использовании анилиновых красителей цитоплазматические гранулы тучных клеток окрашиваются метахроматически, т.е. отлично от цвета самого красителя, что и позволяет выявлять мастоциты в ткани. Гистохимический метод метахроматического окрашивания используют для выявления тучных клеток по настоящее время, однако выявляемость тучных клеток существенно варьирует при использовании разных анилиновых красителей, различных способах фиксации, зависит от типа тучных клеток, состояния исследуемой ткани, вида животного и т.п.

В настоящее время для выявления тучных клеток на гистологических препаратах мозга чаще используют иммуногистохимическую реакцию на ферменты триптазу, химазу и некоторые другие протеазы, считающиеся специфическими маркерами мастоцитов. Определенная проблема в выявлении тучных клеток в головном и спинном мозге с помощью иммуногистохимической реакции на протеазы заключается в том, что протеазы у человека и животных обладают видоспецифичностью, а набор протеаз тучных клеток у человека и животных различается [2]. В связи с этим при проведении исследования необходима верификация пригодности иммуногистохимического подхода для каждого отдельного вида животных. Что касается человека, то для визуализации тучных клеток в ЦНС иммуногистохимическая реакция на триптазу оказалась наиболее эффективной [3–5]. С помощью иммуногистохимического метода было установлено, что в головном мозге человека встречаются преимущественно тучные клетки соединительнотканного типа (содержащие триптазу и химазу), а клетки мукозного типа (только с триптазой) наблюдаются реже [6, 7].

Структура и биохимическая специфичность. Ультраструктура тучных клеток была подробно описана с помощью электронной микроскопии. Наиболее характерной особенностью мастоцитов является наличие в цитоплазме, наряду с другими органеллами, многочисленных неоднородных мембранных гранул с аморфным и мелкозернистым электронноплотным материалом и вкраплениями кристаллоидных структур. Каких-либо отличий ультраструктуры мастоцитов в головном мозге от таковых в других органах не было обнаружено [8–13].

Цитоплазматические гранулы тучных клеток являются секреторными гранулами, в которых хранится множество различных биологически активных веществ (табл. 1) [14–18]. Следует отметить, что набор медиаторов, которые имеются в тучных клетках, разнится не только в зависимости от органа, в котором они находятся [1], но и в пределах одного и того же органа. Так, в головном мозге в трети тучных клеток не обнаружен гистамин, а во многих не выявлен серотонин [9, 11, 12, 19, 20].

Высвобождение секрета. Содержимое секреторных гранул под действием различных внешних факторов выделяется наружу, причем механизмы этого выброса достаточно многообразны и имеют ряд интересных особенностей. Наиболее известен выброс секрета из гранул путем экзоцитоза, который в данном случае называют дегрануляцией [8, 13, 18] и который развивается в течение периода от полуминуты до несколько минут после стимуляции [21]. Показано, что выброс секрета происходит очень локально – только со стороны действия стимула на тучную клетку, тогда как с другой стороны клетки дегрануляции не наблюдается [22]. Обнаружен также так называемый избирательный (дифференцированный) выброс медиаторов, когда в ответ на определенный стимул изливается не все содержимое гранул, а только некоторые его компоненты, например, только цитокин IL-6, или только васкулярный эндотелиальный фактор роста, или только серотонин и т.д. [5, 16, 23]. Механизмы такого избирательного экзоцитоза пока не изучены.

Кроме этого, в ЦНС обнаружен феномен трансгрануляции, который характеризуется переносом части цитоплазмы мастоцита, содержащей гранулы, непосредственно в цитоплазму прилежащей нервной или глиальной клетки, с формированием своего рода отделяющихся псевдоподий [18, 24].

Присущий тучным клеткам узколокальный экзоцитоз и избирательный экзоцитоз, а также феномен трансгрануляции указывают на способность мастоцитов к точечному и избирательному действию на окружающие клетки. Но дополнительно к этому известно и постоянное (фоновое) воздействие тучных клеток на соседние клетки: показано, что не активированные внешними факторами ма-

Таблица 1. Основные медиаторы тучных клеток

Класс веществ	Медиатор
Биогенные амины	Гистамин, серотонин, дофамин, полиамины
Специфичные для тучных клеток протеазы	Триптаза (КФ 3.4.21.59), химаза (КФ 3.4.21.39), карбоксипептидаза А3 (КФ 3.4.17.1)
Неспецифичные для тучных клеток протеазы	Гранзим В (КФ 3.4.21.79), катепсин В (КФ 3.4.22.1), катепсин С (КФ 3.4.4.9), катепсин D (КФ 3.4.23.5), катепсин Е (КФ 3.4.23.34), катепсин L (КФ 3.4.22.15), арилсульфатаза А (КФ 3.1.6.1), бета-глюкуронидаза (КФ 3.2.1.31), гепараназа (КФ 3.2.1.166)
Цитокины	IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-31, IL-33, фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа)
Факторы роста	Фактор роста нервов, фактор роста фибробластов-2, васкулярный эндотелиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста-бета, нейротрофин-3
Протеогликаны	Серглицин
Мукополисахариды	Гепарин, хондроитинсульфат
Нейропептиды	Гонадотропин-рилизинг-гормон, кортикотропин-рилизинг-гормон, мелатонин, эндорфин, субстанция П, вазоактивный интестинальный пептид, эндотелин-1
Липидные медиаторы	Простагландины D2 и E2, лейкотриены B4 и C4
Прочие	Окись азота

стоциты также выделяют содержимое секреторных гранул, осуществляя постоянное медленное высвобождение компонентов секрета в окружающее пространство (“piecemeal degranulation”). Этот механизм доказан как для млекопитающих, так и рыб, земноводных и птиц (в том числе в головном мозге) [8, 9, 13, 18, 24]. После истощения содержимого секреторных гранул мастоцитов их восполнение происходит в течение 12–24 ч [21].

Благодаря наличию высокоаффинных мембранных рецепторов к иммуноглобулинам E и G (IgE-bound FcεRI и IgG-bound FcγRs) тучные клетки в организме активируются проникшими через эндотелиальный барьер аллергенами, патогенами и токсинами и выделяют из гранул секрет, содержащий соединения, вызывающие воспалительный эффект. Помимо рецепторов к иммуноглобулинам тучные клетки обладают большим количеством рецепторов ко многим нейромедиаторам и гормонам, среди которых ацетилхолин, серотонин, адреналин, АТФ, кортикостероиды, мелатонин, 17β-эстрадиол, прогестерон, тестостерон, паратиреоидный гормон, нейротензин, субстанция П, бета-эндорфин, вазоактивный интестинальный пептид, кортикотропин-рилизинг гормон и ряд других, под действием которых тучные клетки могут вызвать не только воспалительный, но также противовоспалительный или иммуномодулирующий эффекты, выделяя соответствующие медиаторы, состав и количество которых зависят от активирующего агента [5, 16, 17, 23].

Распределение в ЦНС. В ЦНС позвоночных животных тучные клетки были описаны у представителей различных таксонов. Предваряя изложение этих данных, следует заметить, что, помимо позвоночных, гранулярные гемоциты, морфологически сходные с тучными клетками позвоночных и содержащие гепарин, гистамин и триптазу, были обнаружены у некоторых беспозвоночных: в гемолимфе пресноводного рака *Astacus leptodactylus*, триатомового клопа *Rhodnius prolixus* и асцидии *Styela plicata* [25, 26]. Предполагается, что эти клетки являются филогенетическими предшественниками тучных клеток позвоночных.

Рыбы. Клетки с характерными для мастоцитов микроскопическими и гистохимическими особенностями были идентифицированы у бесчелюстных рыб (Agnatha: миксины и миноги), у хрящевых рыб (Chondrichthyes: акулы), у представителей многих семейств костистых рыб (лососевые, карповые, эритриновые и др.). Они были обнаружены в слизистой оболочке кишечника, дерме и жабрах [25, 26]. Что касается присутствия тучных клеток в мозге рыб, то нам известна единственная за последние полвека работа Weiss (1979) [27], в которой с помощью световой и электронной микроскопии уда-

лось выявить мастоциты в головном мозге (в 4 случаях из 56 исследованных особей рыб трех видов). Тучные клетки были сосредоточены в мозговых оболочках щуки (*Esox lucius*) и в мозговых оболочках и гипоталамусе (вокруг крупных кровеносных сосудов, между нейрональными и глиальными волокнами, а также субэпендимально) карпа (*Cyprinus carpio*) и кумжи (*Salmo trutta fario*). Кроме того, тучные клетки наблюдали в мозге костистых рыб после заражения паразитами [28].

Пресмыкающиеся. Исследований тучных клеток у рептилий сравнительно немного, но они были продемонстрированы во всех подгруппах пресмыкающихся (ящерицы, змеи, сцинки, крокодилы, черепахи) [25, 26], в том числе в головном мозге. У китайской трехкилевой черепахи (*Chinemys reevesii*) большое количество гистамин-содержащих тучных клеток было обнаружено в мозговых оболочках [29], а при экспериментальном повреждении коры мозга ящерицы *Podarcis hispanica* тучные клетки (наряду с микроглией) скапливаются в месте поражения [30].

Земноводные. Среди земноводных внутримозговые тучные клетки были описаны у нескольких видов лягушек (*Rana esculenta, Rana pipiens, Rana temporaria* и *Xenopus laevis*) и у жабы *Bufo bufo*: большое их число наблюдается в мягкой мозговой оболочке, сосудистом сплетении и во всех областях головного мозга, особенно в медиальной перегородке, эпиталамусе и гипоталамусе. Как правило, тучные клетки прилегают к кровеносным сосудам или внутреннему слою выстилки мозговых желудочков. Полового диморфизма в распределении тучных клеток в мозге лягушек не было выявлено [10, 31]. В мозге головастиков этих видов лягушек и жаб мастоциты располагаются аналогичным образом, хотя на ранних стадиях они меньше размером и не проявляют метахромазии в отличие от тучных клеток мозга взрослых животных; число мастоцитов прогрессивно растет по мере развития личинки [25]. Помимо лягушек и жаб, тучные клетки описаны в мозге тритонов *Triturus cristatus carnifex* и *Triturus pyrrhogaster*. Если у первого они сосредоточены в мозговых оболочках, то у второго наблюдались, помимо того, также в сосудистом сплетении и ткани мозга вокруг капилляров [32, 33]. У аксолотля (*Ambystoma mexicanum*) тучные клетки в большом количестве наблюдаются в сосудистом сплетении, а также в нейрогипофизе и белом веществе головного мозга. Интересно, что, в отличие от типичной округлой формы, мастоциты мозга аксолотля представляют собой клетки с длинными, тонкими и разветвленными цитоплазматическими отростками [34].

Птицы. О наличии тучных клеток у птиц хорошо известно [25]. В мозге птиц распределение мастоцитов было подробно описано на примере дикой смеющейся горлицы (*Streptopelia roseogrisea*). Наибольшее число мастоцитов отмечено в медиальном ядре поводка, в сосудистом сплетении и мягкой мозговой оболочке. Они также были обнаружены в таламусе, палеостриатуме, эктостриатуме, неостриатуме, гиперстриатуме и слуховой области конечного мозга (поле L) [12, 35]. Особо следует отметить, что, в отличие от тучных клеток в мозге представителей других классов позвоночных, у горлицы в медиальном поводке лишь малая часть мастоцитов (несколько процентов) прилегали к эндотелию сосудов, тогда как большинство их располагалось в нейропиле среди нервных и глиальных клеток и их отростков [35]. Тучные клетки описаны в эпифизе нескольких видов птиц (домашний воробей (*Passer domesticus*), серая цапля (*Ardea cinera*), белолобый гусь (*Anser albifrons*) [36]. В мозге горлицы мастоциты появляются на 13–14-й день эмбрионального развития (в мягкой мозговой оболочке) и количество их растет вплоть до полового созревания (6 мес), после чего снижается [35]. У курицы (*Gallus gallus domesticus*) мастоциты выявлены в сосудистом сплетении, начиная с поздней стадии эмбриогенеза [37].

Млекопитающие. Среди млекопитающих тучные клетки в ЦНС больше всего исследовались у наиболее популярных лабораторных животных – мышей (*Mus musculus*) и крыс (*Rattus norvegicus*). Однако результаты исследований, проведенных на разных линиях этих видов, существенно варьируют. Так, количество тучных клеток в твердой мозговой оболочке мышей линий SJL/J и C3H различалось втрое [38]. В головном мозге мышей линии Swiss Webster тучные клетки были идентифицированы в мягкой и паутинной оболочках мозга и сосудистом сплетении мозговых желудочков, а в собственно ткани мозга – только в таламусе (в значительном количестве, причем у самок значительно больше, чем у самцов) [39–41], у мышей-альбиносов ICR – в таламусе и редко – в медиальном ядре поводка [42], а у мышей C57BL/6, по одним данным, тучные клетки наблюдались в таламусе, гиппокампе и мягкой и паутинной оболочках мозга [43], по другим – помимо перечисленных областей – также в обонятельных луковицах, коре большого мозга, миндалине, гипоталамусе, мозжечке и сосудистом сплетении, причем во всех случаях отмечается преимущественно периваскулярная локализация мастоцитов [44]. В то же время у линии мышей B10.PL тучные клетки были выявлены только в гиппокампе и энторинальной коре [45].

Аналогичный разброс данных существует и по локализации тучных клеток в ЦНС крыс. Так, если у крыс линии Lewis (самок) тучные клетки обнаружены только в таламусе [46], то у белых беспородных крыс и крыс линии Вистар тучные клетки, по-

мимо таламуса, наблюдаются в мягкой и паутинной оболочках мозга, в коре большого мозга – в лобной и теменной коре, причем большинство их располагалось в III, IV и V слоях, а также в гипоталамусе, эпендимной выстилке четвертого желудочка и сосудистом сплетении [9, 39, 47, 48]. У крыс Sprague-Dawley самок мастоциты, помимо перечисленных уже областей, наблюдали также в медиальном ядре поводка и белом веществе мозга (мозолистое тело, бахромка гиппокампа), причем с выраженной асимметрией [20, 49]. У самцов этой линии мастоциты наблюдались в таламусе, срединном возвышении и оболочках мозга, но не в коре мозга или базальных ганглиях [19]. Различие данных, полученных разными авторами, по-видимому, связано как с реальной вариабельностью распределения тучных клеток у разных линий мышей и крыс, так и с различной эффективностью методов, примененных для их обнаружения.

Тучные клетки выявляются в мозге крыс уже в позднем эмбриональном периоде (E15) и вплоть до 11-го дня после рождения они сосредоточены исключительно в области мягкой мозговой оболочки, окружающей промежуточный мозг, и в сосудистом сплетении. Позже, на 11–13-й день постнатального развития эти клетки мигрируют вдоль кровеносных сосудов в кору большого мозга, а также фимбрию гиппокампа и затем в таламус (дорсолатеральное и постеролатеральное ядра) [50, 51]. В ходе постнатального развития – в возрастном периоде 3–30 дней – количество тучных клеток в таламусе и латеральных коленчатых телах прогрессивно растет (примерно в 15–20 раз), достигая максимального уровня к 30-му дню [52, 53], по другим данным – к 14- или 21-му постнатальному дню [10, 54].

Помимо мышей и крыс, тучные клетки были обнаружены в разных областях мозга других грызунов: морской свинки (*Cavia porcellus*), монгольской песчанки (*Meriones unguiculatis*), золотистого хомячка (*Mesocricetus auratus*), шиншиллы (*Chinchilla laniger*) и ряда других видов [14, 39, 47, 55–59]. Наиболее типичная для мозга грызунов локализация тучных клеток представлена на рис. 1.

У других млекопитающих, часто используемых в экспериментальных исследованиях, тучные клетки в ЦНС изучены меньше. По имеющимся данным в ЦНС кролика (*Oryctolagus cuniculus*) и кошки (*Felis catus*) распределение мастоцитов практически одинаково: большое число их обнаружено в мягкой и паутинной оболочке, в коре большого мозга, таламусе и гиппокампе, меньше – в гипоталамусе, самом заднем поле (area postrema) (у кошки – в большом количестве, у кролика – изредка), полосатом теле, бледном шаре, коре мозжечка, срединном ядре шва, эпифизе, сером веществе ствола мозга и спинного мозга, сосудистом сплетении; в белом веществе мозга тучные клетки встречались значительно реже, чем в сером. Кроме того, мастоциты наблюдались у кошки в септальных ядрах, медиальном ядре поводка и латеральном коленчатом теле, а в сосудистом органе терминальной пластинки – только до достижения половой зрелости [10, 11, 14, 55–57, 60]. Есть данные о наличии тучных клеток в мозге собаки (*Canis lupus familiaris*), в частности, в теменной коре мозга, обонятельных луковицах, самом заднем поле и эпифизе [10, 14, 55].

В целом ряде исследований было продемонстрировано наличие и распределение тучных клеток в мозге ежа (*Erinaceus europaeus*). Преимущественным местом расположения мастоцитов были ядра поводка и таламуса, они обнаружены также в сосудистом сплетении, эпендимной выстилке четвертого желудочка мозга, в мягкой и паутинной оболочках мозга и гипоталамусе. Отмечается половой диморфизм в распределении тучных клеток: в таламусе самок их было достоверно больше, чем у самцов [20, 39, 54, 61]. У другого представителя семейства насекомоядных – бурой мускусной землеройки (*Suncus murimus*) тучные клетки также обнаружены в поводке и таламусе, а кроме того, в некоторых септальных и гипоталамических ядрах, причем максимальное их число наблюдалось на пятый постнатальный день, после чего их количество снижалось до уровня взрослых животных [58].

В 1970-е годы были опубликованы работы нескольких независимых исследователей по изучению тучных клеток в ЦНС, проведенные сразу на многих видах млекопитающих. В них были представлены факты о наличии мастоцитов в мягкой и паутинной мозговых оболочках и сосудистом сплетении желудочков мозга у большинства, если не всех исследованных видов животных (серая лисица (Urocyon sp.), саванновая лисица (*Cerdocyon thous*), лев (*Panthera leo*), тигр (*Panthera tigris*), индийский слон (*Elephas maximus*), тупайя (*Tupaia glis*), опоссум (*Didelphis marsupialis*), морской лев (*Zalophus californianus*), различные виды грызунов). Кроме того, у многих животных мастоциты наблюдались также в ядрах поводка, дорсальном таламусе и коре большого мозга (преимущественно в лобной и теменной, в основном в III, IV и V слоях) и эпифизе [14, 39, 54–56]. Мастоциты были описаны в мозге овцы (*Ovis aries*) и коровы (*Bos taurus taurus*). У овцы большое число мастоцитов наблюдается в вентральном таламусе и гипоталамусе, значительно меньше их в медиальном ядре поводка, коре мозга (преимущественно в глубоких слоях), белом веществе, сосудистом сплетении и эпендимной выстилке желудочков мозга, мягкой и паутинной оболочках мозга, эпифизе, медиальных и латеральных коленчатых телах. Отмечается выраженная асимметрия рас-

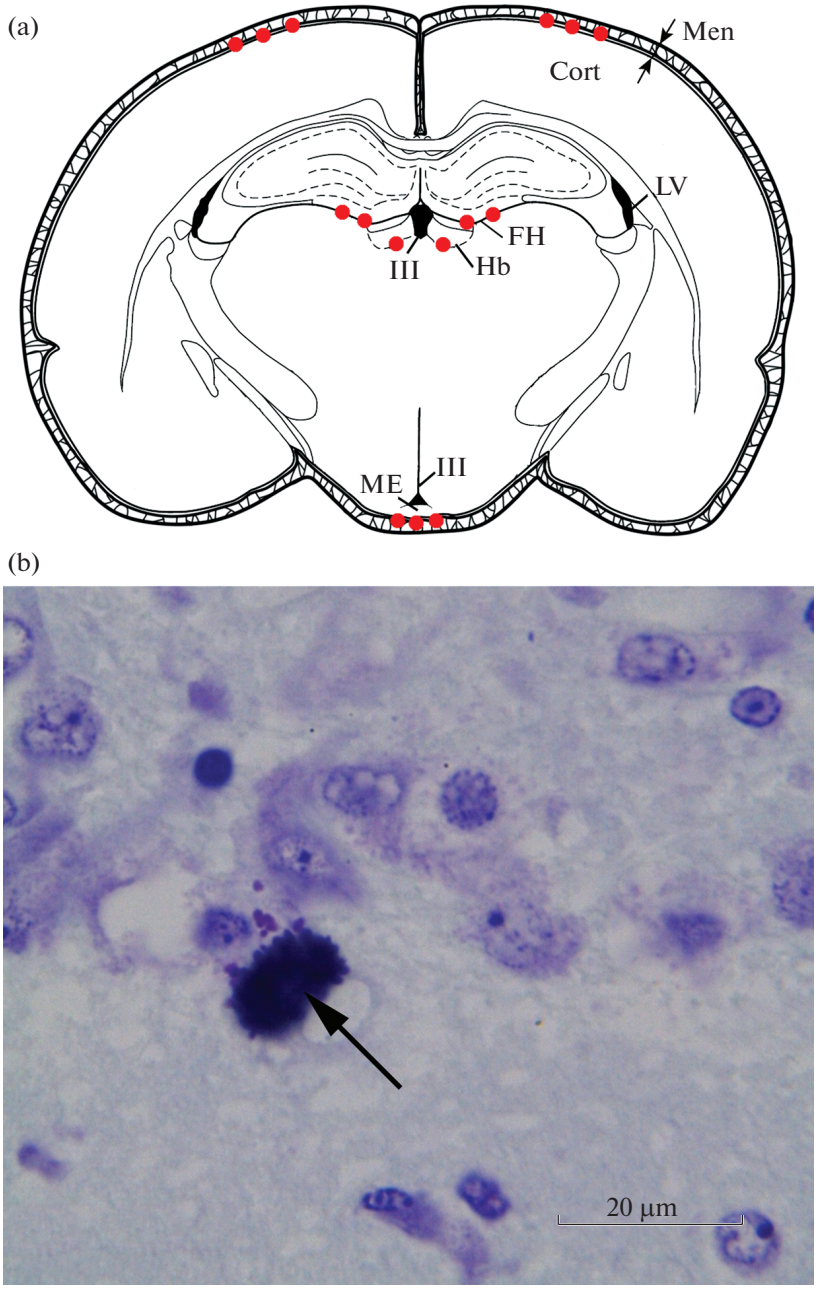

Рис. 1. Участки, в которых наиболее часто могут быть обнаружены тучные клетки при изучении головного мозга грызунов. a – Схематичное изображение фронтального среза головного мозга на уровне –3.3 мм от брегмы; *красными кружками* отмечены места локализации тучных клеток (по данным литературных источников). Men – менингеальные оболочки мозга, Cort – кора головного мозга (теменная), FH – гиппокампальная борозда (fissura hippocampi), Hb – поводок, ME – срединное возвышение, LV – боковые желудочки, III V – третий желудочек. b – иллюстрация тучной клетки в области поводка головного мозга крысы. Препарат из Отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Окраска крезиловым фиолетовым. *Стрелка* указывает на тучную клетку.

пределения мастоцитов [14, 20]. У коровы особенно много мастоцитов в гипоталамусе, эпифизе и, что редко отмечается у других видов животных, в мозжечке [14, 57].

Тучные клетки описаны у многих низших и высших приматов: у представителей лори (*Nyticebus coucang*), галаго (*Otolemur crassicaudatus*), долгопятов (*Tarsius tarsier*), лемуров (*Eulemur fulvus*), игрунков (*Callithrix penicillata*), макак (*Macaca mulatta, Macaca fascicularis, Macaca arctoides*), у беличьего саймири (*Saimiri sciureus*), капуцинов (*Cebus capucinus, Cebus apella macrocephalus*), коат (*Ateles geof-*

Таблица 2. Таксоны, у представителей которых обнаружены тучные клетки в мозге

Класс	Отряд	Семейство	Источник
Лучеперые рыбы (Actinopterygii)	Щукообразные (Esociformes)	Щуковые (Esocidae)	27
	Карпообразные (Cypriniformes)	Карповые (Cyprinidae)	27, 28
	Лососеобразные (Salmoniformes)	Лососевые (Salmonidae)	27
Пресмыкающиеся (Reptilia)	Черепахи (Testudines)	Азиатские пресноводные черепахи (Geoemydidae)	29
	Чешуйчатые (Squamata)	Настоящие ящерицы (Lacertidae)	30
Земноводные (Amphibia)	Бесхвостые земноводные (Anura)	Настоящие лягушки (Ranidae)	10, 25, 31
		Пиповые (Pipidae)	25
		Жабы (Bufonidae)	25
	Хвостатые земноводные (Caudata)	Саламандровые (Salamandridae)	32, 33
		Амбистомовые (Ambystomatidae)	34
Птицы (Aves)	Голубеобразные (Columbiformes)	Голубиные (Columbidae)	12, 24, 35
	Воробьинообразные (Passeriformes)	Воробьиные (Passeridae)	36
	Гусеобразные (Anseriformes)	Утиные (Anatidae)	36
	Аистообразные (Ciconiiformes)	Цаплевые (лат. Ardeidae)	36
	Курообразные (Galliformes)	Фазановые (Phasianidae)	37
Млекопитающие (Mammalia)	Грызуны (Rodentia)	Мышиные (Muridae)	10, 14, 19, 20, 38–54, 57, 59
		Свинковые (Caviidae)	10, 14, 55, 56
		Хомяковые (Cricetidae)	10, 14, 54, 57
		Беличьи (Sciuridae)	56
		Агутиевые (Dasyproctidae)	55, 56
		Паковые (Cuniculidae)	56
	Зайцеобразные (Lagomorpha)	Зайцевые (Leporidae)	14, 57
	Насекомоядные (Eulipotyphla)	Ежовые (Erinaceidae)	20, 39, 54, 61
		Землеройковые (Soricidae)	39, 54, 58
	Хищные (Carnivora)	Кошачьи (Felidae)	14, 54–57
		Псовые (Canidae)	14, 54, 55
		Ушастые тюлени (Otariidae)	54
	Парнокопытные (Artiodactyla)	Полорогие (Bovidae)	14, 20, 57
	Тупайи (Scandentia)	Тупайевые (Tupaiidae)	39, 54
	Опоссумы (Didelphimorphia)	Опоссумовые (Didelphidae)	55
	Хоботные (Proboscidea)	Слоны (Elephantidae)	54
	Приматы (Primates)	Долгопятовые (Tarsiidae)	54
		Лориевые (Loridae)	39
		Галаговые (Galagonidae)	56
		Лемуровые (Lemuridae)	56
		Игрунковые (Callitrichidae)	14
		Капуциновые (Cebidae)	14, 54, 55
		Паукообразные обезьяны (Atelidae)	54
		Мартышковые (Cercopithecidae)	55, 56
		Гоминиды (Hominidae), кроме человека	54, 55,
		Гоминиды (Hominidae), человек (Homo sapiens)	3, 4, 6, 10, 14, 36, 62–69

froyi), шимпанзе (*Pan troglodytes*). Мастоциты наблюдались в мягкой и паутинной оболочках, сосудистом сплетении, а также в различных структурах головного мозга: в медиальном ядре поводка, миндалине, гипоталамических ядрах, скорлупе, ограде, субфорникальном органе, коре большого мозга и эпифизе [14, 39, 54–56]. В мозге человека (*Homo sapiens*) тучные клетки были обнаружены в твердой и мягкой оболочках мозга, сосудистом сплетении, самом заднем поле (area postrema) и эпифизе [3, 4, 6, 14, 36, 62–68]. Кроме того, есть единичные данные, которые пока не получили подтверждения, о нахождении мастоцитов в воронке гипофиза, субфорникальном органе, сосудистом органе терминальной пластинки, теменной коре большого мозга, а также в спинном мозге [10, 66, 69]. Таксоны, у представителей которых были обнаружены тучные клетки в структурах ЦНС, представлены в табл. 2.

Таким образом, тучные клетки широко представлены в структурах ЦНС млекопитающих, причем наиболее типичны они для мягкой и паутинной оболочек мозга, сосудистого сплетения, различных ядер таламуса, поводка и гипоталамуса, реже мастоциты встречаются в коре большого мозга, гиппокампе и эпендимной выстилке желудочков мозга. Нередко наблюдается асимметричное распределение мастоцитов. В перинатальный период количество тучных клеток в мозге обычно выше, чем у взрослых животных.

Изменение количества и активности тучных клеток. Во многих исследованиях отмечается высокая вариабельность количества тучных клеток в целом и соотношения числа активированных (дегранулирующих) и неактивированных мастоцитов в мозге у представителей одного и того же вида животных одного пола и возраста. Это связано с тем, что благодаря наличию разнообразных рецепторов тучные клетки чувствительны не только к патологическим факторам (патогенные микроорганизмы, гельминты, аллергены), что вызывает соответствующую воспалительную реакцию, но и способны реагировать на изменение многих физиологических факторов. Так, показано, что тучные клетки головного мозга дегранулируют под действием стресса, или, вернее, гормонов и пептидов надпочечников и гипоталамо-гипофизарной системы, опосредующих действие стресса на организм (кортизол, кортикостерон, кортикотропин-рилизинг-фактор, субстанция П) [10, 70–72]. При этом одни виды стресса (иммобилизация или взятие в руки) уменьшают число тучных клеток в головном мозге экспериментальных животных, тогда как хронический субординационный стресс, внутрибрюшинное введение циклофосфамида (противоопухолевый препарат с высокой общей токсичностью) или интратекальная инъекция – увеличивают их [41, 71, 73]. Также возрастает число мастоцитов в головном мозге человека при инфекционных и паразитарных заболеваниях [6, 7].

Количество тучных клеток в головном мозге заметно изменяется в зависимости от состояния репродуктивной системы. Число мастоцитов в отдельных областях мозга существенно меняется в ходе эстрального цикла самок грызунов [40, 59], брачное ухаживание и спаривание достоверно повышают (а введение тестостерона или дигидротестостерона самцам или 17β-эстрадиола самкам может десятикратно повысить) число мастоцитов в поводке, но не других областях мозга горлицы [24, 74, 75]. Популяция тучных клеток в мозге также увеличивается у мышей-самцов после спаривания, крыс-самцов после размещения с овариэктомированными самками, инъецированными эстрогеном и прогестероном, или у самок крыс после родов [42, 76, 77]. Гонадэктомия, наоборот, снижает количество тучных клеток (в поводке горлицы и самом заднем поле кота) [55, 74]. Помимо репродуктивной системы, на функциональную активность и число тучных клеток в головном мозге оказывают влияние гормоны щитовидной железы и гипофиза [31]. Известно также, что активность мастоцитов мозга подвержена циркадным колебаниям и зависит от светового режима [78, 79], а число тучных клеток в мозге крыс и мышей значительно изменяется под действием слабых магнитных полей [80].

Имеются данные о том, что электростимуляция верхнего шейного ганглия, нервные окончания которого формируют прямые контакты с тучными клетками оболочек мозга крысы, ведет к накоплению серотонина в мастоцитах, а ганглиоэктомия приводит к дегрануляции тучных клеток [81]. По результатам других авторов, наоборот, электростимуляция верхнего шейного или тройничного ганглия вызывала дегрануляцию мастоцитов в твердой мозговой оболочке [82].

Ацетилхолин дозо-зависимо повышает функциональную активность тучных клеток в твердой мозговой оболочке крыс при посредстве М-холинорецепторов [83], а стимуляция серотониновых 5-HT1B/1D рецепторов крыс увеличивает количество тучных клеток в таламусе [19]. Количество мастоцитов в головном и спинном мозге человека изменяется также в ходе развития некоторых нервных и психических заболеваний [84]. Приведенные данные свидетельствуют, что функциональная активность и число тучных клеток в ЦНС постоянно изменяются под действием патогенных факторов и регулируются эндокринной и нервной системами.

Механизмы изменения числа тучных клеток в ЦНС. Увеличение количества тучных клеток в мозге, как предполагается, происходит не за счет мастоцитогенеза в нервной системе, поскольку в моз-

ге (как и в периферических органах) не обнаружено тучных клеток с признаками деления [10], а за счет миграции в мозг предшественников мастоцитов из кровеносного русла (в кровеносном русле выявляются только незрелые тучные клетки). Транспорт экзогенных незрелых и зрелых мастоцитов из кровеносного русла в ткань мозга был продемонстрирован для взрослых мышей линии C57BL/6 и самок крыс Вистар [77, 85].

Интересно, что увеличение числа тучных клеток в мозге в экспериментальных условиях происходит в течение короткого промежутка времени (минут-часов) [21, 77], что свидетельствует о высокой реактивности мастоцитов в ЦНС. Кроме того, столь короткий промежуток времени позволяет предполагать присутствие в нервной ткани собственного пула негранулярных клеток-предшественников, которые при необходимости могут быстро трансформироваться в тучные клетки. Предполагалось, что такими предшественниками могут быть так называемые клетки Мато (они же “периваскулярные макрофаги”) – периваскулярные гранулярные клетки, которые происходят из костного мозга, расположены около сосудов мозга и содержат множество гидролитических ферментов [86]. Они обладают свойствами иммунных клеток и активируются при нейровоспалении и аутоиммунных заболеваниях, однако отличаются от тучных клеток ультраструктурно и, в противоположность последним, оксифильны и не содержат гепарина и триптазы, которые характерны для мастоцитов. Таким образом, вопрос о механизмах восполнения тучных клеток в мозге пока не вполне ясен. Не известен пока и механизм уменьшения числа мастоцитов в ЦНС под действием различных факторов.

Функции тучных клеток в ЦНС. Как отмечалось практически во всех исследованиях, мастоциты в мозге преимущественно локализованы вблизи сосудов [3–5, 20, 33, 44, 45, 47, 49 и др.], причем особенно часто они встречаются в структурах, омываемых ликвором мозговых желудочков, в первую очередь, в сосудистом сплетении, мозговых оболочках и циркумвентрикулярных органах. Периваскулярная локализация тучных клеток вместе с наличием рецепторов к большому числу гормонов, различных пептидов, нейромедиаторов, токсинов указывает на вероятную роль мастоцитов как сенсоров, реагирующих на изменение гормонального фона в организме и появление или изменение количества (концентрации) патогенных факторов. Эта рецепторная функция тучных клеток в головном мозге (как и других органах), очевидно, должна сочетаться с эффекторной функцией. Как и на какие мишени передают сигнал об изменении функционального состояния организма тучные клетки в головном мозге?

Прилежание тучных клеток к кровеносным сосудам и желудочкам мозга уже наводит на мысль о возможном участии мастоцитов в регуляции гемодинамики и проницаемости мозговых кровеносных сосудов и, соответственно, регуляции транспорта (молекулярного и, возможно, клеточного) между сосудистым руслом, глимфатической системой, интерстициальной жидкостью и ликвором желудочков. Данное предположение подтверждается способностью тучных клеток синтезировать и выделять вазоактивные соединения, такие как гистамин, серотонин и эндотелиальный фактор роста/фактор сосудистой проницаемости, которые изменяют скорость кровотока (давление) в сосудах и повышают проницаемость их стенок. Экспериментально было доказано непосредственное участие тучных клеток мозга в увеличении проницаемости гемато-энцефалического барьера, путем активации эндотелиоцитов [22, 70, 87], по-видимому, за счет стимуляции экспрессии E- и P-селектинов [88]. Кроме того, предполагается участие мастоцитов в ангиогенезе. Эта гипотеза основывается на исследованиях ангиогенеза при нормальном развитии и опухолевом росте. В раннем постнатальном онтогенезе крыс 90% тучных клеток головного мозга непосредственно контактируют с кровеносными сосудами, причем они расположены преимущественно в точках ветвления крупных сосудов. В ходе онтогенеза количество тучных клеток в точках ветвления сосудов растет [51, 52, 89]. С другой стороны, генетически или фармакологически вызванная нехватка тучных клеток у мышей замедляла рост экспериментально индуцированной опухоли (внемозговой локализации) [87, 90], что свидетельствует в пользу стимулирующего влияния тучных клеток на рост сосудов. Данный эффект могут обеспечивать несколько компонентов секрета мастоцитов, для которых доказано активирующее влияние на ангиогенез: васкулярный эндотелиальный фактор роста, ангиогенин, гепарин, гистамин, основной фактор роста фибробластов, трансформирующий ростовой фактор-бета, фактор некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа), интерлейкин IL-8 и, возможно, другие вещества [87, 91, 92]. Выяснение механизмов ангиогенного действия тучных клеток имеет большое значение, поскольку ангиогенез играет существенную роль в нормальном и опухолевом росте, а также в репаративных процессах после повреждений ЦНС.

Тучные клетки, выделяя различные медиаторы (такие, как гистамин, триптаза, простагландины и др.), способны напрямую воздействовать на ноцицептивные нейроны в мозге и тем самым участвовать в центральной модуляции ноцицепции [70, 93].

Известна гипотеза о том, что тучные клетки играют определенную роль в гибернации животных.

Было показано, что количество тучных клеток в мозге ежа и амфибий во время спячки возрастает [32, 61] (так же, как и число тучных клеток в периферических органах ящериц [94]). Во время гибернации также повышаются уровень и скорость обмена гистамина в головном мозге, который содержится как в гистаминергических нейронах, так и в тучных клетках [95]. Помимо того, установлено, что холод усиливает дегрануляцию тучных клеток [10]. На основе этих фактов было предположено, что увеличенное количество мастоцитов, а с ними гистамина и гепарина предотвращает тромбообразование в кровеносных сосудах животных в спячке, когда скорость кровотока резко снижается [25].

Помимо влияния на функционирование мозговых кровеносных сосудов показано действие тучных клеток на некоторые другие физиологические и патофизиологические внутримозговые процессы, а также поведение животных. Влияние мастоцитов на эти процессы исследуют с помощью двух экспериментальных подходов. Во-первых, это использование линии генетически модифицированных мышей ($Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ ($sash^{-/-}$) или $Kit^{W/W\text{-}v}$) с отсутствием тучных клеток. Кроме того, фармакологический подход позволяет блокировать мастоциты, стабилизируя их мембраны и предотвращая дегрануляцию – с помощью кромогликата натрия, либо, наоборот, активировать их, вызывая дегрануляцию – с помощью соединения 48/80 (compound 48/80). Использование данных методических подходов позволило доказать участие тучных клеток головного мозга в регуляции цикла сон–бодрствование, пищедобывательном поведении и питании [96], двигательной активности [97], социальном поведении крыс и их реакции на стресс [98]. Продемонстрировано участие мастоцитов в выработке условного рефлекса [99], в научении и пространственной памяти [44, 100]. Нарушения памяти и внимания при гиперфункции тучных клеток отмечены также в клинике [101].

В некоторых исследованиях удалось показать, что эффект тучных клеток на поведение опосредован действием гистамина и серотонина. Кроме того, доказано действие других веществ, секретируемых тучными клетками, в частности, цитокинов (IL-1, IL-6, IL-15, ФНО-альфа) и простагландинов на процессы научения и памяти [44, 96, 102, 103].

Очевидно, что действие тучных клеток на поведенческие реакции опосредуется их взаимодействием с нервными и глиальными клетками головного мозга. Это взаимодействие реализуется различными способами: путем прямого контакта мастоцитов с нейронами [72], с помощью синтезируемых в тучных клетках нейромедиаторов, хемокинов и интерлейкинов, воздействующих на соответствующие рецепторы на нервных и глиальных клетках [72, 84], и путем уже упоминавшегося процесса трансгрануляции [13, 18]. Кстати, именно путем трансгрануляции гепарин тучных клеток доставляется в нейроны и подавляет выброс из их цитоплазмы внутриклеточного кальция, тем самым изменяя реактивность нервных клеток [104].

Активация тучных клеток, которая сопровождается дегрануляцией, вызывает электрофизиологически регистрируемое (по частоте спайкового разряда) возбуждение или, реже, торможение нейронов таламуса крысы – отдела мозга, в котором сконцентрировано большое количество мастоцитов [105, 106]; по-видимому, данный эффект реализуется, в первую очередь, за счет аминовых медиаторов мастоцитов – гистамина и серотонина, которые через соответствующие рецепторы влияют на возбудимость нервных клеток [95]. Провоспалительные цитокины, характерные для тучных клеток (ФНО-альфа, IL-1-бета и IL-18), ингибируют долговременное потенцирование – форму нейрональной пластичности, которая, как считается, лежит в основе обучения и памяти [103, 107]. Есть данные об участии медиаторов мастоцитов (серотонин, гистамин, ФНО-альфа, IL-1-бета, IL-6) в регуляции нейрогенеза во взрослом гиппокампе [44, 84, 103, 108].

Помимо нейромедиаторных рецепторов тучные клетки оказывают воздействие на нейроны через специфические рецепторы к триптазе и другим протеазам мастоцитов. Так, триптаза взаимодействует с активируемым протеазой рецептором-2 (protease-activated receptor-2, PAR2) нейронов, протеазы тучных клеток 6 и 7 активируют сигнальный путь ERK1/2, MAPK и транскрипционный фактор NF-κB в нейронах [84, 109, 110]. Подобным образом тучные клетки действуют и на астроциты: триптаза, выделяемая тучными клетками, действует на астроцитарный PAR2 и, активируя сигнальный путь PAR2-PI3K/AKT, вызывает выброс из астроцитов интерлейкина IL-6. Через сигнальный путь PAR2-MAPK триптаза вызывает выброс ФНО-альфа (цитокины IL-6 и ФНО-альфа известны как провоспалительные медиаторы), при этом одновременно в астроцитах усиливается экспрессия трансформирующего ростового фактора-бета и цилиарного нейротрофического фактора (два цитокина-регулятора воспаления и восстановления нервной ткани). Протеазы тучных клеток 6 и 7 активируют ERK1/2, MAPK и NF-κB, индуцируя выброс из них провоспалительных интерлейкина IL-33 и хемокина CCL2 [100, 109–112]. Эти механизмы взаимодействия тучных клеток и астроцитов реализуются во время нейровоспалительной реакции.

Показано, что активация гистаминовых рецепторов на астроцитах гистамином вызывает усиле-

ние работы трансмембранного переносчика глутамата GLT-1, что ведет к снижению концентрации глутамата в межклеточной жидкости и, таким образом, снижает риск глутаматного повреждения нейронов [113]. Этот факт свидетельствует о возможном участии тучных клеток, богатых гистамином, в предотвращении эксайтотоксического повреждения нервных клеток глутаматом, которое лежит в основе некоторых патологических состояний нервной системы.

Дегрануляция тучных клеток (с выбросом триптазы, гистамина и других сигнальных молекул) активирует также микроглиальные клетки, стимулируя на них PAR2 и гистаминовые рецепторы H_1 и H_4, что вызывает выброс провоспалительных медиаторов – ФНО-альфа и интерлейкина IL-6 (которые реципрокно активируют PAR2 на тучных клетках), а также увеличивает экспрессию нейротрофического фактора мозга (BDNF) и его специфического рецептора PR2X4 [84, 111, 114, 115]. Этот механизм взаимодействия позволяет мастоцитам совместно с микроглиоцитами участвовать в регуляции нейровоспаления.

Помимо действия на астро- и микроглию тучные клетки способны вызывать апоптоз олигодендроцитов и демиелинизацию, что может быть фактором патогенеза демиелинизирующих заболеваний [116].

Таким образом, тучные клетки оказывают заметное влияние на физиологические процессы в ЦНС и поведенческие реакции, а также активируют глиальные и, до некоторой степени, нервные клетки, запуская воспалительный процесс. Воспаление – это сложная реакция организма в ответ на инфекцию или повреждение, необходимая для ликвидации изначальной причины поражения и восстановления поврежденных структур. Однако, если по каким-то причинам воспалительный процесс становится хроническим, это само по себе может стать причиной повреждения и гибели клеточных структур. В полной мере это относится к нервной системе, где удалось установить участие воспаления в патогенезе ряда заболеваний (в этом случае для обозначения локального воспалительного процесса используют термин “нейровоспаление”). Тучные клетки активно способствуют развитию нейровоспаления, выбрасывая провоспалительные цитокины, хемокины, лейкотриены, гистамин, серотонин и активируя астроциты, микроглию, олигодендроциты и Т-клетки. В последние полтора-два десятилетия получены достоверные сведения об участии тучных клеток в нейровоспалительном процессе и развитии таких заболеваний, как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, мигрень. Возможно участие мастоцитов в патогенезе депрессии, расстройствах аутистического спектра и шизофрении [5, 17, 70, 84, 93, 110, 111].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя представленные литературные данные, следует отметить, что многофункциональные по своему существу тучные клетки являются обязательным компонентом ЦНС у представителей различных видов млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, земноводных и рыб. Для тучных клеток характерна определенная преференция в локализации, отмечаемая вне зависимости от вида животного, это — структуры мозговых оболочек, циркумвентрикулярные органы и стволовые центры нейроэндокринной регуляции. Количество тучных клеток в мозге непостоянно и меняется в ходе постнатального онтогенеза и под действием различных гормональных и иммунных факторов. Для ряда видов характерны половой диморфизм и асимметрия в распределении тучных клеток. Данные о распределении тучных клеток в мозге животных и человека не полны и противоречивы, что обусловлено вариабельностью результатов, полученных с использованием различных способов их визуализации. Характерной особенностью мастоцитов головного мозга является их преимущественно периваскулярное расположение.

Для тучных клеток характерно наличие многочисленных гранул, содержащих различные медиаторы, количество которых исчисляется, по-видимому, сотнями. Механизмы выброса медиаторов из гранул разнообразны: путем дегрануляции (экзоцитоза), включая узколокальный и избирательный экзоцитоз, с помощью процесса трансгрануляции или постоянного медленного выделения компонентов гранул в межклеточное пространство. Это разнообразие обеспечивает локальное и дистантное действие мастоцитов на другие клетки центральной нервной системы.

Тучные клетки обладают большим числом рецепторов к иммуноглобулинам, многим нейромедиаторам и гормонам, что делает их высокочувствительными к изменениям внешней и внутренней среды организма в целом и головного и спинного мозга в частности. Множество медиаторов, содержащихся в мастоцитах, позволяют им вызывать воспалительный, противовоспалительный, иммуно-, васкуло-, глиоцито- и/или нейрономодулирующий эффект, интенсивность и направленность которого зависит от состава и количества экскретируемых медиаторов и способа их выброса, что в свою очередь зависят от того, какие именно рецепторы на тучных клетках (и какими агентами) активируются. Тонкие механизмы раз-

ных способов выделения медиаторов из тучных клеток в ЦНС остаются неясными.

Тучные клетки контролируют проницаемость мозговых кровеносных сосудов в зоне функционирования гемато-энцефалического, ликворо-энцефалического и гемато-ликворного барьеров, что определяет их в качестве ключевых элементов сложных механизмов поддержания гомеостаза нервной ткани. Они участвуют в регуляции ангиогенеза при нормальном и опухолевом росте. Одной из наименее изученных, но весьма перспективных с медицинской точки зрения функций тучных клеток является их нейропротекторная функция, осуществляемая при посредстве астроцитов при эксайтотоксическом стрессе. Все изложенное свидетельствует о необходимости более углубленного изучения цитологических, биохимических и функциональных особенностей тучных клеток ЦНС в сравнительном аспекте, поскольку именно эти клетки занимают центральное место в механизмах взаимодействия иммунной и центральной нервной системы и могут оказаться удобной точкой приложения для новых методов терапевтических воздействий на систему нейроиммуноэндокринной регуляции организма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась из средств государственного задания ФГБНУ ИЭМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Galli S. J.* New insights into “the riddle of the mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. Lab. Invest. 62 (1): 5–33. 1990.

2. *Wernersson S., Pejler G.* Mast cell secretory granules: armed for battle. Nat. Rev. Immunol. 14 (7): 478–494. 2014.

3. *Федорова Е.А., Григорьев И.П., Сырцова М.А., Суфиева Д.А., Новикова А.Д., Коржевский Д.Э.* Выявление морфологических признаков дегрануляции тучных клеток сосудистого сплетения головного мозга человека с использованием различных методов окраски и иммуногистохимии. Морфология. 153 (2): 70–75. 2018. [*Fedorova E.A., Grigorev I.P., Syrtzova M.A., Sufieva D.A., Novikova A.D., Korzhevskii D.E.* Detection of morphological signs of mast cell degranulation in the human choroid plexus using different staining methods. Morfologiia. 153 (2): 70–75. 2018. (In Russ)].

4. *Федорова Е.А., Суфиева Д.А., Григорьев. И.П., Коржевский Д.Э.* Тучные клетки эпифиза человека. Усп. геронтол., 31 (4): 484–489. 2018. [*Fedorova E.A., Sufieva D.A., Grigorev I.P., Korzhevskii D.E.* Mast cells of the human pineal gland. Adv. Gerontol. 9 (1): 62–66. 2019.]

5. *Nelissen S., Lemmens E., Geurts N., Kramer P., Maurer M., Hendriks J., Hendrix S.* The role of mast cells in neuroinflammation. Acta Neuropathol. 125 (5): 637–650. 2013.

6. *Maślińska D., Dąmbska M., Kaliszek A., Maśliński S.* Accumulation, distribution and phenotype heterogeneity of mast cells (MC) in human brains with neurocysticercosis. Folia Neuropathol. 39 (1): 7–13. 2001.

7. *Maślińska D., Laure-Kamionowska M., Gujski M., Ciurzynska G., Wojtecka-Lukasik E.* Post-infectional distribution and phenotype of mast cells penetrating human brains. Inflamm. Res. 54 (Suppl. 1): S15-6. 2005.

8. *Crivellato E., Nico B., Gallo V.P., Ribatti D.* Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution. Anat. Rec. (Hoboken). 293 (7): 1115–1124. 2010.

9. *Florenzano F., Bentivoglio M.* Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat thalamus: a light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. J. Comp. Neurol. 424 (4): 651–669. 2000.

10. *Ibrahim M.Z.M.* The mast cells of the mammalian central nervous system. 1. Morphology, distribution and histochemistry. J. Neurol. Sci. 21 (4): 431–478. 1974.

11. *Manning K.A., Pienkowski T.P., Uhlrich D.J.* Histaminergic and non-histamine-immunoreactive mast cells within the cat lateral geniculate complex examined with light and electron microscopy. Neuroscience, 63 (1): 191–206. 1994.

12. *Wilhelm M.* Neuro-immune interactions in the dove brain. Gen. Comp. Endocrinol. 172 (1): 173–180. 2011.

13. *Wilhelm M., Silver R., Silverman A.J.* Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. Eur. J. Neurosci. 22 (9): 2238–2248. 2005.

14. *Machado A.B.M., Faleiro L.C.M., Da Silva W.D.* Study of mast cell histamine contents of the pineal body. Z. Zellforsch. 65 (4): 521–529. 1965.

15. *Mukai K., Tsai M., Saito H., Galli S.J.* Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. Immunol. Rev. 282 (1): 121–150. 2018.

16. *Theoharides T.C., Alysandratos K.D., Angelidou A., Delivanis D.A., Sismanopoulos N., Zhang B., Asadi S., Vasiadi M., Weng Z., Miniati A., Kalogeromitros D.* Mast cells and inflammation. Biochim Biophys Acta. 1822 (1): 21–33. 2012.

17. *Traina G.* Mast cells in the brain – Old cells, new target. J. Integr. Neurosci. 16 (S1): S69-S83. 2017.

18. *Vukman K.V., Försönits A., Oszvald Á., Toth E.A., Buzas E.I.* Mast cell secretome: soluble and vesicular components. Semin. Cell Dev. Biol. 67: 65–73. 2017.

19. *Dubayle D., Servière J., Menétrey D.* Evidence for serotonin influencing the thalamic infiltration of mast cells in rat. J. Neuroimmunol. 159 (1–2): 20–30. 2005.

20. *Michaloudi H.C., Papadopoulos G.C.* Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. J. Anat. 195 (Pt 4): 577–586. 1999.

21. *Yang M.F., Chien C.L., Lu K.S.* Compound 48/80-induced degranulation of GnRH-like immunoreactive mast cells in the brain and mesentery of the gerbil. Zool. Stud. 41 (1): 99–110. 2002.

22. *Lehman M., Silver R.* CSF signaling in physiology and behavior. Prog. Brain Res. 125: 415–433. 2000.

23. *Gaudenzio N., Sibilano R., Marichal T., Starkl P., Reber L.L., Cenac N., McNeil B.D., Dong X., Hernandez J.D., Sagi-Eisenberg R., Hammel I., Roers A., Valitutti S., Tsai M., Espinosa E., Galli S.J.* Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. J. Clin. Invest. 126 (10): 3981–3998. 2016.

24. *Wilhelm M., King B., Silverman A.J., Silver R.* Gonadal steroids regulate the number and activational state of mast cells in the medial habenula. Endocrinology. 141 (3): 1178–1186. 2000.

25. *Baccari G.C., Pinelli C., Santillo A., Minucci S., Rastogi R.K.* Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 290: 1–53. 2011.

26. *Crivellato E., Ribatti D.* The mast cell: an evolutionary perspective. Biol. Rev., 85 (2): 347–360. 2010.

27. *Weiss J.* Über Vorkommen und Ultrastruktur von Mastzellen im Hypothalamus der Knochenfische. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 93 (1): 147–160. 1979.

28. *Ali N.M.* Mast cells enter a teleost's brain by Xth cranial nerve in response to Diplostomum phoxini (Trematoda). Experientia 40 (2): 197–198. 1984.

29. *Inagaki N., Panula P., Yamatodani A., Wada H.* Organization of the histaminergic system in the brain of the turtle Chinemys reevesii. J. Comp. Neurol. 297 (1): 132–144. 1990.

30. *Nacher J., Ramírez C., Palop J.J., Artal P., Molowny A., López-García C.* Microglial cells during the lesion-regeneration of the lizard medial cortex. Histol. Histopathol. 14 (1): 103–117. 1999.

31. *Monteforte R., Pinelli C., Santillo A., Rastogi R.K., Polese G., Baccari G.C.* Mast cell population in the frog brain: distribution and influence of thyroid status. J. Exp. Biol. 213 (10): 1762–1770. 2010.

32. *Ciani F., Franceschini V., Del Grande P., Minelli G.* Mast cells in the central nervous system of Triturus cristatus carnifex. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 100 (6): 838–846. 1986.

33. *Inoue Y., Akita M., Shimai K.* The mast cells in the brain of the Triturus pyrrhogaster (Boie). I. The histologic studies. Keio J. Med. 17 (4): 235–249. 1968.

34. *Kappers J.A., Ten Kate I., De Bruyn H.J.* On mast cells in the choroid plexus of the axolotl (Ambystoma mex.). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 48 (6): 617–634. 1958.

35. *Zhuang X., Silverman A.J., Silver R.* Distribution and local differentiation of mast cells in the parenchyma of the forebrain. J. Comp. Neurol. 408 (4): 477–488. 1999.

36. *Quay W.B.* Histological structure and cytology of the pineal organ in birds and mammals. Prog. Brain Res. 10: 49–86. 1965.

37. *Ribatti D., Bertossi M., Nico B., Roncali L.* Mast cells in the chick embryo choroid plexuses. J. Submicrosc. Cytol. 19 (2): 371–373. 1987.

38. *Johnson D., Yasui D., Seeldrayers P.* An analysis of mast cell frequency in the rodent nervous system: numbers vary between different strains and can be reconstituted in mast cell-deficient mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 50 (3): 227–234. 1991.

39. *Kiernan J.A.* A comparative survey of the mast cells of the mammalian brain. J. Anat. 12 (2): 303–311. 1976.

40. *Kovács K.J., Larson A.A.* Mast cells accumulate in the anogenital region of somatosensory thalamic nuclei during estrus in female mice. Brain Res. 1114 (1): 85–97. 2006.

41. *Taiwo O.B., Kovacs K.J., Larson A.A.* Chronic daily intrathecal injections of a large volume of fluid increase mast cells in the thalamus of mice. Brain Res. 1056 (1): 76–84. 2005.

42. *Yang M., Chien C., Lu K.* Morphological, immunohistochemical and quantitative studies of murine brain mast cells after mating. Brain Res. 1999; 846 (1): 30–39.

43. *Hendrix S., Kramer P., Pehl D., Warnke K., Boato F., Nelissen S., Lemmens E., Pejler G., Metz M., Siebenhaar F., Maurer M.* Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4. FASEB J. 27 (3): 920–929. 2013.

44. *Nautiyal K.M., Dailey C.A., Jahn J.L., Rodriquez E., Son N.H., Sweedler J.V., Silver R.* Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function. Eur. J. Neurosci. 36 (3): 2347–2359. 2012.

45. *Hendrix S., Warnke K., Siebenhaar F., Peters E. M., Nitsch R., Maurer M.* The majority of brain mast cells in B10.PL mice is present in the hippocampal formation. Neurosci. Lett. 392 (3): 174–177. 2006.

46. *Brenner T., Soffer D., Shalit M., Levi-Schaffer F.* Mast cells in experimental allergic encephalomyelitis: characterization, distribution in the CNS and in vitro activation by myelin basic protein and neuropeptides. J. Neurol. Sci. 122 (2): 210–213. 1994.

47. *Dropp J.J.* Mast cells in the central nervous system of several rodents. Anat. Rec. 174 (2): 227–237. 1972.

48. *Persinger M.A.* Brain mast cell numbers in the albino rat: sources of variability. Behav. Neural Biol. 25 (3): 380–386. 1979.

49. *Goldschmidt R.C., Hough L.B., Glick S.D., Padawer J.* Mast cells in rat thalamus: nuclear localization, sex difference and left-right asymmetry. Brain Res. 323 (2): 209–217. 1984.

50. *Dimitriadou V., Rouleau A., Tuong M.D., Ligneau X., Newlands G.F., Miller H.R., Schwartz J.C., Garbarg M.* Rat cerebral mast cells undergo phenotypic changes during development. Brain Res. Dev. Brain Res. 97 (1): 29–41. 1996.

51. *Lambracht-Hall M., Dimitriadou V., Theoharides T.C.* Migration of mast cells in the developing rat brain. Brain Res. Dev. Brain Res. 56 (2): 151–159. 1990.

52. *Michaloudi H., Grivas I., Batzios C., Chiotelli M., Papadopoulos G.C.* Parallel development of blood vessels and mast cells in the lateral geniculate nuclei. Brain Res. Dev. Brain Res. 140 (2): 269–276. 2003.

53. *Persinger M.A.* Developmental alterations in mast cell numbers and distributions within the thalamus of the albino rat. Dev. Neurosci. 4 (3): 220–224. 1981.

54. *Dropp J.J.* Mast cells in mammalian brain. I. Distribution. Acta Anat. (Basel). 94 (1): 1–21. 1976.

55. *Cammermeyer J.* Mast cells in the mammalian area postrema. Z. Anat. Entwickl. Gesch. 139 (1): 71–92. 1972.

56. *Cammermeyer J.* Mast cells and postnatal topographic anomalies in mammalian subfornical body and supraoptic crest. Z. Anat. Entwickl. Gesch. 140 (3): 245–269. 1973.

57. *Edvinsson L., Cervos-Navarro J., Larsson L.I., Owman C., Rönnberg A.L.* Regional distribution of mast cells containing histamine, dopamine, or 5-hydroxytryptamine in the mammalian brain. Neurology. 27 (9): 878–883. 1977.

58. *Gill C.J., Rissman E.F.* Mast cells in the neonate musk shrew brain: implications for neuroendocrine immune interactions. Brain Res. Dev. Brain Res. 111 (1): 129–136. 1998.

59. *Kriegsfeld L.J., Hotchkiss A.K., Demas G.E., Silverman A.J., Silver R., Nelson R.J.* Brain mast cells are influenced by chemosensory cues associated with estrus induction in female prairie voles (Microtus ochrogaster). Horm. Behav. 44 (5): 377–384. 2003.

60. *Ibrahim M.Z.M.* The immediate and delayed effects of compound 48/80 on the mast cells and parenchyma of rabbit brain. Brain Res. 17 (2): 348–350. 1970.

61. *Krüger G.* Mast cells in the brain of the hedgehog (Erinaceus europaeus Lin.). Distribution and seasonal variations. Acta Zool. 51 (1–2), 85–93. 1970.

62. *Коржевский Д.Э.* Тучные клетки в сосудистом сплетении у детей. Морфология. 112 (5): 48–50. 1997. [*Korzhevskii D.E.* Mast cells in choroid plexus of kids. Morfologiia. 112 (5): 48–50. 1997. (In Russ)].

63. *Турыгин В.В., Бабик Т.М., Бояков А.А.* Характеристика тучных клеток сосудистых сплетений желудочков головного мозга человека при старении. Морфология. 126 (6): 61–62. 2004. [*Turygin V.V., Babik T.M., Boyakov A.A.* Characteristics of mast cells in the choroid plexus of the ventricles of the human brain in aging. Neurosci. Behav. Physiol. 35 (9): 909–911. 2005.]

64. *Юнеман О.А.* Морфологическая организация эпифиза и сосудистого сплетения III желудочка головного мозга человека. Морфол. ведом. 3: 97–100. 2012. [*Yuneman O.A.* Morphological organization of pineal gland and third ventricle choroid plexus of human brain. Morfol. Vedom. 3: 97–100. 2012. (In Russ)].

65. *Cammermeyer J., Adams R.D.* The histopathological reaction of the area postrema. Acta Psychiat. Scand. 23 (3–4): 205–229. 1948.

66. *Dropp J.J.* Mast cells in the human brain. Acta Anat. (Basel). 105 (4): 505–513. 1979.

67. *Maślińska D., Laure-Kamionowska M., Deręgowski K., Maśliński S.* Association of mast cells with calcification in the human pineal gland. Folia Neuropathol. 48 (4): 276–282. 2010.

68. *Porzionato A., Macchi V., Parenti A., De Caro R.* The distribution of mast cells in the human area postrema. J. Anat. 204 (2): 141–147. 2004.

69. *Fiala M., Chattopadhay M., La Cava A., Tse E., Liu G., Lourenco E., Eskin A., Liu P.T., Magpantay L., Tse S., Mahanian M., Weitzman R., Tong J., Nguyen C., Cho T., Koo P., Sayre J., Martinez-Maza O., Rosenthal M.J., Wiedau-Pazos M.* IL-17A is increased in the serum and in spinal cord CD8 and mast cells of ALS patients. J. Neuroinflammation. 7 (1): 76. 2010.

70. *Kempuraj D., Mentor S., Thangavel R., Ahmed M.E., Selvakumar G.P., Raikwar S.P., Dubova I., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A.* Mast cells in stress, pain, blood-brain barrier, neuroinflammation and Alzheimer's disease. Front. Cell Neurosci. 13: 54. 2019.

71. *Persinger M.A.* Handling factors not body marking influence thalamic mast cell numbers in the preweaned albino rat. Behav. Neural Biol. 30 (4): 448–459. 1980.

72. *Rozniecki J.J., Dimitriadou V., Lambracht-Hall M., Pang X., Theoharides T.C.* Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell–neuron interactions in vitro and in vivo. Brain Res. 849 (1): 1–15. 1999.

73. *Chikahisa S., Harada S., Shimizu N., Shiuchi T., Otsuka A., Nishino S., Séi H.* Mast cell involvement in glucose tolerance impairment caused by chronic mild stress with sleep disturbance. Sci. Rep. 7: 13640. 2017.

74. *Zhuang X., Silverman A.J., Silver R.* Reproductive behavior, endocrine state, and the distribution of GnRH-like immunoreactive mast cells in dove brain. Horm. Behav. 27 (3): 283–295. 1993.

75. *Zhuang X., Silverman A.J., Silver R.* Mast cell number and maturation in the central nervous system: influence of tissue type, location and exposure to steroid hormones. Neuroscience. 80 (4): 1237–1245. 1997.

76. *Asarian L, Yousefzadeh E., Silverman A.J., Silver R.* Stimuli from conspecifics influence brain mast cell population in male rats. Horm. Behav. 42 (1): 1–12. 2002.

77. *Silverman A.J., Sutherland A.K., Wilhelm M., Silver R.* Mast cells migrate from blood to brain. J. Neurosci. 20 (1): 401–408. 2000.

78. *Каредина В.С., Довбыш Т.В., Кожевникова Т.А.* Суточный цикл функциональной активности тучных клеток твердой мозговой оболочки крыс. Бюлл. эксп. биол. мед. 90 (3): 356–357. 1980. [*Karedina V.S., Dovbysch T.V. Kozhevnikova T.A.* Circadian rhythm of mast cell function in the rat dura. Biul. Eksper. Biol. i Medit. 90 (9): 1286–1288. 1981].

79. *Mareš V., Brückner G., Biesold D.* Mast cells in the rat brain and changes in their number under different light regimens. Exp. Neurol. 65 (2): 278–283. 1979.

80. *Tümkaya L., Kalkan Y., Gökçe F.M., Erdivanli B., Yilmaz A., Bahceci I., Yazici Z. A., Mercantepe T.* The effects of mobile phone exposure on mast cells in rat dura mater. Int. J. Morphol. 37 (2): 719–723. 2019.

81. *Ferrante F., Ricci A., Felici L., Cavallotti C., Amenta F.* Suggestive evidence for a functional association between mast cells and symphathetic nerves in meningeal membranes. Acta Histochem. Cytochem. 23 (5): 637–646. 1990.

82. *Keller J., Dimlich R., Zuccarello M., Lanker L., Strauss T., Fritts M.* Influence of the sympathetic nervous system as well as trigeminal sensory fibres on rat dural mast cells. Cephalalgia. 11 (5): 215–222. 1991.

83. *Каредина В.С.* Экспериментальные доказательства холинореактивности тканевых базофилов твердой мозговой оболочки головного мозга крыс. Арх. анат. 86 (4): 19–26. 1984. [*Karedina V.S.* Experimental evidence of the cholinoreactivity of tissue basophils of the dura mater of the brain in the rat. Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 1984; 86 (4): 19–26. (In Russ)].

84. *Hendriksen H., van Bergeijk D., Oosting R.S., Redegeld F.A.* Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. Neurosci. Biobehav. Rev. 79: 119–133. 2017.

85. *Nautiyal K.M., Liu C., Dong X., Silver R.* Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse. J. Neuroimmunol. 240–241: 142–146. 2011.

86. *Ookawara S., Mitsuhashi U., Suminaga Y., Mato M.* Study on distribution of pericyte and fluorescent granular perithelial (FGP) cell in the transitional region between arteriole and capillary in rat cerebral cortex. Anat Rec. 244 (2): 257–264. 1996.

87. *Ribatti D.* The crucial role of mast cells in blood-brain barrier alterations. Exp. Cell Res. 338 (1): 119–125. 2015.

88. *Kubes P., Granger D. N.* Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. Cardiovasc. Res. 32 (4): 699–708. 1996.

89. *Khalil M., Ronda J., Weintraub M., Jain K., Silver R., Silverman A.J.* Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. Brain Res. 1171: 18–29. 2007.

90. *Soucek L., Lawlor E.R., Soto D., Shchors K., Swigart L.B., Evan G.I.* Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. Nat. Med. 13: 1211–1218. 2007.

91. *Norrby K.* Mast cells and angiogenesis. APMIS. 110 (5): 355–371. 2002.

92. *Ribatti D., Ranieri G.* Tryptase, a novel angiogenic factor stored in mast cell granules. Exp. Cell Res. 332: 157–162. 2015.

93. *Koroleva K., Gafurov O., Guselnikova V., Nurkhametova D., Giniatullina R., Sitdikova G., Mattila O.S., Lindsberg P.J., Malm T.M., Giniatullin R.* Meningeal mast cells contribute to ATP-induced nociceptive firing in trigeminal nerve terminals: direct and indirect purinergic mechanisms triggering migraine pain. Front. Cell. Neurosci. 13: 195. 2019.

94. *Minucci S., Izzo Vitiello I., Marmorino C., Di Matteo L., Chieffi Baccari G.* Mast cell-Leydig cell relationships in the testis of the lizard Podarcis s. sicula Raf: thermal manipulation, ethane 1,2-dimethane sulphonate (EDS) and sex hormone treatment. Zygote 3 (3): 259–264. 1995.

95. *Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O.* Histamine in the nervous system. Physiol. Rev. 88 (3): 1183–1241. 2008.

96. *Chikahisa S., Kodama T., Soya A., Sagawa Y., Ishimaru Y., Séi H., Nishino S.* Histamine from brain resident mast cells promotes wakefulness and modulates behavioral states. PLoS ONE 8 (10): e78434. 2013.

97. *Larson A.A., Thomas M.J., McElhose A., Kovács K.J.* Spontaneous locomotor activity correlates with the degranulation of mast cells in the meninges rather than in the thalamus: disruptive effect of cocaine. Brain Res., 1395: 30–37. 2011.

98. *Manchanda R.K., Jaggi A.S., Singh N.* Ameliorative potential of sodium cromoglycate and diethyldithiocarbamic acid in restraint stress-induced behavioral alterations in rats. Pharmacol. Rep. 63 (1): 54–63. 2011.

99. *Fitzpatrick C.J., Morrow J.D.* Thalamic mast cell activity is associated with sign-tracking behavior in rats. Brain Behav. Immun. 65: 222–229. 2017.

100. *Zhang X., Yao H., Qian Q., Li N., Jin W., Qian Y.* Cerebral mast cells participate in postoperative cognitive dysfunction by promoting astrocyte activation. Cell Physiol. Biochem. 40 (1–2): 104–116. 2016.

101. *Picard M., Giavina-Bianchi P., Mezzano V., Castells M.* Expanding spectrum of mast cell activation disorders: monoclonal and idiopathic mast cell activation syndromes. Clin. Ther. 35 (5): 548–562. 2013.

102. *Малашенкова И.К., Крынский С.А., Хайлов Н.А., Казанова Г.В., Величковский Б.Б., Дидковский Н.А.* Роль цитокинов в консолидации памяти. Усп. соврем. биол. 135 (5): 419–436. 2015. [*Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Hailov N.A., Kazanova G.V., Velichkovsky B.B., Didkovsky N.A.* The role of cytokines in memory consolidation. Usp. Sovrem. Biol. 135 (5): 419–436. 2015. (In Russ)].

103. *Yirmiya R., Goshen I.* Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. Brain Behav. Immun. 25 (2): 181–213. 2011.

104. *Jonas S., Sugimori M., Llinás R.* Is low molecular weight heparin a neuroprotectant? Ann. N. Y. Acad. Sci. 825: 389–393. 1997.

105. *Kőszegi Z., Kovács P., Wilhelm M., Atlasz T., Babai N., Kállai V., Hernádi I.* The application of in vivo microiontophoresis for the investigation of mast cell–neuron interactions in the rat brain. J. Biochem. Biophys. Meth. 69 (1–2): 227–231. 2006.

106. *Kovács P., Hernádi I., Wilhelm M.* Mast cells modulate maintained neuronal activity in the thalamus in vivo. J. Neuroimmunol. 171 (1–2): 1–7. 2006.

107. *Pickering M., O'Connor J.J.* Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. Prog Brain Res. 163: 339–354. 2007.

108. *Borsini A., Zunszain P.A., Thuret S., Pariante C.M.* The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. Trends Neurosci. 38 (3): 145–157. 2015.

109. *Kempuraj D., Selvakumar G.P., Zaheer S., Thangavel R., Ahmed M.E., Raikwar S., Govindarajan R., Iyer S., Zaheer A.* Cross-talk between glia, neurons and mast cells in neuroinflammation associated with Parkinson's disease. J. Neuroimmune Pharmacol. 13 (1): 100–112. 2018.

110. *Kempuraj D., Thangavel R., Selvakumar G.P., Ahmed M.E., Zaheer S., Raikwar S.P., Zahoor H., Saeed D., Dubova I., Giler G., Herr S., Iyer S.S., Zaheer A.* Mast cell proteases activate astrocytes and glia-neurons and release interleukin-33 by activating p38 and ERK1/2 MAPKs and NF-κB. Mol. Neurobiol. 56 (3): 1681–1693. 2019.

111. *Skaper S.D., Facci L., Zusso M., Giusti P.* An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron. Front. Cell Neurosci. 12:72. 2018.

112. *Zeng X., Zhang S., Xu L., Yang H., He S.* Activation of protease-activated receptor 2-mediated signaling by mast cell tryptase modulates cytokine production in primary cultured astrocytes. Mediators Inflamm. 2013: 140812. 2013.

113. *Fang Q., Hu W.W., Wang X.F., Yang Y., Lou G.D., Jin M.M., Yan H.J., Zeng W.Z., Shen Y., Zhang S.H., Xu T.L., Chen Z.* Histamine up-regulates astrocytic glutamate transporter 1 and protects neurons against ischemic injury. Neuropharmacology. 77: 156–66. 2014.

114. *Dong H., Zhang X., Wang Y., Zhou X., Qian Y., Zhang S.* Suppression of brain mast cells degranulation inhibits microglial activation and central nervous system inflammation. Mol. Neurobiol. 54 (2): 997–1007. 2017.

115. *Zhang S., Zeng X., Yang H., Hu G., He S.* Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling. Cell Physiol. Biochem. 29 (5–6): 931–940. 2012.

116. *Medic N., Lorenzon P., Vita F., Trevisan E., Marchioli A., Soranzo M.R., Fabbretti E., Zabucchi G.* Mast cell adhesion induces cytoskeletal modifications and programmed cell death in oligodendrocytes. J. Neuroimmunol. 218 (1–2): 57–66. 2010.

MAST CELLS IN THE VERTEBRATE BRAIN: LOCALIZATION AND FUNCTIONS

I. P. Grigorev[a,#] and D. E. Korzhevskii[a]

[a] *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

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

This review focuses on mast cells as resident cells in the central nervous system (CNS) of mammals, birds, reptiles, amphibians, and fish. Mast cell distribution in the brain of different vertebrate species is surveyed in detail. In mammals, they are located most often in the choroid plexus, meninges, thalamus, medial nucleus of habenula, hypothalamus and circumventricular organs, usually in the immediate vicinity of blood vessels and cerebrospinal fluid (CSF)-containing spaces. Their number in brain is unstable, changing during postnatal ontogeny and under the influence of hormonal and immune factors. There are different ways of mediator release from cytoplasmic granules of mast cells, which provide targeted or diffuse effects on surrounding cells. Mast cells express a large number of receptors for immunoglobulins, neurotransmitters and hormones, which makes them highly sensitive to changes in external and internal environments of the body. At the same time, numerous mediators contained in mast cells allow them to induce inflammatory, anti-inflammatory, immuno-, vasculo-, gliocyto- and/or neuromodulating effects, the intensity and direction of which relies on the composition and amount of excreted mediators and the ways of their release, which, in turn, depends on which receptors on mast cells are activated. Mast cells control the permeability of the blood-brain and blood-CSF barriers, contribute to angiogenesis and, along with glial cells, regulate neuroinflammation (which is a leading pathogenetic factor of some nervous system and mental diseases) and protect the CNS from other pathogenic factors. Mast cells in the brain play the role of neuroimmune centers with afferent and efferent functions that link peripheral organs to specialized CNS cells and are actively involved in maintaining CNS homeostasis under both physiological conditions and the influence of pathological factors.

Keywords: mast cells, brain, vertebrates, neuroinflammation

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 33–43

ОБЗОРЫ

РОЛЬ МЕЛАТОНИНА В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2021 г. И. И. Евсюкова

ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: eevs@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.
После доработки 31.10.2020 г.
Принята к публикации 02.11.2020 г.

В обзоре обобщены современные представления о роли мелатонина в антенатальном онтогенезе. Приведены результаты экспериментальных и клинических исследований, раскрывающие механизмы участия мелатонина в процессе формирования и развития единой системы “мать–плацента–плод”. Рассмотрена ключевая роль материнского мелатонина и его циркадного ритма в осуществлении генетической программы морфофункционального развития плода. Обсуждаются механизмы ее защиты от повреждения, вызванного окислительным стрессом и воспалением при осложнениях беременности. Осуществляя контроль метилирования ДНК и модификации гистонов мелатонин предупреждает изменения экспрессии генов, имеющих непосредственное отношение к программированию заболеваний потомства. Представленный материал обосновывает перспективы использования мелатонина в клиническом акушерстве с целью профилактики и лечения перинатальной патологии плода.

Ключевые слова: мелатонин, плацента, плод, циркадная система, мозг, программирование

DOI: 10.31857/S0044452921010022

ВВЕДЕНИЕ

Мелатонин – уникальный гормон диффузной нейроиммуноэндокринной системы (ДНИЭС), участвующий в регуляции жизнедеятельности клеток, межклеточных и межсистемных взаимоотношений, что обеспечивает постоянство внутренней среды организма и его защиту в условиях взаимодействия с изменяющейся внешней средой [1–5]. Клетки ДНИЭС, продуцирующие мелатонин, появляются на ранних этапах эмбриогенеза, их количество самое большое в антенатальном и постнатальном онтогенезе [6–8]. В последнее десятилетие особое внимание исследователей привлечено к широкому спектру его биологической активности и роли в морфофункциональном развитии плода, становлении циркадианных ритмов жизнедеятельности как в норме, так и при неблагоприятных условиях внутриутробного развития [9–11].

Мелатонин у человека синтезируется пинеалоцитами в эпифизе, эндокринная функция которого находится под контролем супрахиазматических ядер (СХЯ) гипоталамуса и имеет суточный ритм. Световая информация от ганглиозных клеток сетчатки через ретино-гипоталамический тракт поступает в СХЯ, откуда сигналы идут в верхние цервикальные ганглии, а затем по симпатическим норадренэргическим путям достигают эпифиза и активируют пинеалоциты. Свет угнетает продукцию и секрецию мелатонина, поэтому его максимальный уровень в эпифизе и крови человека наблюдается в середине ночи, а минимальный – в дневные часы [12]. Мелатонин вырабатывается не только в эпифизе. Экстрапинеальный мелатонин обнаружен во всех органах: желудочно-кишечном тракте, мозге, печени, почках, надпочечниках, сердце, тимусе, половых железах, плаценте, матке, тромбоцитах, эозинофилах, лейкоцитах и других клетках системы иммунитета [13, 14]. Синтезируется мелатонин из аминокислоты триптофана, которая путем гидроксилирования и декарбоксилирования превращается в серотонин, а из него с помощью ферментов N-ацетилтранферазы (NAT) и оксииндол-О-метилтрансферазы (HIOMT) образуется мелатонин. Мелатонин из эпифиза выделяется в кровь и спинномозговую жидкость, а мелатонин, секретируемый в других клетках организма, попадает в кровь в незначительных количествах, оказывая в местах его синтеза паракринное и аутокринное влиянit. Обладая гидрофильными свойствами, молекула мелатонина вместе с тем является в высокой степени липофильной и поэтому легко проникает через гематоэнцефалический барьер, проходит в капилляры, где 70% мелатонина связывается с альбумином. Метаболизм мелатонина происходит не только в печени, но и в других тканях (мозг, кишечник и т.д.), где обнаружены специальные ферменты [15]. Конечные продукты метаболизма – 6-сульфатокси-мелатонин и ацетилсалициловая кислота.

Мелатонин осуществляет регулирующее влияние через связывание с рецепторами. У человека определены 2 типа мембранных рецепторов (MT1 и MT2) и их хромосомная локализация (хромосомы 4q35 и 11q21-22), а также ядерные рецепторы (RORα/RZR) [16, 17]. Рецепторы к мелатонину обнаружены в супрахиазматических ядрах гипоталамуса, в коре головного мозга, мозжечке, сетчатке, селезенке, печени, половых железах, молочных железах, матке, вилочковой железе, в желудочно-кишечном тракте, тромбоцитах, лимфоцитах [18]. В головном мозге выявлены особые многочисленные мембранные белки-рецепторы мелатонина, спаренные с гуанин-нуклеотид-связывающим белком (G-белок) и максимально представленные в гипоталамусе и гипофизе [19]. Мелатонин может проникать сквозь мембрану, связываться с белками-рецепторами на поверхности ядра, а внутри ядра реализовывать свое действие на уровне ядерного хроматина, непосредственно влияя на синтез белка генетическим аппаратом клетки. Даже в отсутствие рецептора, обладая высокой проницаемостью, молекула мелатонина оказывает системное влияние на клеточном уровне путем модуляции цитоскелета и митотической функции через связывание с кальмодулином и как поглотитель свободных радикалов [17]. Известно, что уровень эпифизарного мелатонина в крови значительно возрастает с наступлением беременности, особенно после 24-й недели, и достигает максимальных значений перед родами [20]. Данная динамика объясняется увеличением активности ферментов, участвующих в его синтезе не только в эпифизе, но и в плаценте, где его продукция значительно превышает таковую в эпифизе.

РОЛЬ МЕЛАТОНИНА В РАЗВИТИИ ПЛАЦЕНТЫ

Плацента – орган диффузной нейроиммуноэндокринной системы – играет исключительно важную роль в регуляции взаимоотношений между матерью и плодом, обеспечивая реализацию онтогенетической программы роста и развития его органов и функциональных систем благодаря продукции в ней классических пептидных гормонов, биогенных аминов, белков-мессенджеров, внутри- и межклеточных сигнальных молекул [21]. При физиологически протекающей беременности содержание эпифизарного мелатонина в крови существенно возрастает, составляя в первом, втором и третьем триместрах соответственно 29.7+/–9.9 pmol/l, 39.1+/–11.2 pmol/l, 76.5+/–38.3pmol/l [22]. Вместе с этим в организме женщины происходят изменения продукции и экстрапинеального мелатонина, особенно в плаценте, где уже в 7 нед беременности выявляется экспрессия участвующих в его синтезе ферментов NAT и HIOMT, достигающая максимума в третьем триместре [23]. Доказано, что именно мелатонин и его циркадный ритм секреции определяют успешное развитие плаценты [24]. Так, мелатонин и его метаболиты функционируют как прямые поглотители образующихся при беременности свободных радикалов, стимулируют антиоксидантные ферменты, обеспечивая тем самым устойчивую защиту от свободнорадикального повреждения на клеточном и тканевом уровне в единой системе мать–плацента–плод [25–27]. Благодаря способности подавлять экспрессию гена индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы мелатонин ограничивает продукцию провоспалительных молекул (простаноидов, лейкотриенов, цитокинов и др.), осуществляя тем самым противовоспалительную защиту [28]. Как иммуномодулятор и регулятор сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза он участвует в процессах имплантации, плацентации, морфофункциональном развитии плаценты и сохранении ее нейроиммуноэндокринной функции, направленной на формирование и становление жизненно важных функциональных систем плода [29]. Уже в первом триместре беременности ворсины трофобласта являются не только источником мелатонина, но имеют и классические трансмембранные рецепторы мелатонина – MT1 и MT2 [30, 31], что указывает на способность локально синтезирующегося мелатонина оказывать паракринное, аутокринное и/или интракринное влияние в плаценте [32]. Клетки цитотрофобласта и синцитиотрофобласта не только содержат мембранные рецепторы MT1 и MT2, но в них также синтезируется мелатонин [23]. Мелатонин, вырабатываемый в цитотрофобласте, синцитиотрофобласте, синцитиокапиллярных мембранах, синцитиальных почках и узлах, в клетках стромы и эндотелии сосудов, является прямым поглотителем образующихся свободных радикалов и стимулятором активности антиоксидантных ферментов, а также регулятором процесса дифференциации и апоптоза клеток цитотрофобласта [25–33]. При этом он сохраняет баланс клеток цитотрофобласта и синцитиотрофобласта, поддерживая тем самым гомеостаз плаценты [30, 34, 35].

Мелатонин содержится и в амниотической жидкости [22]. Плацентарный мелатонин поступает в кровоток беременной максимально в третьем триместре, что способствует значительному увеличению его уровня к концу беременности [36]. Материнский мелатонин с момента оплодотворения и имплантации плодного яйца участвует в механизмах регуляции гормонопродуцирующей функции плаценты и становления ее циркадного ритма, контролируя экспрессию генов (Bmal1, Perl3,Cry1-2, Clock, VEGE) [33, 37]. Возрастание у здоровой женщины продукции мелатонина определяет закономерность перестройки состава микробиома во время беременности в сторону максимальной представленности *Bifidobacterium* и *Lactobacilli* [38]. Плацентарный мелатонин обеспечивает в окружа-

ющей ребенка среде оптимальное содержание *Bifidobacterium* и *Lactobacilli*, что определяет нормальное течение беременности и подготовку к рождению здорового ребенка [39]. Проникая легко к плоду, он играет ключевую роль в его морфофункциональном развитии и формировании циркадианных ритмов жизнедеятельности [40].

РОЛЬ МЕЛАТОНИНА В РАЗВИТИИ МОЗГА ПЛОДА

Рецепторы к мелатонину имеются в центральных и периферических тканях плода уже на самых ранних стадиях внутриутробного развития [41–43]. Клетки эмбриона дифференцированы на эктодерму, мезодерму и эндодерму уже к третьей неделе развития. На этой стадии из эмбриональной эктодермы путем трансформации клеток в нейробласты формируется нервная пластинка, затем нервная трубка. Далее эмбрион в течение ранних недель созревания проходит ряд сложных процессов, формирующих основы ЦНС. Рецепторы к мелатонину обнаружены в мозге начиная с эмбрионального периода развития, причем их количество значительно возрастает в первые недели после имплантации в мягкой мозговой оболочке, сосудах, в коре и стволе головного мозга, мозжечке, таламусе, гипоталамусе [44–46]. На 24-й неделе гестации они обнаруживаются в гипофизе плода, а к 28-й неделе – на нейронах дорзальных отделов мозга, в области перивентрикулярных ядер таламуса. Далее наибольшая их концентрация отмечена в гипоталамусе, супрахиазматической области мозга, гипофизе, меньше в структурах среднего мозга и в коре [44, 47.] Локализация рецепторов мелатонина во всех отделах головного мозга с самых ранних сроков внутриутробного развития свидетельствует об участии материнского мелатонина в его морфологическом и функциональном созревании. Кроме того, в самой мозговой ткани плода также наблюдается продукция мелатонина, самая высокая в митохондриях, меньше в мембранах, ядрах и цитозоле клеток [14, 48]. В этот период развития мозг особенно подвержен повреждению вследствие высокого потребления энергии при наличии низких уровней цитозольных антиоксидантов и избыточной продукции реактивных радикалов кислорода. Наряду с материнским собственный мелатонин, вырабатываемый в мозге плода, защищает митохондрии от свободнорадикального повреждения и стимулирует активность других антиоксидантных ферментов [48, 49]. Он активирует пролиферацию невральных стволовых клеток, их дифференциацию в допаминэргические нейроны и снижает продукцию астроцитов, а также увеличивает образование фактора роста нервов (BDNF) и глиального нейротрофического фактора (GDNF) [50–53]. Мелатонин участвует в формировании у плода циклической организации сна, особенно в регуляции парадоксальной фазы сна [54, 55]. Гормон регулирует продукцию сосудистого эндотелиального фактора роста и оксида азота, которые, как известно, увеличивают сосудистую проницаемость и метаболизм мозговой ткани [56]. Это обеспечивает реализацию генетической программы формирования и дифференциации мозговых структур, а также развитие нейрональной пластичности [10, 57].

Зачатки эпифиза появляются у эмбриона человека на 5–7-й неделе внутриутробного развития, а у 3-х месячного плода он уже отчетливо разделяется на передний и задний отделы, имеет типичную картину нейроглиального роста и содержит капилляры [58]. Супрахиазматические ядра в базальном гипоталамусе плода уже морфологически зрелы к середине гестации, в этот период в них уже отчетливо различима ритмическая экспрессия генов Per1, Per2, Cry1, Bmal1 и выявляются ритмы mRNA для вазопрессина и протеина [59, 60]. Кроме того, нервные волокна ретиногипоталамического тракта, верхние цервикальные ганглии и симпатические норадренэргические пути также хорошо сформированы ко второй половине беременности [61]. Синтез мелатонина в эпифизе наблюдается уже на 26-й неделе внутриутробного развития плода [62–64], а материнский мелатонин запускает становление циркадианных ритмов, включая и ритмы СХЯ [33, 65].

На основании результатов экспериментальных и клинических исследований была высказана гипотеза, согласно которой во время внутриутробной жизни супрахиазматические ядра и органы плода являются периферическими осцилляторами, ритмическая активность которых запускается и зависит от состояния циркадианной организации жизнедеятельности материнского организма и его основного мессенджера биоритмов, генерируемых СХЯ, - мелатонина. Это обеспечивает интеграцию эндогенных биоритмов функциональных систем ребенка в циркадианную подобную взрослым систему, регулируемую собственными СХЯ в зависимости от циркадианных изменений освещенности окружающей среды [60]. Циркадианный ритм продукции эпифизарного мелатонина у здоровых новорожденных детей наблюдается уже в первые дни жизни [20, 21]. Дальнейшее созревание центрального водителя ритма продолжается после рождения ребенка, и мелатонин, передаваемый с молоком матери, также способствует поддержанию и развитию “clock” генов в нейронах коры головного мозга и в других областях центральной нервной системы [66, 67]. Поэтому при грудном вскармливании у ребенка уже к концу перинатального периода жизни величина и суточный ритм продукции мелатонина соответствуют таковым у взрослых людей [68].

РОЛЬ МЕЛАТОНИНА В РАЗВИТИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ ПЛОДА

Известно, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) является главным источником экстрапинеального мелатонина, где его концентрация в тканях в 10–100 раз превышает таковую в периферической крови, особенно в дневное время [4, 69]. Мелатонин синтезируется из серотонина в энтерохромаффинных клетках слизистой оболочки во всех отделах желудочно-кишечного тракта, в митохондриях клеток печени, поджелудочной железы, гепатобилиарного тракта, слюнных желез [70–73] и влияет как аутокринный и паракринный гормон в других сегментах ЖКГ (кишечные ворсины, субмукозное пространство, мышцы [69]. Уровень мелатонина всегда выше в портальной вене, чем в периферической крови в любое время суток, особенно после приема пищи, что позволяет считать его медиатором межорганных взаимоотношений [72]. Часть вырабатываемого в кишечнике мелатонина через портальную циркуляцию крови попадает в общую систему циркуляции. Мелатонин метаболизируется в печени, после чего его метаболиты и частично неизмененный мелатонин экскретируются в желчь и ЖКТ. Показано наличие рецепторов к мелатонину во всех отделах желудочно-кишечного тракта, в печени и в поджелудочной железе [43, 74]. Мелатонин является мощным поглотителем свободных радикалов, стимулирует активность антиоксидантных ферментов, защищает слизистую верхних отделов ЖКТ от повреждения соляной кислотой и желчными кислотами, участвует в регуляции трансмембранного транспорта ионов и электролитов, тонуса гладкой мускулатуры кишечника, процесса пищеварения [75].

Первые эндокриноциты появляются в прямой и ободочной кишке плода на 6–9-й неделе внутриутробного развития [76, 77]. В дальнейшем их количество прогрессивно увеличивается, причем максимальная плотность распределения наблюдается в червеобразном отростке во все сроки внутриутробного развития плода. Это указывает на существенную роль эндокринного аппарата кишечника, в частности, мелатонина в регуляции механизмов эмбрионального гистогенеза и функционального развития ЖКТ [76, 78]. Мелатонин способствует дифференциации и регенерации эпителиальных клеток, регулирует васкуляризацию и проницаемость кишечной стенки, подавляет секрецию соляной кислоты и оксидативный эффект желчной кислоты [79]. Рецепторы к мелатонину обнаружены во всех отделах ЖКТ плода, в печени, поджелудочной железе [47, 80]. Материнский мелатонин синхронизирует периферические осцилляторы в этих органах и координирует их функцию с ритмами clock генов супрахиазматичческих ядер и других тканей организма, включая аденогипофиз, надпочечники [37, 81, 82]. Циркадный ритм экспрессии клок генов толстого кишечника плода определяется уже к 33-й неделе внутриутробного развития. В антенатальном периоде онтогенеза материнский мелатонин является ключевой молекулой, направляющей и координирующей генетический процесс развития взаимосвязи часовых (clock) генов тканей организма ребенка и формирующейся микробиоты [83]. Таким образом, мелатонин определяет созревание ЖКТ, печени, поджелудочной железы и их защиту при адаптации ребенка к новым условиям после рождения.

Известно, что мелатонин играет особую роль в развитии сердечно-сосудистой системы плода. Через кальмодулин и рецепторы MT1a и MT1c материнский мелатонин контролирует морфогенез сердца эмбриона [84]. Митохондрии кардиомиоцитов играют незаменимую роль в выживании клетки, продукции энергии и гомеостаза кальция. Мелатонин поддерживает эти процессы, сохраняя целостность митохондриальной мембраны [85]. На ранних сроках развития он влияет на экспрессию часовых генов (bmal1 и per2) в сердце плода, а к моменту рождения обеспечивает оптимальное функционирование сердечно-сосудистой системы, синхронизируя работу циркадных осцилляторов в сердце, сосудах и в координирующих их работу мозговых центрах [86]. Этот синхронизирующий эффект мелатонина зависит от плотности его рецепторов в различных структурах, контролирующих объем и сосудистое сопротивление [87].

В легких плода нейроэндокринные клетки, продуцирующие предшественник мелатонина серотонин, уже хорошо дифференцированы на 8-й неделе беременности и число их значительно возрастает к концу внутриутробного развития, что является свидетельством их важной роли во время внутриутробной жизни и в постнатальной адаптации [88–90].

Мелатонин участвует в становлении функции коры надпочечников у плода через экспрессию мембранных рецепторов MT1, в результате чего происходит подавление АСТН – стимулированной продукции кортизола и реализация его циркадного ритма с максимумом в утренние и дневные часы [56, 91]. Мелатонин стимулирует дифференциацию и развитие почечных нефронов, а также формирование циркадного ритма фильтрационной функции через MT1a и MT1б рецепторы [92]. Показано, что материнский мелатонин играет важную роль в развитии у плода бурой жировой ткани и в становлении терморегуляции [93]. Формирование системы врожденного иммунитета у плода также находится под контролем мелатонина, который участвует в дифференциации Т-лимфоцитов (особенно Th-17 и T-reg), содержащих необходимые для его синтеза энзимы [94], и играет фундаментальную роль в нейроиммуномодуляции [95]. Он стимулирует продукцию цитокинов, активирует

фагоцитоз, NK клетки и отклонение иммунного ответа в сторону Т-хелперов, обеспечивая противовоспалительный ответ [96].

Мелатонин участвует в регуляции продукции тромбоцитов мегакариоцитами, а затем синтезируется в самих тромбоцитах, поддерживая их антиагрегационное состояние и способность транспортировать его в мозг и другие ткани организма плода [97]. Дифференцировка остеобластов так же, как и морфологическое развитие гонад происходит у плода при участии материнского мелатонина [98, 99].

Таким образом, в пренатальном онтогенезе материнский мелатонин является ключевой молекулой, направляющей и координирующей генетический процесс морфофункционального развития плода, что является залогом успешной постнатальной адаптации к новым условиям окружающей среды и здоровья в последующие месяцы и годы жизни. Недостаток продукции и отсутствие циркадного ритма материнского мелатонина и, как следствие, нарушение его синтеза в плацентарной ткани в процессе беременности определяют программирование перинатальной и отдаленной патологии у потомства [100–103].

МЕЛАТОНИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ПРОГРАММИРОВАНИЕ ПАТОЛОГИИ У ПОТОМСТВА

Полученные в последнее десятилетие данные о механизмах развития неблагоприятных последствий показали, что только благодаря материнскому мелатонину генетическая программа развития системы “мать–плацента–плод” защищена от эпигенетического повреждения. Осуществляя контроль метилирования ДНК и модификации гистонов, мелатонин предупреждает изменения экспрессии генов, имеющих непосредственное отношение к программированию развития различных патологий [104–107]. Показано, что программирование можно предотвратить или ослабить ранним введением мелатонина [108–110]. Так, в экспериментальных исследованиях, проведенных на различных животных (крысы, овцы), установлено, что при наличии неблагоприятных факторов окружающей среды мелатонин препятствует развитию оксидативного и нитративного стресса в плаценте и у плода [11, 111–113], подавляет продукцию провоспалительных и стимулирует антивоспалительных цитокинов в материнской сыворотке, амниотической жидкости, в мозге плода [114], стабилизирует гематоэнцефалический барьер, предотвращает развитие воспаления и гибель нейронов (апоптоз) [115–119]. Гормон регулирует продукцию сосудистого эндотелиального фактора роста и оксида азота, которые, как известно, увеличивают сосудистую проницаемость и метаболизм мозговой ткани [120, 121]. Вызванные гипоксией изменения ультраструктуры гиппокампа и перивентрикулярной зоны мозга уменьшались при использовании мелатонина [122]. Введение мелатонина крысам, подвергнутым воздействию никотина, подавляло окислительный стресс и редуцировало у плодов повреждение легких и печени [123], а в условиях гипергликемии при диабете предотвращало дефекты невральной трубки [124]. Антенатальное применение мелатонина при плацентарной недостаточности улучшало функционирование плаценты, нормализовало плодово-плацентарное кровообращение, коронарный кровоток, сердечную деятельность и рост плода [26, 125–128]. Мелатонин оказывал множественные позитивные эффекты на митохондрии: понижал интенсивность окислительного стресса, способствовал сохранению митохондриального мембранного потенциала, повышал эффективность процесса генерации АТФ, регулировал оптимальный баланс между уровнем про- и антиапоптических белков, препятствовал высвобождению цитохрома С в цитозоль и ингибировал активность каспазы 3 [112, 129]. Он стимулировал функциональную активность астроцитов, участвующих в развитии нейронов, синапсов и в репаративных процессах, снижал избыточное образование в клетках глии оксида азота и его токсичных метаболитов [130–132].

Результаты многочисленных экспериментальных исследований, доказавших роль мелатонина в оптимальном завершении беременности в условиях сформировавшейся патологии [133–137], послужили основанием для разработки новых подходов к его использованию в клиническом акушерстве с целью профилактики и лечения перинатальной патологии у потомства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Анисимов В.Н.* Мелатонин (роль в организме, применение в клинике). СПб.: Система; 2007. [*Anisimov V.N.* Melatonin (rol’v organizme, primenenie v klinike). Saint-Petersburg: Sistema; 2007. (in Russ)].
2. *Kvetnoy I.M., Sandvik A.K., Waldum H.L.* The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. J. Mol. Endocrinol. 18 (1): 1–3. 1997. https://doi.org/10.1677/jme.0.0180001
3. *Mazzoccoli G.* The timing clock work of life. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 25: 137–143. 2011. PMID: 21382283
4. *Acuna-Castroviejo D., Escames G., Venegas C, Diaz-Casado M.E., Lima-Cabello E., Lopez L.C., Rosales-Corral S., Tan D.X., Reiter R.J.* Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cell. Mol. Life Sci. 71 (16): 2997–3025. 2014. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579
5. *Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali D.P., Poeggedoler B., Hardeland R.* Melatonin. Nature’s most versatile biological signal? FEBS J. 273 (13): 2813–2838. 2006. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x

6. *Kvetnoy I.M.* Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. Histochem. J. 31 (1): 1–12. 1999.
https://doi.org/ 10.1023/a:1003431122334

7. *Arutjunyan A.V., Evsyukova I.I., Polyakova V.O.* The role of Melatonin in Morphofunctional Development of the Brain in Early Ontogeny. Neurochemical J. 13 (3): 240–248. 2019.
https://doi.org/10.1134/S1819712419030036

8. *Kennaway D.J.* Melatonin and development physiology and pharmacology. Sem. Perinatol. 24 (4): 258–266. 2000.
https://doi.org/10.1053/sper.2000.8594

9. *Cipolla-Neto J., Amaral F.G.* Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights. Endocr. Rev. 39 (6): 990–1028. 2018.
https://doi.org/10.1210/er.2018-00084

10. *Sagrillo-Fagundes L., Assuncao Salustiano E.M., Yen P.W., Soliman A., Vaillancourt C.* Melatonin in Pregnancy: Effects on Brain Development and CNS Programming Disorders. Curr. Pharm. Des. 22 (8): 978–986. 2016.
https://doi.org/10.2174/1381612822666151214104624

11. *Reiter R.J., Rosales-Corral S., Tan D.X., Jou M.J., Galano A., Hu B.* Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. Cell. Mol. Life Sci. 74 (21): 3863–3881. 2017.
https://doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7

12. *Claustrat B., Brun J., Chazot G.* The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med. Rev. 9 (1): 11–24. 2005.
https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.08.001

13. *Schlabritz-Loutsevitch N., Hellner N., Middendorf R., Müller D., Olcese J.* The human myometrium as a target for melatonin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88 (2): 908–913. 2003.
https://doi.org/10.1210/jc.2002-020449

14. *Venegas C., García J.A., Escames G., Ortiz F., López A., Doerrier C., García-Corzo L., López L.C., Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D.* Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. J. Pineal Res. 52 (2): 217–227. 2012.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x

15. *Ma X., Idle J.R., Krausz K.W., Gonzalez F.J.* Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. Drag Metab. Dispos. 33 (4): 489–94. 2005.
https://doi.org/10.1124/dmd.104.002410

16. *Reppert S.M., Godson C., Mahle C.D., Weaver D.R., Slaugenhaupt S., Gusella J.F.* Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (19): 8734–8738. 1995.
https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8734

17. *Jockers R., Delagrange P., Dubocovich M.L., Markus R.P., Renault N., Tosini G., Cecon E., Zlotos D.* Update on melatonin receptors. IUPHAR Review 20. Br. J. Pharmacol. 173 (18): 2702–2725. 2016.
https://doi.org/10.1111/bph.13536

18. *Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R.S., Slominski A.T.* Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. Mol. Cell Endocrinol. 351 (2): 152–166. 2012.
https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.004

19. *Dubocovich M.L.* Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. Sleep. Med. 8 (3): 34–42. 2007.
https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.10.007

20. *Ogasawara T., Adachi N., Nishijima M.* Melatonin levels in maternal plasma before and during delivery, and in fetal and neonatal plasma. Nihon. Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 43 (3): 335–341. 1991.

21. *Ivanov D.O., Evsyukova I.I., Mazzoccoli G., Anderson G., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M., Carbone A., Nasyrov R.A.* The Role of Prenatal Melatonin in the Regulation of Childhood Obesity. Biology. 9 (4): 72. 2020.
https://doi.org/10.3390/biology9040072

22. *Kivela A.* Serum melatonin during human pregnancy. Acta Endocrinol (Copengagen). 1991; 124 (3): 233–237.

23. *Nakamura Y., Tamura H., Kashida S., Nakayama H., Yamagata Y., Karube A., Sugino N., Kato H.* Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. J. Pineal Res. 30 (1): 29–33. 2001.
https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.300104.x

24. *Reiter R.J., Tan D.X., Korkmaz A., Rosales-Corral S.A.* Melatonin and stabile circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. Hum. Reprod. Update. 20 (2): 293–307. 2014.
https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.014

25. *Soliman A., Lacasse A.A., Lanoix D., Sagrillo-Fagundes L., Boulard V., Vaillancourt C.* Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation. J. Pineal Res. 59 (10): 38–45. 2015.
https://doi.org/10.1111/jpi.12236

26. *Richter H.J., Hansell J.A., Raut S., Glussani D.A.* Melatonin improves placental efficiency and birth weight increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. J. Pineal Res. 46 (4): 357–364. 2009.
https://doi.org/10.1111/j,1600-079X.2009.00671x

27. *Okatani Y., Wakatsuki A., Shinohara K., Taniguchi K., Fukaya T.* Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion. J Pineal Res. 31 (2): 173–178. 2001.
https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.310212.x

28. *Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Galano A., Zhou M.J., Hu B.* As a Mitochondria Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. Molecule. 23 (2): 509. 2018.
https://doi.org/10.3390/molecules23020509

29. *Boden M.J., Varcoe T.J., Kennaway D.J.* Circadian regulation of reproduction: From gamete to offspring. Prog. Biophys. Mol. Biol. 113 (3): 387–397. 2013.
https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.01.003

30. *Lanoix D., Guerin P., Vaillancourt C.* Placental melatonin production and melatonin receptor expression are alteed in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. J. Pineal Res. 53 (4): 417–425. 2012.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01012x

31. *Iwasaki S., Nakazawa K., Sacai J., Kometani K., Iwashita M., Yoshimura Y., Maruyama I.* Melatonin as local regulator of human placental function. J. Pineal Res. 39 (3): 261–265. 2005. .
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00244.x

32. *Sagrillo-Fagundes L., Salustiano E.M.A., Ruano R., Markus R.P., Vaillancourt C.* Melatonin modulates autophagy and inflammation protecting human placental trophoblast from hypoxia/reoxygenation. J Pieal Res. 65 (4): e12520. 2018.
https://doi.org/10.1111/jpi.12520

33. *Valenzuela F.J., Vera J., Venegas C., Pino F., Lagunas C.* Circadian System and Melatonin Hormone: Risk Factors for Complications during Pregnancy. Obstet. Gynecol. Int. 2015: 825802. 2015.
https://doi.org/10.1155/2015/825802

34. *León J., Acuña-Castroviejo D., Escames G., Tan D-X., Reiter R.J.* Melatonin Mitigates Mitochondrial Malfunction. J. Pineal Res. 38 (1): 1–9. 2005.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00181.x

35. *Tamura H., Nakamura Y., Terron M.P., Flores L.J., Manchester L.S., Tan D-X., Sugino N., Reiter R.J.* Melatonin and pregnancy in the human. Reprod. Toxicol. 25 (3): 291–303. 2008.
https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.03.005

36. *Mark P.J., Crew R.C, Wharfe M.D, Waddell B.J.* Rhythmic Three-Part Harmony: The Complex Interaction of Maternal, Placental and Fetal Circadian Systems. J. Biol. Rhythms. 32 (6): 534–549. 2017.
https://doi.org/10.1177/0748730417728671

37. *Edwards S.M., Solveig A., Dunlop A.L., Corwin E.J.* The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. MCN Am. J. Matern.Child Nurs. 42 (6): 310–317. 2017.
https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000372

38. *Fox C., Eichelberger K.* Maternal microbiome and pregnancy outcomes. Fertil. Steril. 104 (6): 138–63. 2015.
https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2915.09.037

39. *Okatani Y., Okamoto K., Hayashi K., Wakatsuki A., Tamura S., Sagara Y.* Materna-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. J. Pineal Res. 125 (3): 129–134. 1998.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1998.tb00550.x

40. *Thomas J.E., Purvis C.C., Drew J.E., Abramovich D.R., Williams L.M.* Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[(125)]iodomelatonin binding and MT1 gene expression. J. Pineal Res. 33 (4): 218–224. 2002.
https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2002.02921.x

41. *Williams L.M., Hannah L.T., Adam C.L., Bourke D.A.* Melatonin receptors in red deer fetuses (Cervus elaphus). J. Reprod Fertil. 110 (1): 145–151. 1997.
https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100145

42. *Peschke E., Bahr I., Muhlbauer E.* Melatonin and Pancreatic Islets: Interrelationships between Melatonin? Insulin and Glucagon. Int. J. Mol. Sci. 14 (4): 6981–7015. 2013.
https://doi.org/10.3390/ijms.14046981

43. *Weaver D.R., Rivkees S.A., Reppert S.M.* Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain. J. Neurosci. 9 (7): 2581–2590. 1989.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-07-02581.1989

44. *Torres-Farfan C., Richter H.G., Rojas-Garci'a P., Vergara M., Forcelledo M.L., Valladares L.E., Torrealba F., Valenzuela G.J., Serón-Ferré M.* mt1 Melatonin Receptor in the Primate Adrenal Gland: Inhibit ion of Adrenocorticotropin-Stimulated Cortisol Production by Melatonin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88 (1): 450–458. 2003.
https://doi.org/10.1210/jc.2002-021048

45. *Yuan H., Lu Y., Pang S.F.* Binding characteristics and regional distribution of [125I]iodomelatonin binding sites in the brain of the human fetus. Neurosci. Lett. 130 (2): 229–232. 1991.
https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90403-g

46. *Williams L.M., Martinoli M.G., Titchener L.T., Pelletier G.* The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. Endocrinology. 128 (4): 2083–2090. 1991.
https://doi.org/10.1210/endo-128-4-2083

47. *Liu Y.J., Zhuang J., Zhu H.Y., Shen Y.X., Tan Z.L., Zhou J.N.* Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. J. Pineal Res. 43 (3): 232–238. 2007.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00466.x

48. *Wakatsuki F., Okatani Y., Shinohara K., Ikenjue N., Kaneda C., Fukaya T.* Melatonin protects fetal rat brain against oxidative mitochondrial damage. J. Pineal Res. 30 (1): 22–28. 2001.
https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.300103.x

49. *Yu X., Li Z., Zheng H., Ho J., Chan M.T.V., Wu W.K.K.* Protective roles of melatonin in central nervous system diseases by regulation of neural stem cells. Cell Prolif. 50 (2): e12323. 2017.
https://doi.org/10.1111/cpr.12323

50. *Kong X., Li X., Cai Z., Yang N., Liu Y., Shu J., Pan L., Zuo P.* Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. Cell. Mol. Neurobiol. 2008. 28 (4): 569–579. 2008.
https://doi.org/10.1007/s10571-007-9212-7

51. *Bavithra S., Sugantha Priya E., Selvakumar K., Krichnamoorthly G., Arunakaran J.* Effect of Melatonin on Glucamate: BDNF Signaling in the Cerebral Cortex of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) - Exposed Adult Male Rats. Neurochem. Res. 40 (9): 1858–1869. 2015.
https://doi.org/10.1007/s11064-015-1677-z

52. *Niles L.P., Armstrong K.J., Castro L.M.R., Dao C.V., Sharma R., McMillan C.R., Doering L.C., Kirkham D.L.* Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. BMC Neurosci. 5: 41. 2004.
https://doi.org/10.1186/1471-2202-5-41

53. *Sandyk R.* Melatonin and maturation of REM sleep. Int. J. Neurosci.63 (1-2): 105–114. 1992.
https://doi.org/10.3109/00207459208986660

54. *Jan J.E., Reiter R.J., Wasdell M.B., Bax M.* The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders. J. Pineal Res. 46 (1): 1–7. 2009.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00628.x

55. *Torres-Farfan C., Valenzuela F.J., Mondaca M., Valenzuela G.J., Krause B., Herrera E.A., Riquelme R., Llanos A.J., Seron-Ferre M.* Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland. J. Physiol. 586 (16): 4017–4027. 2008.
https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154351

56. *Jimenez-Jorge S., Guerrero J.M., Jimenez-Caliani A.J., Naranjo M.C., Lardone P.G., Carrillko-Vico A., Osuna C., Molinero P.* Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. J Pineal Res. 42 (3): 240–246. 2007.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00411.x

57. *Sagrillo-Fagundes L., Assuncao Salustiano E.M., Yen P.W., Soliman A., Vaillancourt C.* Melatonin in Pregnancy: Effects on Brain Development and CNS Programming Disorders. Curr. Pharm. Des. 22 (8): 978–986. 2016. https://doi.org/10.2174/1381612822666151214104624

58. *Хелимский А.М.* Эпифиз (шишковидная железа). М.: Медицина. 1969. [*Khelimskii A.M.* Epiphysis (pineal gland). M. Medicine. 1969. (in Russ)].

59. *Kovacikova Z., Sladek M., Bendova Z., Illnerova H., Simova A.* Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. Biol. Rhythms. 21 (2): 140–148. 2006. https://doi.org/10.1177/0748730405285876

60. *Seron-Ferre M., Mendez M., Abarzua-Catalan L., Vilches N., Valenzuela F.J., Reynolds H.E., Llanos A.J., Rojas A., Valenzuela G.J., Torres-Farfan C.* Circadian rhythms in the fetus. Mol. Cell. Endocrinol. 349 (1): 68–75. 2012. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.039

61. *Weinert D.* Ontogenetic development of the mammalian circadian system. Chronobiol. Int. 22 (2): 179–205. 2005. https://doi.org/10.1081/cbi-200053473

62. *Colella M., Biran V., Baud O.* Melatonin and the newborn brain. Early Hum. Dev. 102: 1–3. 2016. https://doi.org/10.1016/j.earlhudev.2016.09.001

63. *Commentz J.C., Henke A., Dammann O., Hellwege H.H., Willig R.P.* Decreasing melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate excretion with advancing gestational age in preterm and term newborn male infants. Eur. J. Endocrinol. 135 (2): 184–187. 1996. https://doi.org/10.1530/eje.0.1350184

64. *Thomas J.E., Drew D.R., Abramovich D.R., Williams L.M.* The role of melatonin in the human fetus (review). Int. J. Mol. Med. 1 (3): 539–543. 1998. https://doi.org/10.3892/ijmm.1.3.539

65. *Torres-Farfan C., Seron-Ferre M., Dinet V., Korf H.W.* Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. J. Pineal Res. 40 (1): 64–70. 2006. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00279.x

66. *Arsianoglu S., Bertino E., Nicocia M., Moro G.E.* WARM Working Group on Nutrition: potential chronobiotic role of human milk in sleep regulation. J. Perinat. Med. 49 (1): 1–8. 2012. https://doi.org/10.1515/jpm.2011.134

67. *Rath M.F., Rohde K., Fahrenkrug J., Moller M.* Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation. Brain Struct . Funct . 218 (2): 551–562. 2013. https://doi.org/10.1007/s00429-012-0415-4

68. *McGraw K., Hoffmann R., Harker C., Herman J.H.* The development of circadian rhythms in human infant. Sleep. 22 (3): 303–10. 1999. https://doi.org/10.1093/sleep/22.3.303

69. *Bubenik G.A.* Review: Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function and Clinical Relevance. Dig. Dis. Sci. 47 (10): 2336–2348. 2002. https://doi.org/10.1023/A:1020107915919

70. *Tan D.X., Manchester L.C., Qin L., Reiter R.J.* Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. Int. J. Mol. Sci. 17 (12): 2124. 2016. https://doi.org/10.3390/ijms17122124

71. *Raikhlin N.T., Kvetnoy I.M.* Melatonin and enterochromaffine cells. Acta Histochem. 55 (1): 19–24. 1976. https://doi.org/10.1016/S0065-1281(76)80092-X

72. *Messner M., Huether G., Lorf T., Ramadori G., Schwörer H.* Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. Life Sci. 69 (5): 543–551. 2001. https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01143-2

73. *Shimozuma M., Tokuyama R., Tatehara S., Umeki H., Ide S., Mishima K., Saito I., Satomura K.* Expression and cellular localizaion of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. Histochem. Cell Biol. 135 (4): 389–396. 2011. https://doi.org/10.1007/s00418-011-0800-8

74. *Konturek S.J., Konturek P.C., Brzozowski T., Bubenik G.A.* Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. J. Physiol. Pharmacol. 58 (6): 23–52. 2007.

75. *Bubenic J.A.* Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. J. Pysiol. Pharmacol. 59. (2): 33–51. 2008.

76. *Костюкевич С.Б.* Гистотопография и плотность расположения эндокринных клеток эпителия слизистой оболочки толстой кишки плода человека. Морфология. 26 (5): 52–55. 2004. [*Kostyukevich S.B.* Histotopography and density of the location of endocrine cells of the epithelium of the colon mucosa of the human fetus. Morphology. 26 (5): 52–55. 2004. (in Russ.)].

77. *Lolova I.S., Davidoff M.S., Itzev D.E.* Histological and immunocytochemical data on the differentiation of intestinal endocrine cells in human fetus. Acta Physiol. Pharmacol. Bulg. 23 (3-4): 61–71. 1998.

78. *Voiculescu S.E., Zygouropoulos N., Zahiu C.D., Zagrean A.M.* Role of melatonin in embryo fetal development. J. Med. Life. 7 (4): 488–492. 2014.

79. *Pevet P., Challet E.* Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clock network. J. Physiol. Paris. 105 (4-6): 170–182. 2011. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.07.001

80. *Ramracheva R.D., Muller D.S., Squires P.E., Brereton H., Sugden D., Huang G.C., Amiel S.A., Jones P.M., PersaudS.J.* Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. J. Pineal Res. 44 (3): 273–279. 2008. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00523.x

81. *Arendt J.* Melatonin and human rhythms. Chronobiol. Int. 23 (1-2): 21–37. 2006. https://doi.org/10.1080/07420520500464361

82. *Mazzoccoli G., Pazienza V., Vinciguerra M.* Clock genes and Clock-Controlled Genes in the Regulation of Metabolic Rhythms. Chronobiol. International. 29 (3): 227–251. 2012. https://doi.org/10.3109/07429528.2012.658127

83. *Polidarova L., Olejnikova L., Pauslyova L., Sladek M., Sotak M., Pacha J., Sumova A.* Development and entrainment of the colonic circadian clock during ontogenesis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 306 (4): G346–356. 2014. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00340.2013

84. *Nogueira R.C., Sampaio L.F.S.* Eye and heart morphogenesis are dependent on melatonin signaling in chick embryos. J. Exp. Biol. 220 (Pt 20): 3826–3835. 2017. https://doi.org/10.1242/jeb.159848

85. *León J., Acuña-Castroviejo D., Escames G., Tan D-X., Reiter R.J.* Melatonin Mitigates Mitochondrial Malfunction. J. Pineal Res. 38 (1): 1–9. 2005. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00181.x

86. *Zeman M., Herichova I.* Melatonin and clock genes expression in the cardiovascular system. Front. Biosci. (Schol Ed). 5: 743–53. 2013. https://doi.org/10.2741/s404

87. *Ekmekciogly C., Thalhammer T., Humpeler S., Mehrabi M.R., Glogar H.D., Hölzenbein T., Markovic O., Leibetseder V.J., Strauss-Blasche G., Marktl W.* The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. J. Pineal Res. 35 (1): 40–44. 2003. https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00051.x

88. *Carlomagno G., Minini M., Tilotta M., Unfer V.* From Implantation to Birth: Insight into Molecular Melatonin Functions. Int. J. Mol. Sci. 19 (9): 2802. 2018. https://doi.org/10.3390/ijms19092802

89. *Cutz E.* Hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells in infancy and childhood. Semin. Diagn. Pathol. 32 (6): 420-37. 2015. https://doi.org/10.1053/j.semdp.2015.08.001

90. *Sunday M.E.* Pulmonary Neuroendocrine Cells and Lung Development. Endocr. Pathol. 7 (3): 173–201. 1996. https://doi.org/10.1007/BF02739921

91. *Mendez N., Abarzua-Catalan L., Vilches N., Galdames H.A., Spichiger C., Richter H.G., Valenzuela G.J., Seron-Ferre M., Torres-Farfan C.* Timed Maternal Melatonin Treatment Reverses Circadian Disruption of the Fetal Adrenal Clock Imposed by Exposure to Constant 2015. Light. PLoS ONE. 7 (8): e42713. 2012. https://doi.org/1.1371/journal.pone.0042713

92. *Drew J.E., Williams L.M., Hannah L.T., Barrett P., Abramovich D.R., Morgan P.J.* Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. J Endocrinology. 1998. 156: 261–267.

93. *Seron-Ferre M., Reynolds H., Mendez N.A., Mondaca M., Valenzuela F., Ebensperger R., Valenzuela G., Herrera E.A., Llanos A.J., Torres-Farfan C.* Impact of maternal melatonin suppression on amount and functionality of brown adipose tissue (BAT) n the newborn sheep. Front. Endocrinol (Lausanne) 5: 232. 2015. https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00232

94. *Ren W., Liu G., Chen S., Yin J., Wang J., Tan B., Wu G., Bazer F.W., Peng Y., Li T., Reiter R.J., Yin Y.* Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. J. Pineal Res. 62 (3): e12394. 2017. https://doi.org/10.1111/jpi.12394

95. *Calvo J.R., Gonzalez-Yanes C., Maldonado M.D.* The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. J. Pineal Res. 55 (2): 103–20. 2013. https://doi.org/10.1111/jpi.12075

96. *Szczepanik M.* Melatonin and its influence on immune system. J. Physiol. Pharmacol. 58 (Suppl 6): 115–124. 2007.

97. *Di Bella L., Gualano L.* Key aspects of melatonin physiology: thirty years of research. Neuro Endocrinol. Lett. 27 (4): 425–432. 2006.

98. *Roth J.A., Kim B.G., Lin W.L., Cho M.I.* Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J. Biol. Chem. 274 (31): 22041–22047. 1999. https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.22041

99. *Gunduz B., Stetson M.H.* Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters.vi. effects of time-dependent 1-hr melatonin infusions in the mother on photoperiod-induced testicular development of her offspring. J. Pineal Res 34 (3): 217–225. 2003. https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2003.00035.x

100. *Nagai R., Watanabe K., Wakatsuki A., Hamada F., Shinohara K., Hayashi Y., Imamura R., Fukaya T.* Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia-reperfusion-induced oxidative-nitrosative mitochondrial damage in placenta. J. Pineal Res. 45 (3): 271–276. 2008. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00586x

101. *Berbets A., Koval H., Barbe A., Albota O., Yuzko O.* Melatonin decreases and cytokines increase in women with placental insufficiency. J. Matern. Fetal Neonatal. Med. 1–6. 2019. https://doi.org/10.1080/1476058.2019.1608432

102. *Feng P., Hu Y., Vurbic D. Guo Y.* Maternal Stress Induces Adult Reduced REM sleep and Melatonin Level. Dev. Neurobiol. 72 (5): 677–687. 2012. https://doi.org/10.1002/dneu.20961

103. *Ferreira D.S., Amaral F.G., Mesquita C.C., Barbosa A.P.L., Lellis-Santos C., Turati A.O., Santos L.R., Sollon C.S., Gomes P.R., Faria J.A., Cipolla-Neto J., Bordin S., Anhê G.F.* Maternal Melatonin Programs the Daily Pattern of Energy Metabolism in Adult Offspring. PLoS One. 7 (6): e38795. 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038795

104. *Korkmaz A., Reiter R.J.* Epigenetic Regulation: A New Research Area for Melatonin. J. Pineal Res. 44 (1): 41–44. 2008. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00509.x

105. *Korkmaz A., Rosales-Corral S., Reiter R.J.* Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. Gene. 503 (1): 1–11. 2012. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.040

106. *Sharma R., Ottenhof T., Rzeczkowska P.A., Niles L.P.* Epigenetic Targets for Melatonin: Induction of Histone H3 Hyperacetylation and Gene Expression in C17.2 Neural Stem Cells. J. Pineal Res. 45 (3): 277–84. 2008. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00587.x

107. *Galano A., Tan D.X., Reiter R.J.* Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. Molecules. 23 (3): 530. 2018. https://doi.org/10.3390/molecules23030530

108. *Tain Y-L., Huang L-T., Hsu C-N.* Developntal Programming of Adult Disease: Reprogramming by Melatonin? Int. J. Mol. Sci. 18 (2): 426–437. 2017. https://doi.org/10/3390/ijms18020426

109. *Cisternas C.D., Compagnucci M.V., Conti N.R., Ponce R.H., Vermouth N.T.* Protective effect of maternal prenatal melatonin administration on rat pups born to mothers submitted to constant light during gestation. Braz. J.

Med. Biol. Res. 43 (9): 874–882. 2010.
https://doi.org/10.1590/s0100-879x2010007500083

110. *Perez-Gonzalez A., Castaneda-Arriaga R., Alvarez-Idaboy J.R., Reiter R.J., Galano A.* Melatonin and its metabolites as chemical agents capable of directly repairing oxidized DNA. J. Pineal Res. 66 (2): e12539. 2019.
https://doi.org/10.1111/jpi.12539

111. *Ireland K.E., Maloyan A., Myatt L.* Melatonin Improves Mitochondrial Respiration in Syncytiotrophoblasts From Placentas of Obese Women. Reprod. Sci. 25 (1): 120–130. 2018.
https://doi.org/101177/1933719117704908

112. *Chen Y-C., Sheen J.M., Tiao M.M., Tain Y.L., Huang L.T.* Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. Int. J. Mol. Sci. 14 (3): 5380–5401. 2013.
https://doi.org/10.3390/ijms14035380

113. *Lopez A., Garcia J.A., Escames G., Venegas C., Ortiz F., Lopez L.C., Acuna-Castroviejo D.* Melatonin Protects the Mitochondria From Oxidative Damage Reducing Oxygen Consumption, Membrane Potential, and Superoxide Anion Production. J. Pineal Res. 46 (2): 188–198. 2009.
https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00647.x

114. *Xu D-X., Wang H., Ning H., Zhao L., Chen Y-H.* Maternally administered melatonin differentially regulates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in maternal serum, amniotic fluid, fetal liver, and fetal brain. J. Pineal Res. 43 (1): 74–79. 2007.
https://doi.org/10.1111.j.1600-079X.2007.004445.x

115. *Carloni C., Favrais G., Saliba E., Albertini M.C., Chalon C., Longini M., Gressens P., Buonocore G., Balduini W.* Melatonin modulates neonatal brain inflammation through endoplasmic reticulum stress, autophagy, and miR-34a/silent information regulator 1 pathway. J. Pineal Res. 61 (3): 370–380. 2016.
https://doi.org/10.1111/jpi.12354

116. *Olivier P., Fontaine R4.H., Loron G., Steenwinckel J.V., Biran V., Massonneau V., Kaindl A., Dalous J., Charriaut-Marlangue C., Aigrot M-S., Pansiot J., Verney C., Gressens P., Baud O.* Melatonin Promotes Oligodendroglial Maturation of Injured White Matter in Neonatal Rats. PLoS ONE. 4 (9): e7128. 2009.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007128

117. *Welin A-K., Svedin P., Lapatto R., Sultan B., Hagberg H., Gressens P., Kjellmer I., Mallard C.* Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the midgest.ation fetal sheep following umbilical cord occlusion. Pediatr. Res. 61 (2): 153–158. 2007.
https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000252546

118. *Yawno T., Castillo-Melendez M., Jenkin G., Wallace E.M., Walker D.W., Miller S.L.* Mechanisms of Melatonin-Induced Protection in the Brain of Late Gestation Fetal Sheep in Response to Hypoxia. Dev. Neurosci. 34 (6): 543–551. 2012.
https://doi.org/10.1159/000346323

119. *Miller S.L, Yawno T., Alers N.O., Castillo-Melendez M., Supramaniam V.G., VanZyl N., Sabaretnam T., Loose J.M., Drummond G.R., Walker D.W., Jenkin G., Wallace E.M.* Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction. J. Pineal Res. 56 (3): 283–294. 2014.
https://doi.org/10.1111/jpi.12121

120. *Kaur C., Sivakumar Y., Zhang Y., Ling E.A.* Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. Glia. 54 (8): 826–839. 2006.
https://doi.org/10.1002/glia.20420

121. *Sivakumar J., Lu J., Ling E.A., Kaur C.* Vascular endothelial growth factor and nitric oxide production in response to hypoxia in the choroid plexus in neonatal brain. Brain Pathoogy. 18 (1): 71–85. 2008.
https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00104.x

122. *Kaur C., Sivakumar Y., Lu J., Tang F.R., Ling E.A.* Melatonin attenuates hypoxia-induced ultrastructural changes and increased vascular permeability in the developing hippocampus. Brain Pathology. 18 (4): 533–547. 2008.
https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00156.x

123. *El-Sokkary G.H., Cuzzocrea S., Reiter R.J.* Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver: beneficial role of melatonin. Toxicology. 239 (1–2): 60–67. 2007.
https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.06.092

124. *Liu S., Guo Y., Yuan Q., Pan Y., Wang L., Liu Q., Wang F., Wang J., Hao A.* Melatonin prevents neural tube defects in the offspring of diabetic pregnancy. J. Pineal Res. 59 (4): 508–517. 2015.
https://doi.org/10.1111/jpi.12282

125. *Lemley C.O., Vonnahme R.A.* Alterations in uteroplacental hemodynamics during melatonin supplementation in sheep and cattle. J. Anim. Sci. 95 (5): 2211–2221. 2017.
https://doi.org/10.2527/jas.2016.1151

126. *Sales F., Peralta O.A., Narbona E., McCoard S., Gonzalez-Bulnes A., Parraquez V.H.* Rapid Communication: Maternal melatonin implants improve fetal oxygen supply and body weight at term in sheep. J. Anim. Sci. 97 (2): 839–845. 2019.
https://doi.org/10.1093/jas/sky443

127. *Tare M., Parkington H.C., Wallace E.M., Sutherland A.E., Lim R., Yawno T., Coleman H.A., Jenkin G., Miller S.L.* Maternal melatonin administration mitigates coronary stiffness and endothelial dysfunction, and improves heart resilience to insult in growth restricted lambs. J. Physiol. 592 (12): 2695–2709. 2014.
https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.270934

128. *Nawathe A., David A.L.* Prophylaxis and treatment of foetal growth restriction. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 49: 66–78. 2018.
https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.02.007

129. *Tan D.X., Manchester L.C., Qin L., Reiter R.J.* Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. Int. J. Mol. Sci. 17 (12): 2124. 2016.
https://doi.org/10.3390/ijms17122124

130. *Welin A.K., Svedin P., Lapatto R., Sultan B., Hagberg H., Gressens P., Kjellmer I., Mallard C.* Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion. Pediatr. Res. 61 (2): 153–158. 2007.
https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000252546

131. *Parada E., Buendia I., Leon R., Negredo P., Romero A., Cuadrado A. Lopez M.G., Egea J.* Neuroprotective effect of melatonin against ischemia is partially mediated by al-

pha-7 nicotinic receptor modulation and HO-1 overexpression. J. Pineal Res. 56 (2): 204–212. 2014. https://doi.org/10.1111/jpi.12113

132. *Juan W-S., Huang S.Y., Chang C.C., Hung Y.C., Lin Y.W., Chen T.Y., Lee A.H., Lee A.C., Wu T.S., Lee E.J.* Melatonin improves neuroplasticity by upregulating growth-associated protein-43 (GAP-43) and NMDAR postsynaptic dencity-95 (PSD-95) proteins in cultured neurons exposed to glutamate excitotoxicity and in rats subjected to transient focal cerebral ischemia even during a long-term recovery period. J. Pineal Res. 56 (2): 213–223. 2014. https://doi.org/10.1111/jpi.12114
133. *Wilkinson D., Shepherd E., Wallace E.M.* Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. Cochrane Database Syst. Rev. 3 (3): CDO10527. 2016. https://doi.org/10.1002/14651858.CDO10527.pub2
134. *Marseglia L., Manti S., D'Angelo G., Gitto E., Barberi I.* Melatonin for the newborn. J. Pediatr. Neonat. Individ. Med. 3 (2): e030232. 2014. https://doi.org/10.7363/030232
135. *Aversa S., Pellegrino S., Barberi I., Reiter R.J, Gitto E.* Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. J. Matern. Fetal. Neonatal. Med . 25 (3): 207–21. 2012. https://doi.org/10.3109/14767058.2011.573827
136. *Tarocco A., Caroccia N., Morciano G., Wieckowski M.R., Ancora G., Garani G., Pinton P.* Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. Cell Death Dis. 10 (4): 317. 2019. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7
137. *Юрова М.Н., Тындык М.Л., Попович И.Г., Голубев А.Г., Анисимов В.Н.* Гендерная специфичность влияния неонатального введения мелатонина на продолжительность жизни и ассоциированную с возрастом патологию у мышей линии 129/SV. Успехи геронтол. 32 (1–2): 66–75. 2019. [*Yurova M.N., Tyndyk M.L., Popovich I.G., Golubev A.G., Anisimov V.N.* Gender-specific effects of neonatal administration of melatonin on lifespan and age-associated pathology in 129/SV mice. Adv. geront. 32 (1–2): 66–75. 2019. (in Russ)].

THE ROLE OF MELATONIN IN PRENATAL ONTOGENESIS

I. I. Evsyukova

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia

e-mail: eevs@yandex.ru

The review summarizes current ideas on the role of melatonin in prenatal ontogenesis. We report the results of experimental and clinical studies that reveal the mechanisms of the melatonin involvement in the formation and development of the mother-placenta-fetus functional system. A key role of maternal melatonin and its circadian rhythmicity in the implementation of the genetic program of fetal morpho-functional development is considered, as well as the mechanisms that protect this program from injury caused by oxidative stress and inflammation during pregnancy complications. Melatonin controls DNA methylation and histone modification and thereby prevents changes in expression of the genes directly related to programming of offspring diseases. The presented material substantiates the prospects for the use of melatonin in clinical obstetrics for the prevention and treatment of perinatal fetal pathology.

Keywords: melatonin, placenta, fetus, circadian system, brain, programming

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 44–52

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦЕРКАЛЬНЫХ ОРГАНОВ СВЕРЧКОВ

© 2021 г. А. М. Луничкин[1,*], М. И. Жуковская[1]

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

*e-mail: BolverkDC@mail.ru

Поступила в редакцию 19.08.2020 г.
После доработки 25.09.2020 г.
Принята к публикации 26.09.2020 г.

Проведено сравнительное исследование вклада церков в запуск двигательных ответов на звук у имаго сверчка *Phaeophelacris bredoides,* лишившегося в ходе эволюции тимпанального органа, и личинок последнего возраста сверчка *Gryllus bimaculatus*, с неполностью сформированным тимпанальным органом. Выполнено морфометрическое исследование расположенных на церках нитевидных сенсилл у обоих видов. На одном церке У *Ph. bredoides* преобладают сенсиллы с волосками от 800 до 1850 мкм, их общее число составляет 1110 ± 16. У личинок *G. bimaculatus* число на одном церке 845 ± 27 нитевидных сенсилл, из них больше всего коротких, с волосками менее 200 мкм. Частотный диапазон сигналов, воспринимаемых церкальным органом, инициирующих двигательный ответ имаго *Ph. Bredoides,* смещается в сторону высоких частот, тогда как у личинок *G. bimaculatus* – расширяется при увеличении интенсивности звука. Полученные данные свидетельствуют о том, что при запуске моторного ответа работа церкального органа имаго *Ph. bredoides* взаимодополняется работой других механосенсорных органов. Ответы сенсилл церкального органа личинок *G. bimaculatus* необходимы для моторного ответа и не компенсируются другими органами при физиологических интенсивностях звука.

Ключевые слова: эволюция, онтогенез, сенсорные системы, биоакустика, насекомые, сверчки

DOI: 10.31857/S004445292101006X

ВВЕДЕНИЕ

Дистантная механосенсорная чувствительность формирует поведение насекомых в онтогенезе, обеспечивая внутри- и межвидовую коммуникацию, ориентацию в пространстве. Представители надсемейства Сверчковые (*Grylloidea*) – классические объекты изучения дистантной механорецепции. Они обладают развитой системой генерации и детекции механосенсорных стимулов, простым и четко выраженным набором поведенческих реакций, неприхотливы в содержании [1–3].

Основные органы дистантной механорецепции сверчковых: тимпанальный [4, 5], церкальный [6, 7] и подколенный [8, 9]. Эти органы специализируются на разных типах сигналов и служат для решения различных задач. Тимпанальный орган воспринимает звуковое давление, организуя половое и агрессивное поведение [10, 11]. Церкальный – смещение воздушных потоков, обеспечивая запуск реакции бегства в ответ на появление хищника [7, 12]. Подколенный – вибрации субстрата, участвуя во внутривидовой коммуникации [13, 14]. Все три органа могут воспринимать звук, но их частотные диапазоны значительно различаются [15–18]. Механические колебания в диапазоне от 1 до 50 кГц воспринимаются тимпанальным органом [11, 17, 19], 0.2–2 кГц – подколенным [20, 21] и 0.01–1 кГц – церкальным [7, 16]. Расположенный в педицелуме антенн Джонстонов орган у сверчковых практически не исследован, однако, поскольку он реагирует на движения флагеллума антенны, его роль в детекции колебаний звуковых частот не может быть значительной у насекомых с длинными жгутиковидными антеннами.

Показано, что органы механорецепции сверчковых работают не независимо, а дополняют друг друга, организуя двигательное поведение [17, 22]. Характер поведенческой реакции, определяемой одним органом, может изменяться в зависимости от информации, поступающей с другого сенсорного входа. Например, пороги реакции убегания в ответ на воспринимаемый церкальным органом толчок воздуха и направление, в котором она реа-

лизуется, модифицируются звуковым стимулом [12, 23].

Тимпанальный орган сверчковых окончательно формируется и начинает функционировать только после линьки на взрослую стадию – имаго. У личинок последнего возраста в голени передней ноги уже присутствуют полностью сформированные сенсорные элементы органа – хордотональные сенсиллы, однако, отсутствуют тимпанальные мембраны, проводящие звуковые колебания в систему трахей, на которых расположены сенсиллы [24–26].

Представители рода *Phaeophilacris* (*Grylloidea: Phalangopsidae*), например сверчок *Ph. bredoides,* лишены характерных для сверчковых акустического призывного сигнала и тимпанальных органов [27–29]. Внутривидовая коммуникация обеспечивается специализированной механосенсорной сигнализацией, опосредованной динамикой воздушных потоков и вибрацией субстрата [28, 30].

Нитевидные сенсиллы церкального органа способны детектировать низкочастотный звук: их длинный кутикулярный волосок, отклоняясь под действием механического стимула, возбуждает сенсорный нейрон [31, 32]. От длинны волоска зависит частота стимула, которую может воспринимать сенсилла: более короткие сенсиллы воспринимают более высокие частоты. Наилучшая чувствительность к звуку лежит в области 0.1–0.5 кГц [7, 16, 18, 33], однако, в ряде работ показано, что церкальный орган может воспринимать более высокочастотные стимулы [16, 34]. При интенсивности сигнала 90 дБ сенсиллы с длинными волосками (1500–1600 мкм) могут воспринимать частоты от 0.4–0.5 кГц, со средними (500–600 мкм) – до 0.8–0.9 кГц, с короткими (150–200 мкм)б до 2 кГц [34].

Ранее было показано, что имаго *Ph. bredoides* и личинки *G. bimaculatus,* несмотря на отсутствие действующих тимпанальных органов, могут воспринимать звуковые стимулы и генерировать в ответ на них двигательные реакции, а также высказано предположение о работе органов дистантной механорецепции двух видов в составе пластичного комплекса органов [35, 36]. Однако вклад церкального органа в обеспечение моторного ответа на звук не был определен экспериментально.

Таким образом, целью настоящей работы было изучение сенсорного вклада церкальных органов имаго *Ph. bredoides* и личинок *G. bimaculatus* в формирование моторного ответа насекомого на звуковые стимулы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе были использованы взрослые особи сверчка *Phaeophilacris bredoides* Kaltenbach, 1986, возрастом от 14 до 35 суток после линьки на стадию имаго и личинки *Gryllus bimaculatus* Deg, 1773, возрастом от вторых суток после линьки на последний (шестой) личиночный возраст, содержавшиеся в лабораторной культуре при температуре 26°C, относительной влажности воздуха 60% и фоторежиме 12 : 12 (свет : темнота) [37].

Сканирующая электронная микроскопия. Сверчков наркотизировали CO_2, затем отрезали церки и подготавливали их для сканирующей электронной микроскопии. Было использовано по 2 церка самца и 2 церка самки имаго *Ph. bredoides* и личинок *G. bimaculatus*. Препараты *Ph. bredoides* изучали при помощи сканирующего электронного микроскопа Zeiss Evo-40 (напыление образцов золотом проводилось техперсоналом РГПУ им. А.И. Герцена), *G. bimaculatus* – микроскопа FEI – Quanta 250 (напыление образцов платиной проводилось техперсоналом ЗИН РАН). Размеры нитевидных сенсилл определяли в программе PhotoM 1.31. Число нитевидных сенсилл, размеры волоска и чаши определяли как среднее со стандартной ошибкой.

Двигательные ответы на стимуляцию звуком. Частотно-пороговые диапазоны, в которых обнаруживаются двигательные ответы имаго *Ph. bredoides* и личинок *G. bimaculatus*, на звук определяли этологическим методом регистрации позы закрепленного животного.

В качестве стимулов использовали тоновые звуковые сигналы 0.1–10.0 кГц, длительностью 1 с и фронтами нарастания и убывания амплитуды по 50 мс. Стимулы генерировались в программе Adobe Audition 3.0 и выводились через динамический мониторный громкоговоритель M-AUDIO Studiophile DX4 (частотный диапазон работы 0.07–20 кГц). Уровень звука измеряли, как описано ранее [35, 36]. Были изучены двигательные ответы при интенсивностях звуковых стимулов: 70, 80, 90, 100 и 110 дБ УЗД.

Экспериментальная установка представляла собой звукозаглушенную, темную анэхоидную камеру объемом 349 000 см^3 (коэффициент звукопоглощения (αW) = 0.65; реверберационный коэффициент звукопоглощения (αs) – 0.1–0.2 кГц = 0.13; 0.3–0.4 кГц = 0.35; 0.5–0.7 кГц = 6.9; >0.8 кГц = 0.9). В ходе эксперимента в ней поддерживалась температура 26°C. Животное подвешивали при помощи держателя, опора для конечностей отсутствовала. Оба модельных объекта не способны к полету и такое закрепление животного не вызывало двигательные реакции без предъявления дополнительных стимулов. Источник сигнала располагался сзади от сверчка, на расстоянии 15 см от церкального органа. Ответные реакции регистрировали при помощи помещенной сбоку от животного инфракрас-

ной видеокамеры Genius e-Face 2025 и программы CrazyTalk CamSuite PRO.

Стимулы предъявляли последовательно от низких частот к высоким с шагом 0.1 кГц. Звуки каждой тестируемой частоты подавали животному по 5 раз с интервалом 10 с. Между предъявлением разных по интенсивности и частоте стимулов проходило 60 с. Двигательные ответы представляли собой резкие “вздрагивания” животного, сопровождающиеся движениями конечностей и антенн, сходные у обоих видов. Медленные ритмические сокращения брюшка, которые периодически наблюдали при отсутствии сигнала, двигательным ответом на звук не считали.

Инактивацию церкального органа проводили методом нанесения на него глицерина [38–42].

Тестировали 10 особей (5 самцов и 5 самок) *Ph. bredoides* с интактными церками, после чего их помещали обратно в одиночный садок и спустя 5 дней этих же особей тестировали после инактивации церкального органа. Длительное нахождение без опоры личинки *G. bimaculatus* приводило к исчезновению любых двигательных реакций. Поэтому для тестирования интактных животных и животных с инактивированным церкальным органом использовали разных особей. Тестировали по 10 животных (5 самцов и 5 самок) в каждом опыте. Разные интенсивностих сигналов тестировали на разных животных. Всего использовано 50 (25 самцов и 25 самок) особей *Ph. bredoides* и 100 (50 самок и 50 самцов) особей *G. bimaculatus*.

Уровень двигательной активности каждого животного определяли как число ответов на 5 последовательных предъявлений стимула. Для выборки из 10 животных рассчитывали медиану этой величины. Вклад церкального органа вычисляли как разницу уровней двигательной активности животных с интактными и инактивированными церками.

Обработка данных. Первичную обработку результатов, построение графиков и гистограмм выполняли в программе MS Excel 14 (©Microsoft, 2010). Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Колмогорова–Смирнова. Данные по уровню двигательной активности и вкладу церкального органа в запуск движения сглаживали методом скользящего среднего по трем точкам. Сравнение выборок интактных животных и животных с инактивированным церкальным аппаратом для имаго *Ph. bredoides* проводили по W-критерию Вилкоксона, для личинок *G. bimaculatus* по U-критерию Манна–Уитни. Различия между самцами и самками обоих видов оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни.

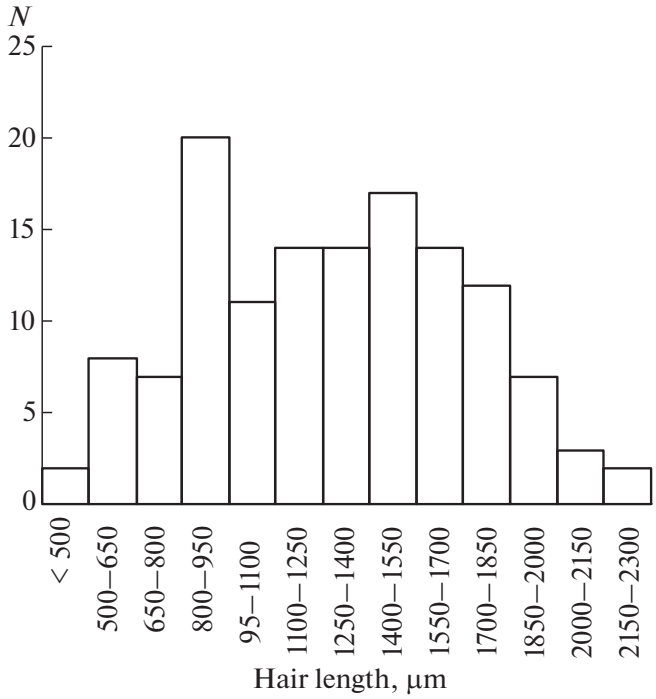

Рис. 1. Распределение нитевидных сенсилл имаго *Ph. bredoide*s по длине волоска. По оси абсцисс: длина волосков нитевидных сенсилл, μm. По оси ординат: *N* – число сенсилл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрия нитевидных сенсилл. Нитевидные сенсиллы *Ph. bredoides* обладают всеми характерными для этого типа сенсилл элементами внешнего строения – длинным кутикулярным волоском, окружающей его кольцевидной кутикулярной чашей и сочленовной мембраной. Их общее число составляет 1110 ± 16 (n = 4). Нитевидные сенсиллы обнаруживаются на всем церке, но большинство располагается у его основания. Минимальный диаметр чаши 12 мкм, максимальный – 40 мкм (23 ± ± 0.4 мкм, n = 290). Длина волосков колеблется в пределах от 450 до 2200 мкм (n = 130). Преобладают сенсиллы с волосками от 800 до 1850 мкм. При переходе от основания церка к его вершине увеличивается доля более коротких волосков. Распределение длин волосков нитевидных сенсилл по длине соответствует нормальному (рис. 1).

В среднем, число нитевидных сенсилл на одном церке личинки последнего возраста *G. bimaculatus* составляет 845 ± 27 (n = 4). Размеры волосков нитевидных сенсилл варьируют от 20 до 1310 мкм (n = 205), наблюдается тенденция их увеличения в направлении от вершины церка к его основанию. Размеры чаш от 9 до 83 мкм (n = 166). Распределение длин волосков показало, что преобладают сенсиллы с волосками менее 200 мкм. Наблюдается

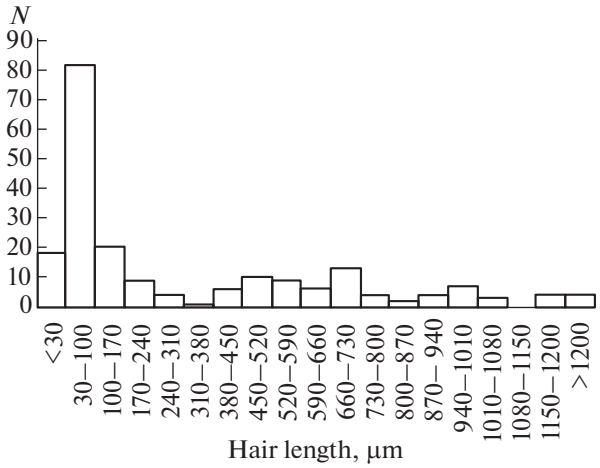

Рис. 2. Распределение нитевидных сенсилл личинок последнего возраста *G. bimaculatus* по длине волоска. Обозначения как на рис. 1.

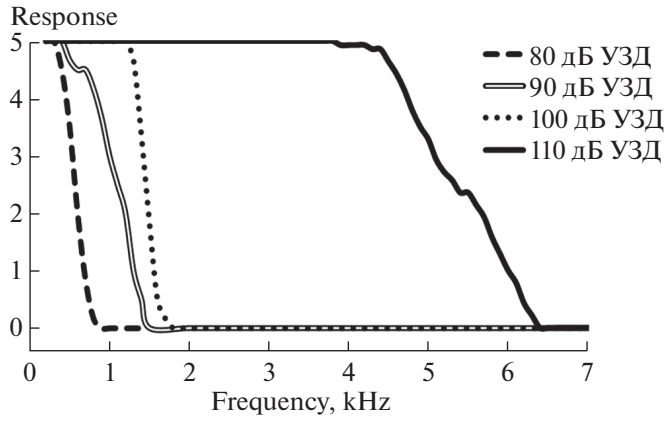

Рис. 3. Зависимость вызванных двигательных реакций имаго *Ph. bredoides* ($n = 10$) от частоты звукового стимула разной интенсивности. По оси абсцисс: частота стимула, кГц. По оси ординат: уровень двигательной активности.

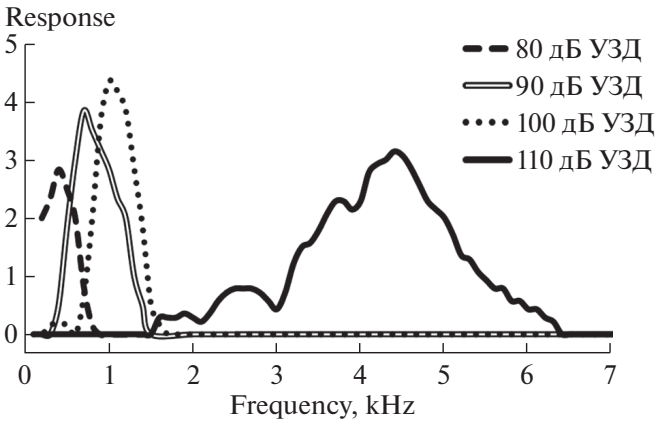

Рис. 4. Вклад церкального органа имаго *Ph. bredoides* ($n = 10$) в запуск двигательного ответа на звук. Обозначения как на рис. 3.

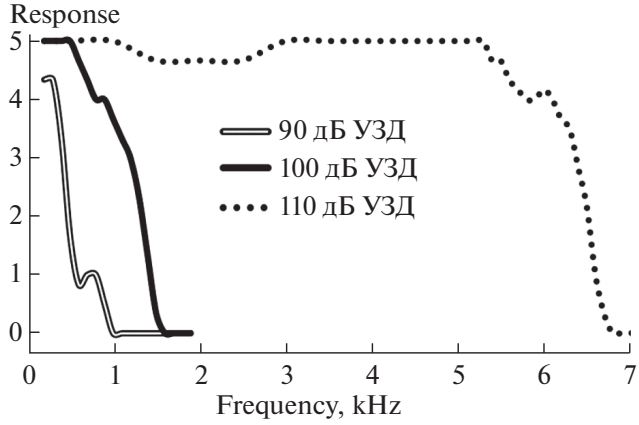

Рис. 5. Зависимость вызванных двигательных реакций личинок *G. bimaculatus* ($n = 10$) от частоты звукового стимула. Обозначения как на рис. 3.

небольшое увеличение числа волосков в промежутке от 380 до 730 мкм (рис. 2).

Вклад церкального органа в запуск двигательной реакции. Двигательные ответы как имаго *Ph. bredoides*, так и личинок *G. bimaculatus* не имели достоверных отличий между полами ($p > 0.05$, U-критерий Манна–Уитни), поэтому для дальнейших подсчетов данные полученные для самцов и самок объединяли.

У имаго *Ph. bredoides* двигательных ответов на стимулы интенсивностью 70 дБ УЗД обнаружено не было. Начиная с 80 дБ УЗД в низкочастотной области, при всех интенсивностях стимула наблюдался уровень двигательной активности, равный 5. С повышением частоты звука величина двигательной активности снижается до полного исчезновения. Диапазон, в котором возникали ответы, расширялся с увеличением интенсивности звука в направлении более высоких частот (рис. 3).

После инактивации церкального органа двигательные ответы имаго *Ph. bredoides* в высокочастотной области снижаются ($p < 0.05$, W-критерий Вилкоксона), а в низкочастотной области сохраняются. При интенсивности стимула 110 дБ УЗД ответы наблюдались во всем диапазоне, однако их уровень снижался, начиная с 3.3 кГц. Разница в ответах сверчков с интактными и инактивированными церками, отражающая вклад церкального органа в запуск двигательного ответа имаго *Ph. bredoides*, выглядит в виде пиков с максимумами на 0.4 кГц

при 80 дБ УЗД, 0.9 кГц при 90 дБ УЗД, 1 кГц при 100 дБ УЗД, и порядка 4.5 кГц при 110 дБ УЗД (рис. 4).

У личинок *G. bimaculatus,* в отличии от имаго *Ph. bredoides*, двигательных ответов на стимулы интенсивностью менее 90 дБ УЗД не было. Как и у *Ph. bredoides*, с повышением интенсивности стимула диапазон, в котором регистрируются ответы, расширяется до 0.8 кГц при 90 дБ УЗД, 1.4 кГц при 100 дБ УЗД, 6.6 кГц при 110 дБ УЗД. Наблюдается сходная с *Ph. bredoides* динамика двигательной активности: на низких частотах высокий уровень ответов, с повышением частоты их число снижается вплоть до полного исчезновения (рис. 5).

После инактивации церкального органа у личинок *G. bimaculatus* обнаруживается статистически достоверное падение ответов вплоть до полного исчезновения на стимулы интенсивностью 90 и 100 дБ УЗД во всем диапазоне частот, запускающих движение ($p > 0.05$, U-критерий Манна–Уитни). Инактивация церкального органа практически не меняет величину двигательных ответов личинок *G. bimaculatus* при интенсивности стимула 110 дБ УЗД ($p < 0.05$, U-критерий Манна–Уитни). Вклад церкального органа в запуск двигательного ответа личинок последнего возраста *G. bimaculatus* на тоновый сигнал обнаруживается в области до 0.8 кГц при 90 дБ УЗД и расширяется до 1.4 кГц при 100 дБ УЗД. При интенсивности 110 дБ УЗД наличие церкального органа не является необходимым для запуска движения (рис. 6).

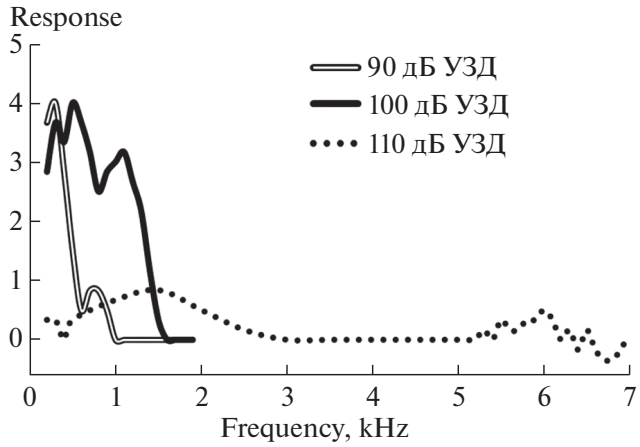

Рис. 6. Вклад церкального органа имаго *G. bimaculatuss* в запуск двигательного ответа на звук ($n = 10$). Обозначения как на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

У *Ph. bredoides* подавляющее большинство нитевидных сенсилл обладает длинными волосками (>800 мкм, $n = 130$), что указывает на приспособление к рецепции низкочастотных механических стимулов. Это согласуется со сложной динамикой воздушных потоков, производимых самцами посредством крыловых махов [30]. Для близкого вида *Ph. spectrum* показано, что его крыловые махи формируют смещения молекул воздуха с частотой 8–12 Гц [43]. Поскольку размер и форма надкрылий обоих видов *Phaeophilacris* сходны, внутривидовые сигналы *Ph. bredoides,* вероятно, обладают близкими параметрами, а многочисленные нитевидные сенсиллы с длинными волосками, детектирующими низкие частоты, являются адаптацией, обеспечивающей восприятие этих сигналов. Минимальный размер волоска, обнаруженный у имаго *Ph. bredoides*, составлял 450 мкм, что может указывать на преимущественное восприятие церкальным органом сигналов частотой до 1 кГц. Данные, полученные с помощью инактивации церков, показывают, что это справедливо для относительно тихих звуков (80 дБ УЗД). Однако при повышении интенсивности звуки, для восприятия которых необходим интактный церкальный орган, сдвигаются в область более высоких частот.

Распределение длин волосков нитевидных сенсилл на церкальном органе личинок *G. bimaculatus* сходно с таковым у взрослых особей [7]. Преобладают сенсиллы с короткими волосками, которых нет у имаго *Ph. bredoides*. Наоборот, у имаго *Ph. bredoides* обнаруживаются крупные волоски, отсутствующие у личинки *G. bimaculatus*. Таким образом, церкальный орган личинок *G. bimaculatus* обладает потенциальной возможностью воспринимать более высокочастотные звуки, в сравнении с имаго *Ph. bredoides*.

Несмотря на то что *Ph. bredoides* лишились тимпанального органа в ходе эволюционного процесса, а у личинок *G. bimaculatus* его работа ограничена отсутствием тимпанальных мембран, оба модельных объекта способны воспринимать звук и отвечать на него двигательной реакцией. Это согласуется с данными, полученными для имаго *G. bimaculatus*, которые в условиях инактивации тимпанального органа сохраняли двигательные ответы на звук частотой до 5 кГц [17]. В детекции звука участвуют другие механосенсорные системы, и, прежде всего, церкальный и подколенный органы, а у личинок *G. bimaculatus* вероятно участие хордотональных сенсилл формирующегося тимпанального органа.

Двигательные ответы не обнаруживают межполовых различий у обоих видов, их характер одинаков для всех изученных интенсивностей, что свидетельствует в пользу их защитной функции. Можно предположить, что у животного, находящегося на твердом субстрате, ответ проявится в форме отрицательного фонотаксиса – в виде бега или прыжка от источника сигнала.

Церкальный орган личинок *G. bimaculatus* почти полностью определяет запуск двигательного ответа на звук при интенсивности 90–100 дБ УЗД. При увеличении интенсивности наблюдается расширение диапазона работы церков. Такая закономерность характерна для работы большинства сенсорных органов животных – с увеличением интенсивности сигнала расширяется диапазон детектируемых стимулов [44]. У имаго *Ph. bredoides* с увеличением интенсивности стимула диапазон работы церкального органа сдвигается в более высокочастотную область, при этом его вклад в запуск двигательного ответа увеличивается. Исходя из морфологических характеристик нитевидных сенсилл, очевидно, что церкальный орган *Ph. bredoides* способен детектировать низкочастотные звуки, однако его чувствительность в этой области перекрывается с другими механосенсорными органами. При увеличении интенсивности стимула вклад этих органов в запуск двигательного ответа растет, маскируя роль церков. Рост вклада подколенного органа с усилением звука, помимо расширения диапазонов ответов рецепторных клеток, может быть связан с увеличением проникновения звуковых колебаний через кутикулярные покровы ноги сверчка.

Особого внимания заслуживает значительный вклад церкальной системы *Ph. bredoides* в ответ на высокочастотные стимулы с максимумом в области 4.5 кГц при максимальной интенсивности стимула – 110 дБ. Поскольку коротких нитевидных сенсилл с близкой резонансной частотой колебаний у этих насекомых нет, логично предположить, что возбуждаются рецепторные клетки более длинных сенсилл. Работа нитевидных сенсилл имеет сложный характер, их чувствительность описывается достаточно широкими кривыми и учитывает направление стимула [28], его скорость и ускорение [7, 16, 46]. Моделирование колебаний волосков под действием потоков воздуха с использованием уравнения Эйлера–Бернулли выявило дополнительные резонансные частоты колебаний, причем следующая, после основной, частота примерно в 6 раз больше, а амплитуда колебаний на порядок меньше [45]. В нашем случае ответы на звуки 3–6 кГц будут давать те же сенсиллы, которые чувствительны к звуку 0.5–1 кГц меньшей интенсивности.

В сравнении с личинками *G. bimaculatus,* имаго *Ph. bredoides* обладают более низкими порогами чувствительности и более широкими частотными диапазонами сигналов, запускающими движение. Увеличение чувствительности подколенного и церкального органа, по-видимому, связано с утратой акустической сигнализации и развитием новых специфических форм внутривидовой коммуникации, использующих вибрацию субстрата и смещение воздушных потоков [28, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Вклад церкального органа в запуск ответного движения на звук имаго *Ph. bredoides* растет с увеличением интенсивности стимула. Его инактивация в определенной степени может быть компенсирована другими механосенсорными органами. Функционирование церкального органа личинок *G. bimaculatus* критично для запуска ответного движения на звук. Его вклад преобладает во всем диапазоне частот, вызывающих ответ, и только при экстремально высокой интенсивности звука возможно участие хордотональных сенсилл формирующегося тимпанального органа.

Источники финансирования. Работа выполнена за счет средств госбюджета, программа АААА-А18-118013090245-6.

Соблюдение этических стандартов. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Вклад авторов. А.М. Луничкин: планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта; М. И. Жуковская: обработка данных, написание и редактирование манускрипта.

Благодарности: авторы выражают благодарность Б.Ф. Грибакину, физфак СПбГУ, за помощь в интерпретации ответов церков пещерного сверчка на высокочастотные стимулы при самой высокой интенсивности звуковой стимуляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alexander R.D.* Aggressiveness, Territoriality, and Sexual Behavior in Field Crickets (*Orthoptera: Gryllidae)*. Behav. 17 (23): 130–223. 1961. https://www.jstor.org/stable/4532972
2. *Ronacher B., Hennig R.M., Clemens J.* Computational principles underlying recognition of acoustic signals in grasshoppers and crickets. J. Comp. Physiol. A. 201 (1): 61–71. 2015. https://doi.org/10.1007/BF00605455
3. *Horch H.W., Mito T., Popadic A., Ohuchi H., Noji S.* The Cricket as a Model Organism. Springer, Tokyo. 376: 1–376. 2017. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56478-2
4. *Hoy R.R., Robert D.* Tympanal hearing in insects. Annu. Rev. Entomol. 41 (1): 433–450. 1996. https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002245
5. *Strauß J., Stumpner A.* Selective forces on origin, adaptation and reduction of tympanal ears in insects. J. Comp.

Physiol. A. 201 (1): 155–169. 2015.
https://doi.org/10.1007/s00359-014-0962-7

6. *Shimozawa T., Kumagai T., Baba Y.* Structural scaling and functional design of the cercal wind-receptor hairs of cricket. J. Comp. Physiol. A. 183 (2): 171–186. 1998.
https://doi.org/10.1007/s003590050245

7. *Magal C., Dangles O., Caparroy P., Casas J.* Hair canopy of cricket sensory system tuned to predator signals. J. Theor. Biol. 241 (3): 459–466. 2006.
https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.12.009

8. *Dambach M., Huber F.* Perception of substrate-vibration in crickets. Symposium Mechanoreception. – VS Verlag für Sozialwissenschaften, Wiesbaden: 263–280. 1974.
https://doi.org/10.1007/978-3-663-01719-6_19

9. *Yack J.E.* The Structure and Function of Auditory Chordotonal Organs in Insects. Microsc. Res. Tech. 63 (4): 315–337. 2004.
https://doi.org/10.1002/jemt.20051

10. *Kleindienst H.U., Wohlers D.W., Larsen O.N.* Tympanal membrane motion is necessary for hearing in crickets. J. Comp. Physiol. A. 151 (4): 397-400. 1983.
https://doi.org/10.1007/BF00605455

11. *Lankheet M.J., Cerkvenik U., Larsen O.N., van Leeuwen J.L.* Frequency tuning and directional sensitivity of tympanal vibrations in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. J. Royal. Soc. Interface. 14 (128): 2017.0035. 2017.
https://doi.org/0.1098/rsif.2017.0035

12. *Fukutomi M., Ogawa H.* Crickets alter wind-elicited escape strategies depending on acoustic context. Scien. Rep. 7 (1): 1–8. 2017.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-15276-x

13. *Loher W., Dambach M.* Reproductive behavior. In Cricket Behavior and Neurobiology, Ithaca, New York: Cornell University Press. (Ed. by F. Huber, T. Moore & W. Loher): 43–82. 1989.

14. *Cokl A., Virant-Doberlet M.* Vibrational communication. In Encyclopedia of insects (eds *VH Resh, RT Carde*), Amsterdam, The Netherlands: Academic Press: 1034–1038. 2009.
https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000200001

15. *Eibl E.* Morphology of the sense organs in the proximal parts of the tibiae of *Gryllus campestris* L. and *Gryllus bimaculatus* deGeer (Insecta, Ensifera). Zoomorphology 89 (3): 185–205. 1978.
https://doi.org/10.1007/BF00993947

16. *Shimozawa T., Kanou M.* Varieties of filiform hairs: range fractionation by sensory afferents and cercal interneurons of a cricket. J. Comp. Physiol. A. 155 (4): 485–493. 1984.
https://doi.org/10.1007/BF00611913

17. *Князев А.Н.* Исследование влияния различных механосенсорных систем сверчка *Gryllus bimaculatus* De Geer на запуск двигательных реакций. Ж. Эвол. Биохим. Физиол. 22 (3): 284–293. 1986. [*Knyazev A.N.* Study of the influence of various mechanosensory systems of the cricket *Gryllus bimaculatus* De Geer on the triggering of motor reactions. J. Evol. Biochem Physiol. 22 (3): 284–293. 1986. (In Russ)].

18. *Rozhkova G.I., Vedenina V.Y., Kamper G.* Frequency-intensity characteristics of cricket cercal interneurons: broadband units. J. Comp. Physiol. A. 184: 161–167. 1999.
https://doi.org/10.1007/s003590050315

19. *Hoy R., Nolen T., Brodfuehrer P.* The neuroethology of acoustic startle and escape in flying insects. J. Exp. Biol. 146 (1): 287–306. 1989.
https://jeb.biologists.org/content/146/1/287.short

20. *Čokl A., Kalmring K., Rössler W.* Physiology of atympanate tibial organs in forelegs and midlegs of the cave-living Ensifera, *Troglophilus neglectus (Rhaphidophoridae, Gryllacridoidea)*. J. Exp. Zool. 273: 376–388. 1995.
https://doi.org/10.1002/jez.1402730503

21. *Peljhan N.S., Strauß J.* The mechanical leg response to vibration stimuli in cave crickets and implications for vibrosensory organ functions. J. Comp. Physiol A. 204 (7): 687–702. 2018.
https://doi.org/10.1007/s00359-018-1271-3

22. *Knyazev A.N.* Interaction of mechanoreceptor systems as a basic for acoustic communication in insect. Sensory Systems and Communication in Arthropods. Adv. in Life Sciences, Birkhauser Verlag Basel: 265–270. 1990.
https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6410-7_45

23. *Fukutomi M., Someya M., Ogawa H.* Auditory modulation of wind-elicited walking behavior in the cricket *Gryllus bimaculatus*. J. Exp. Biol. 218 (24): 3968–3977. 2015.
https://doi.org/10.1242/jeb.128751

24. *Ball E., Young D.* Structure and development of the auditory system in the prothoracic leg of the cricket *Teleogryllus commodus* (Walker) II. Postembryonic development. Cell. Tissue. Res. 147 (3): 313–324. 1974.
https://doi.org/10.1007/BF00307467

25. *Klose M.* Development of leg chordotonal sensory organs in normal and heat shocked embryos of the cricket *Teleogryllus commodus* (Walker). Roux's. Arch. Dev. Biol. 205 (7–8): 344–355. 1996.
https://doi.org/10.1007/BF00377214

26. *Nishino H., Domae M., Takanashi T., Okajima T.* Cricket tympanal organ revisited: morphology, development and possible functions of the adult-specific chitin core beneath the anterior tympanal membrane. Cell Tiss. Res. 377 (2): 193–214. 2019.
https://doi.org/10.1007/s00441-019-03000-2

27. *Desutter-Grandcolas L.* Toward the knowledge of the evolutionary biology of phalangopsid crickets (*Orthoptera: Grylloidea: Phalangopsidae*). Data, questions and evolutionary scenarios. J. Orth. Res. 4: 163–175. 1996.
https://doi.org/10.2307/3503472

28. *Heidelbach J., Dambach M.* Wing-flick signals in the courtship of the african cave cricket, *Phaeophilacris spectrum*. Etology. 103 (10): 827–843. 1997.
https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1997.tb00124.x

29. *Gorochov A.V.* New and Little Known *Phalangopsinae (Orthoptera, Gryllidae)*: 9. The African Genus *Phaeophilacris*. Entomol. Rev. 95 (8): 1112–1124. 2015.
https://doi.org/10.1134/S0013873812010071

30. *Lunichkin A.M., Zhemchuzhnikov M.K., Knyazev A.N.* Basic elements of behavior of the cricket *Phaeophilacris bredoides* Kaltenbach *(Orthoptera, Gryllidae)*. Entomol. Rev. 96 (5): 537–544. 2016. https://doi.org/10.1134/S0013873816050031

31. *Shimozawa T., Murakami J., Kumagai T.* Cricket Wind Receptors: Thermal Noise for the Highest Sensitivity Known. In: Barth F.G., Humphrey J.A.C., Secomb T.W. (eds) Sensors and Sensing in Biology and Engineering. Springer, Vienna: 145–157. 2003. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6025-1_10

32. *Miller J.P., Krueger S., Heys J.J., Gedeon T.* Quantitative characterization of the filiform mechanosensory hair array on the cricket cercus. PloS one. 6 (11). 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027873

33. *Cummins B., Gedeon T., Klapper I., Cortez R.* Interaction between arthropod filiform hairs in a fluid environment. J. Theor. Biol. 247 (2): 266–280. 2007. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.02.003

34. *Князев А.Н., Попов А.В.* Реакция одиночных церкальных механорецепторов сверчка на звуковую и синусоидальную механическую стимуляцию. ДАН СССР. 232: 1211–1214. 1977 [*Knyazev A.N., Popov A.B.* Response of single cercal mechanoreceptors of cricket to sound and sinusoidal mechanical stimulation. DAN USSR 232: 1211–1214. 1977 (In Russ)].

35. *Lunichkin A.M., Knyazev A.N.* Involvement of the mechanosensory complex structures of the cricket *Phaeophilacris bredoides* in triggering of motor responses to sound. J. Evol. Biochem. Physiol. 53 (6): 480–492. 2017. https://doi.org/10.1134/S0022093017060059

36. *Lunichkin A.M., Knyazev A.N.* Involvement of Mechanosensory Complex Structures of the Cricket *Gryllus bimaculatus* Larvae *(Orthoptera, Gryllidae)* in Triggering of Motor Responses to Sound. J. Evol. Biochem. Physiol. 54 (2): 137–148. 2018. https://doi.org/10.1134/S0022093018020072

37. *Lunichkin A.M., Zhemchuzhnikov M.K., Knyazev A.N.* Ontogeny of the cricket *Phaeophilacris bredoides* Kaltenbach (*Orthoptera, Gryllidae*). Entomol. Rev. 93 (1): 19–29. 2013. https://doi.org/10.1134/S0013873813010041

38. *Knyazev A.N., Chudakova I.V.* Effect of allatectomy on phonotaxis in the cricket *Gryllus bimaculatus* De Geer. J. Evol. Biochem. Physiol. 26 (6): 695–701. 1990.

39. *Knyazev A.N., Ivanov V.P., Vorobyeva O.N.* Interaction of distant mechanoreceptor systems under conditions of presentation of non-specific sound signals to normal and allatectomized female crickets *Gryllus bimaculatus*. J. Evol. Biochem. Physiol. 35 (6): 289–294. 1999. https://doi.org/10.1023/A:1017535007233

40. *Knyazev A.N., Ivanov V.P., Vorobyeva O.N.* Interaction of distant mechanoreceptor Systems under conditions of presentation of conspecific sound signals to normal and allatectomized male crickets *Gryllus bimaculatus*. J. Evol. Biochem. Physiol. 36 (6): 760–766. 2000. https://doi.org/10.1023/A:1017535007233

41. *Zhemchuzhnikov M.K., Knyazev A.N.* Development of sexual and protective behavior of female crickets *Gryllus argentinus* Sauss. at the prereproductive and reproductive periods of imaginal ontogenesis. J. Evol. Biochem. Physiol. 47 (6): 565–570. 2011. https://doi.org/10.1134/S0022093011060081

42. *Луничкин А.М., Баулин Ю.А., Жуковская М.И., Князев А.Н.* Оценка метода инактивации церкальных сенсилл сверчка с помощью электроцеркограммы. Сенсор. Сист. 33 (4): 351–354. 2019. [*Lunichkin A.M., Baulin Y.A., Zhukovskaya M.I., Knyazev A.N.* Evaluation of the method of inactivation of cricket cercal sensilla using electrocercogram. Sens. Sys. 33 (4): 351–354. 2019 (In Russ)].

43. *Heidelbach J., Dambach M., Böhm H.* Processing Wing flick-generated air-vortex signals in the african cave cricket, *Phaeophilacris spectrum*. Naturwissenschaften. 78 (6): 277–278. 1991.

44. *Альтман Я.А., Вартанян И.А., Горлинский И.А., Бигдай Е.В., Самойлов В.О., Ноздрачев А.Д., Алексеев Н.П.* Физиология сенсорных систем и высшей нервной деятельности. Т. 1. Физиология сенсорных систем. Издательский Центр “Академия”. 2009 [*Altman Y.A., Vartanyan I.A., Gorlinskiy I.A., Bigday E.V., Samoylov V.O., Nosdrachev A.D., Alekseev N.P.* Physiology of sensory systems and higher nervous activity. T. 1. Physiology of sensory systems. “Academy”. 2009. (In Russ)].

45. *Slinker K., Kondash C., Dickinson B.T., Baur J.W.* High-Bandwidth and Sensitive Air Flow Sensing Based on Resonance Properties of CNT-on-Fiber Hairs. J Carbon Res. 3 (1): 6. 2017. https://doi.org/10.3390/c3010006

46. *Roddey J.C., Jacobs G.A.* Information theoretic analysis of dynamical encoding by filiform mechanoreceptors in the cricket cercal system. J. Neurophysiol. 75 (4): 1365–1376. 1996. https://doi.org/10.1152/jn.1996.75.4.1365

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CERCAL ORGANS IN CRICKETS

A. M. Lunichkin[a,#] and M. I. Zhukovskaya[a]

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

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

The involvement of the cercal organs in triggering motor responses to acoustic stimulation was comparatively investigated in a cricket *Phaeophelacris bredoides* imago, which lost the tympanal organ during evolution, and the last-instar nymph of the cricket *Gryllus bimaculatus* that has a rudimentary tympanal organ. A morphometric analysis of the cercal filiform sensilla in both species revealed that in *Ph. bredoides* a single cercus bears mainly the longer hairs (total number, 1110 ± 16) that vary in their length from 800 to 1850 μm, while in *G. bimaculatus* larvae the filiform sensilla on a single cercus are fewer (total number, 845 ± 27) and predominantly shorter (<200 μm). The frequency range of signals triggering motor responses in *Ph. bredoides* imagoes shifts towards higher frequencies, while in *G. bimaculatus* larvae it expands with the increasing sound intensity. The data obtained indicate that while triggering motor responses the cercal organ in *Ph. bredoides* is functionally complemented by other mechanosensory organs. In *G. bimaculatus*, sensillar responses of the larval cercal organ are required for initiating motor responses but are not compensated by other organs at physiological sound intensities.

Keywords: evolution, ontogeny, sensory systems, bioacoustics, insects, crickets

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 53–62

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РОЛИ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ДИЛАТАЦИИ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ НА АЦЕТИЛХОЛИН У КРЫС WKY И SHR

© 2021 г. О. П. Горшкова

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

e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Поступила в редакцию 27.06.2020 г.
После доработки 10.09.2020 г.
Принята к публикации 28.09.2020 г.

Изучалось изменение роли BK_{Ca}-каналов и NO в опосредованной ацетилхолином (АХ) дилатации пиальных артериальных сосудов крыс при старении в отсутствие и в условиях длительно текущей АГ. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки (×470) проведена сравнительная оценка реакций пиальных артерий на ацетилхолин хлорид (АХ, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады BK_{Ca}-каналов (тетраэтиламмоний хлорид, 2 мМ) и NO (L-NAME, 10^{-3} М) у нормотензивных крыс Wistar-Kyoto (WKY) и спонтанно гипертензивных крыс SHR в возрасте 4 и 20 мес. Об изменении роли BK_{Ca}-каналов и NO в дилатации сосудов судили по изменению числа и степени дилатации артерий в ответ на действие АХ после применения блокаторов, измеряя ширину потока эритроцитов в 3 отдельных группах артерий: мелких (диаметр менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). Установлено, что у крыс WKY старение приводит к подавлению роли BK_{Ca}-каналов в АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов всех диаметров. Аналогичные процессы обнаружены в пиальном сосудистом русле молодых крыс SHR. Изменения роли BK_{Ca}-каналов в дилататорных ответах сосудов у стареющих крыс WKY и молодых крыс SHR во многом сопряжены с нарушением системы синтеза оксида азота и изменением роли NO-опосредованных механизмов в дилатации. Старение у крыс SHR сопровождается усилением вклада NO-зависимого механизма в регуляции АХ-опосредованных дилататорных реакций мелких пиальных артериальных сосудов.

Ключевые слова: вазодилатация, кальций-чувствительные калиевые каналы большой проводимости, гипертония, старение, пиальная артерия

DOI: 10.31857/S0044452921010034

ВВЕДЕНИЕ

Смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы у пожилых людей составляет более 40% [1]. Понимание механизмов, лежащих в основе возрастных изменений сосудистых реакций, открывает перспективы для снижения этого показателя. Частота встречаемости артериальной гипертонии (АГ), являющейся фактором риска развития различного вида цереброваскулярной патологии [2, 3], в группах людей старшего возраста составляет около 60% [4]. В экспериментальных работах, проведенных с использованием спонтанно гипертензивных крыс, и клинических исследованиях показано, что при развитии АГ происходит разрежение микрососудистой сети в ткани головного мозга, ремоделирование сосудистого русла и нарушение регуляции тонуса церебральных сосудов [5, 6]. АГ во многом связана с дисбалансом между вазодилататорными и вазоконстрикторными механизмами. В изучении изменений регуляции сосудистого тонуса, развивающихся при различных формах АГ, большое значение придается исследованию прессорных механизмов. Гораздо меньше внимания уделяется вазодилатации. Выявление возрастных изменений вазодилататорных механизмов сосудов головного мозга может способствовать пониманию процессов, лежащих в основе возникновения осложнений АГ, связанных с локальным сужением или закрытием мелких мозговых сосудов и развитием эпизодов очаговой ишемии. Важнейшими элементами, определяющими состояние сосудистого тонуса, являются ионные каналы, экспрессируемые как в эндотелиальных, так и в сосудистых гладкомышечных клетках (ГМК). Для системы контроля АД большое значение играет вазодилататорный механизм, основанный на активации кальций-чувствительных калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca}). Согласно современным представлениям эти каналы играют ключевую роль в интеграции и передаче генерируемой в эндотелии химической сигнализа-

Таблица 1. Показатели среднего артериального давления у крыс SHR и WKY, мм рт ст.

	WKY		SHR	
	4 мес (n = 14)	20 мес (n = 12)	4 мес (n = 14)	20 мес (n = 14)
Ненаркотизированные крысы	115.5 ± 2.1	107.8 ± 3.6	143.6 ± 2.4	157.1 ± 2.4
Наркотизированные крысы	107.6 ± 1.1	105.9 ± 3.3	122.6 ± 2.4	123.8 ± 2.2

ции к нижележащим ГМК сосудов [7]. Одним из основных вазодилататоров, влияющих на активность BK_{Ca}-каналов, является оксид азота. В сосудах головного мозга NO может активировать BK_{Ca}-каналы либо непосредственно [8], либо через PKG-зависимые механизмы [9, 10]. Также NO может стимулировать чувствительные к рианодину запасы Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме, вызывая дискретные кальциевые токи, активирующие соседние кластеры каналов BK_{Ca} [8]. Изменение активности BK_{Ca}-каналов, в свою очередь, может стимулировать или ограничивать NO-зависимую дилатацию сосудов [11]. Возникновение возрастной эндотелиальной дисфункции (ЭД), лежащей в основе возникновения и развития АГ, часто связывают со снижением продукции и/или биодоступности NO [12]. Но особенности NO-опосредованной вазорелаксации при старении, а также в условиях длительно текущей АГ, и роли кальций-чувствительных K^+ каналов в этих процессах изучены мало.

Целью данной работы было сравнительное изучение изменения роли BK_{Ca}-каналов в NO-опосредованной дилатации мозговых сосудов при старении в отсутствие и в условиях длительно текущей АГ. В качестве модели АГ использовались спонтанно гипертензивные крысы (SHR) как наиболее приемлемая биологическая модель эссенциальной гипертонии у человека, отражающая нарушения механизмов сосудистой регуляции, нормотензивным контролем к которым служат крысы Wistar-Kyoto (WKY) [13]. В задачи исследования входило изучение роли BK_{Ca}-каналов и NO в опосредованной ацетилхолином (АХ) дилатации пиальных артериальных сосудов у крыс WKY и SHR в возрасте 4 и 20 мес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В исследовании использовались самцы нормотензивных крыс WKY (возраст: 4 мес (n = 14, масса 240 ± 35 г) и 20 мес (n = 12, масса 340 ± 20 г)) и спонтанно гипертензивных крыс SHR (возраст: 4 мес (n = 14, масса 245 ± 15 г) и 20 месяцев (n = 14, масса 350 ± 35 г)) из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014 г., и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Перед началом эксперимента у ненаркотизированных животных с помощью прибора для неинвазивного измерения АД (“Систола”, Netrobotics, Россия) на хвосте измерялось среднее АД. При проведении исследования крыс наркотизировали хлоралгидратом (43 мг/100 г массы тела, внутрибрюшинно). На протяжении всего времени эксперимента у наркотизированных крыс среднее АД измеряли инвазивным методом через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разработанной в нашей лаборатории. Данные по измерению АД у крыс WKY и SHR представлены в табл. 1.

Для исследования пиальных сосудов в теменной области черепа животного высверливали отверстие площадью 2 $см^2$, твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли. Визуализацию сосудов (×470) проводили с помощью оригинальной установки, включающей стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер. У каждого животного фиксировали фоновое изображение сосудов в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса (t = 37°C) и реакцию на воздействие. При проведении эксперимента крысы разделялись на 8 отдельных групп. У первых 4 групп (крысы в возрасте 4-х – WKY n = 6; SHR n = 7 и 20 мес – WKY n = 6; SHR n = 8) исследовали реакции сосудов на орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолин хлорида (Sigma, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады BK_{Ca}-каналов раствором тетраэтиламмоний хлорида (ТЕА, “Вектон”, Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). В 4 других группах (крысы в возрасте 4-х -WKY n = 8; SHR n = 7 и

Таблица 2. Реакция пиальных артериальных сосудов на воздействие ацетилхолина, % от общего числа исследованных сосудов в каждой группе, M ± m

Группы крыс	WKY		SHR	
	4 мес (n = 14)	20 мес (n = 12)	4 мес (n = 14)	20 мес (n = 14)
Дилатация	40.2 ± 2.1	25.6 ± 3.5*	42.3 ± 1.8	21.9 ± 2.7$^{\#\#\#}$
Констрикция	40.3 ± 3.6	54.4 ± 1.2*	39.5 ± 1.6	64.9 ± 2.4$^{\#\#\#}$
Отсутствие реакции	23.3 ± 1.8	20.1 ± 2.5	18.1 ± 1.1*	13.2 ± 0.4

Примечание: * – по отношению к соответствующей реакции у молодых крыс WKY; # – по отношению к соответствующей реакции у молодых крыс SHR; $^{*(\#)}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ (U – критерий Манна–Уитни).

20 мес -WKY $n = 6$; SHR $n = 6$) исследовали реакции сосудов на воздействие АХ в отсутствие и на фоне блокады eNOS раствором метилового эфира нитро-L-аргинина (L-NAME, ICN Biomed. Inc, 10^{-3} M). Для проведения блокады поверхность мозга в течение 10 мин предварительно орошали раствором L-NAME, после чего в раствор блокатора добавляли АХ. После регистрации реакции сосудов на воздействие АХ на фоне блокады eNOS, в реакционную среду вводили ТЕА, дополнительно блокируя BK_{Ca}-каналы. Это позволило исследовать реакцию сосудов на воздействие АХ как на фоне блокады eNOS, так и на фоне совместного действия обоих блокаторов. Фоновую реакцию на воздействие АХ анализировали по всему массиву сосудов у 4-месячных (WKY n = 14; SHR n = 14) и по всему массиву сосудов у 18-месячных (WKY n = 12; SHR n = 14) крыс. Проверка по критерию Краскела–Уоллиса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие АХ у крыс одного возраста. Общая продолжительность эксперимента составляла 60–90 мин, после чего животных усыпляли передозировкой раствора хлоралгидрата.

Диаметр измеряли на статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M” (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru), измеряя ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении роли BK_{Ca}-каналов и NO в дилатации сосудов судили по изменению числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокаторов. Изменение количества расширившихся и сузившихся сосудов на воздействие выражалось в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔД оценивали как разность между значениями диаметра после (Д2) и до (Д1) воздействия АХ относительно диаметра сосуда Д1 перед воздействием АХ, %:

$$\Delta Д = (Д2 - Д1)/Д1 * 100.$$

Изменения диаметра в покое не превышали 5.0 ± 0.5%, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

У каждой крысы было измерено от 40 до 60 участков сосудов. Для последующего анализа измеренные сосуды были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие сосуды (диаметром от 9 до 20 мкм), сосуды среднего диаметра (от 20 до 40 мкм) и крупные сосуды (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представляли в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Применяли U-критерий Манна–Уитни (при сравнении 2 групп) и критерий Краскела–Уоллиса (при сравнении более 2 групп). Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что у крыс WKY количество расширенных на воздействие АХ пиальных артериальных сосудов в процессе старения снижается. Орошение поверхности головного мозга раствором АХ у молодых крыс WKY вызывало дилатацию в среднем 36.5 ± 2.7% сосудов (табл. 2).

Преимущественно расширялись артерии средних диаметров (20–40 мкм). В этой группе АХ вызывал расширение 43.5 ± 2.7% артерий. В 2 других группах расширилось в среднем около 30% сосудов (рис. 1). Степень дилатации сосудов снижалась в направлении от мелких к более крупным (критерий Краскела–Уоллиса KW = 12.3, $p < 0.001$, рис. 2). В группе мелких пиальных артериальных сосудов в ответ на воздействие АХ диаметр увеличивался на 26.4 ± 3.5%, в группе крупных артерий – на 13.9 ± ± 2.1% (рис. 2).

Применение ТЕА у молодых крыс WKY уменьшало количество расширившихся на воздействие АХ артерий всех диаметров (рис. 3а). Наибольшее уменьшение отмечалось у сосудов средних диамет-

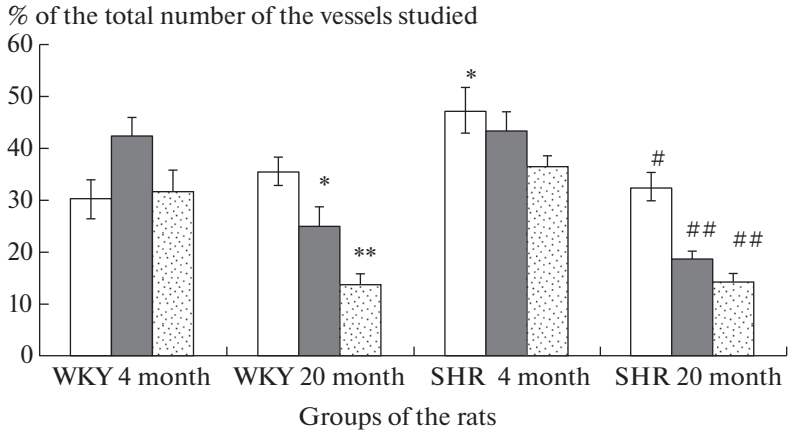

Рис. 1. Дилататорная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ. Белая заливка – мелкие артерии диаметром до 20 мкм; темная заливка – средние артерии диаметром 20-40 мкм; точечная штриховка – крупные артерии диаметром более 40 мкм. * – Различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у молодых крыс WKY; # – различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у молодых крыс SHR; $*^{(\#)}$ $p < 0.05$, $**^{(\#\#)}p < 0.01$ (U – критерий Манна–Уитни).

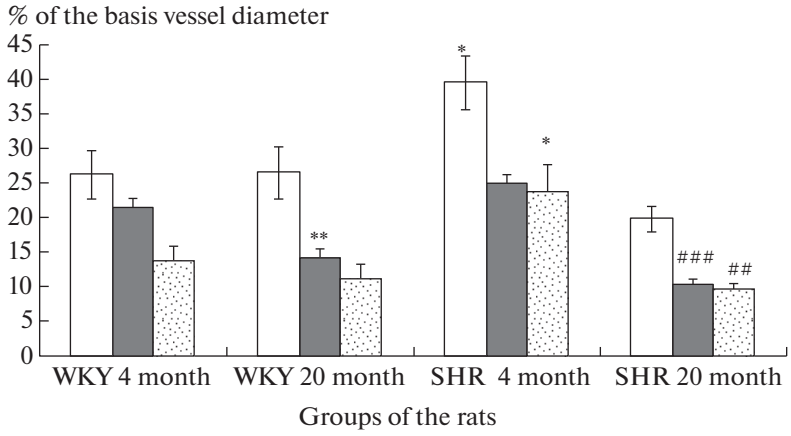

Рис. 2. Амплитуда дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ. *По оси абсцисс* – группы крыс, *по оси ординат* – % от исходного диаметра сосуда. *Белая заливка* – мелкие артериальные сосуды диаметром менее 20 мкм, *серая заливка* – средние артерии диаметром 20–40 мкм, *точечная штриховка* – крупные артерии диаметром более 40 мкм. * – Различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у молодых крыс WKY; # – различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у молодых крыс SHR; $*^{(\#)}$ $p < 0.05$, $**^{(\#\#)}p < 0.01$, $***^{(\#\#\#)}p < 0.001$ (U – критерий Манна–Уитни).

ров (с 43.5 ± 2.7 до 8.9 ± 0.7%). В этой группе артерий также достоверно снижалась и степень дилатации (рис. 4а). Количество крупных и мелких сосудов, расширившихся в ответ на воздействие АХ, на фоне ТЭА уменьшилось соответственно с 31.8 ± 2.2 до 9.5 ± 1.3 и с 30.4 ± 2.8 до 20.3 ± 2.4% без достоверного уменьшения степени реакции (рис. 3а, 4а). Следовательно, механизм АХ-опосредованной вазодилатации, связанный с активацией BK_{ca}-каналов, у молодых крыс WKY преимущественно выражен в группе пиальных артериальных сосудов диаметром 20–40 мкм.

Блокада eNOS у 4-месячных крыс WKY уменьшала количество дилатаций на воздействие АХ во всех 3 группах сосудов без достоверного изменения степени реакции (рис. 3а, 4а). Наибольшее снижение количества расширившихся сосудов наблюдалось в группе крупных артерий (до 7.3 ± 0.6%). Количество дилатированных сосудов средних диаметров уменьшилось примерно в 2 раза; мелких – в среднем на 39.9%, и достоверно не отличалось от значений, полученных при применении блокатора BK_{ca}-каналов (рис. 3а). При совместном применении L-NAME и ТЕА у молодых крыс WKY снижение количества расширившихся на воздействие АХ сосудов средних диаметров соответствовало данной величине при воздействии только одного блокатора eNOS, но было достоверно меньше значе-

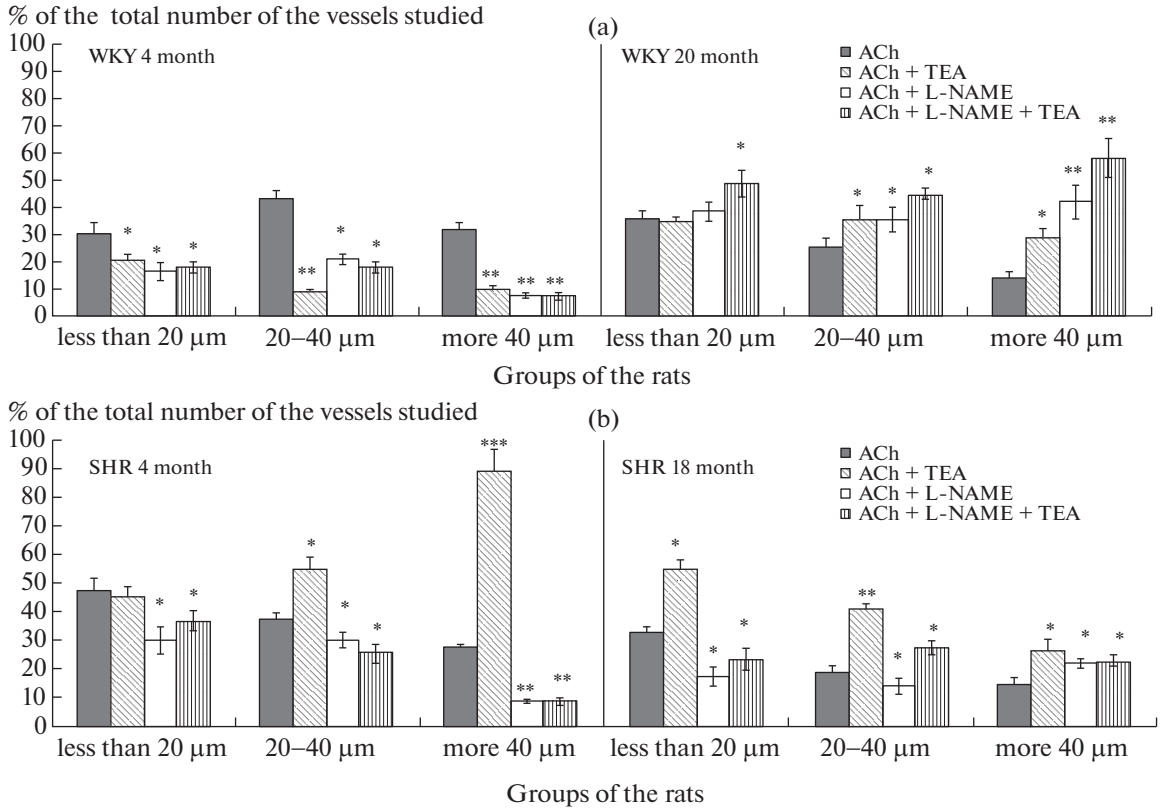

Рис. 3. Изменение числа дилатированных пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ в отсутствие и на фоне применения блокаторов у крыс разного возраста: а – крысы WKY, б – крысы SHR. По оси абсцисс – группы сосудов различных диаметров, по оси ординат – % от общего числа исследованных сосудов. Изменения значимы по сравнению с соответствующими данными при воздействии чистого АХ (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, U-критерий Манна–Уитни).

ний, полученных в случае применения только блокатора BK_{ca}-каналов ($p = 0.01$, $U = 428$, U-критерий Манна–Уитни, рис. 3а). Уменьшение количества и степени дилатации артерий мелких и крупных диаметров при одновременной блокаде eNOS и BK_{ca}-каналов достоверно не отличалась от значений, полученных при применении каждого из блокаторов в отдельности (рис. 3а, 4а). Полученные данные указывают на ведущую роль механизма, связанного с активацией BK_{ca}-каналов, в регуляции АХ-опосредованных дилататорных реакций сосудов средних диаметров у молодых крыс WKY. В группах пиальных сосудов мелких и крупных диаметров оба из исследованных механизмов выражены примерно в равной степени.

У 20-месячных крыс WKY по сравнению с более молодыми животными общее количество расширивших на воздействие АХ сосудов уменьшалось и составляло 25.6 ± 3.5% (табл. 2). Сопоставление реакций сосудов различных диаметров показало, что старение уменьшает количество расширившихся сосудов только в группах артерий средних и крупных диаметров (в среднем на 42.5 и 57.1% соответственно; (рис. 1)). В группе артерий 20–40 мкм также снижается степень дилатации (рис. 2).

Применение ТЭА у нормотензивных крыс в возрасте 20 мес достоверно не изменяло характер дилататорной реакции мелких сосудов, что свидетельствует о подавлении роли BK_{Ca}-каналов в дилататорном ответе этих сосудов на воздействие АХ у стареющих животных. В группах артерий средних и крупных диаметров ТЕА, напротив, достоверно увеличивал количество расширившихся на воздействие АХ сосудов и степень их расширения (рис. 3а, 4а). В литературе имеются сведения о том, что у старых животных по сравнению с молодыми особями открыто больше K^+-каналов [14]. Сверхактивация каналов может уменьшать миоэндотелиальную электрическую проводимость и снижать вазодилататорную реакцию [15, 16], что, вероятно, и является одной из причин обнаруженного нами уменьшения количества расширившихся на воздействие АХ сосудов в группах артерий средних и крупных диаметров. Блокада K^+-каналов (таких как BK_{Ca}, чувствительные к напряжению K^+-каналы и др.) может приводить к деполяризации и восстановлению электрической проводимости до зна-

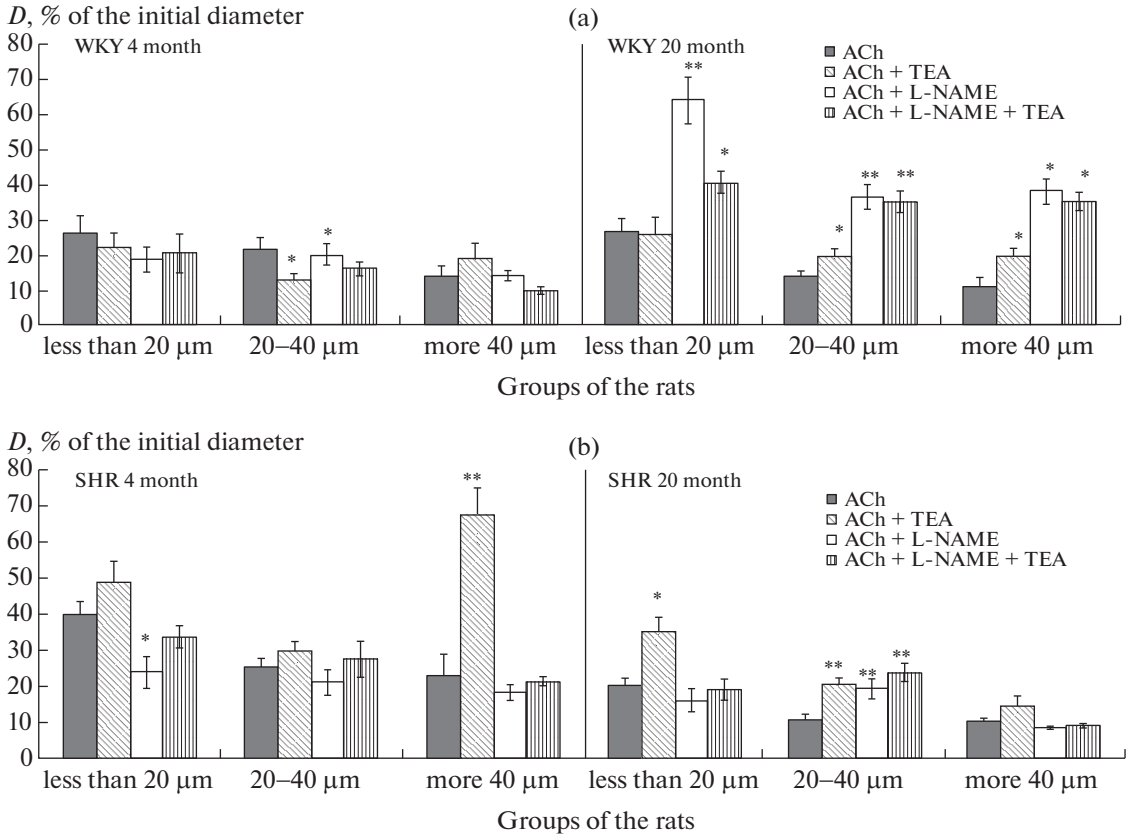

Рис. 4. Изменение диаметра пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ в отсутствие и на фоне применения блокаторов у крыс разного возраста: a – крысы WKY, b – крысы SHR. По оси абсцисс – группы сосудов различных диаметров, по оси ординат – диаметр артерий после воздействия АХ, % относительно их диаметра до воздействия АХ. Изменения значимы по сравнению с соответствующими данными при воздействии чистого АХ (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, U-критерий Манна–Уитни).

чений, не отличающихся от значений, наблюдаемых у молодых особей [14, 15, 17]. В группах сосудов средних и крупных диаметров в ответ на воздействие АХ на фоне применения TEA расширилось в среднем на 35.6 ± 4.5 и 28.6 ± 3.3% соответственно. Это достоверно не отличалось от значений, полученных на сосудах тех же групп у молодых крыс WKY без применения блокаторов (рис. 3а). Следует отметить, что используемый в наших экспериментах TEA не является селективным ингибитором BK_{ca}-каналов и может воздействовать также и на другие группы калиевых каналов. Таким образом, полученные данные могут указывать на изменение активности калиевых каналов у 20-ти месячных крыс WKY, вероятно, лежащее в основе снижения уровня АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов средних и крупных диаметров.

На фоне блокады синтеза NO у крыс WKY в возрасте 20 мес количество расширившихся в ответ на воздействие АХ мелких сосудов достоверно не изменялось. Что свидетельствует о незначительной роли этого механизма сосудистой регуляции в осуществлении дилатации мелких пиальных артериальных сосудов у стареющих нормотензивных крыс. Количество расширившихся артерий средних и крупных диаметров и степень их расширения на фоне блокады eNOS возрастали (рис. 3а, 4а). Развитие ЭД при старении во многом связывают с повышением уровня эндотелиального супероксидного аниона (O_2^-), приводящим к снижению количества NO [18]. В основе возможных механизмов избыточного образования O_2^- могут лежать возрастная аномальная экспрессия и активность синтаз оксида азота [18–21]. Повышение чувствительности к АХ после применения L-NAME может быть связано с подавлением активности eNOS, что приводит к торможению процессов образования супероксид анионов [18, 22], тем самым увеличивая количество и доступность NO. Наибольшее увеличение количества расширившихся сосудов и степени их расширения, в среднем примерно в 3 раза, в наших экспериментах наблюдалось в группе крупных артерий (рис. 3а). У сосудов диаметром 20–40 мкм количество расширившихся сосудов возрастало в среднем на 40%, амплитуда так-

же увеличивалась (рис. 3а, 4а). При этом количество расширившихся средних и крупных сосудов на фоне предварительной блокады NO у 20-месячных крыс WKY соответствовало значениям, полученным у молодых крыс WKY без использования блокаторов. То есть блокада eNOS у 20-месячных крыс WKY в этих группах сосудов, также как и в случае блокады BK_{ca}-каналов, не просто усиливала дилатацию, а восстанавливала ее до уровня, наблюдаемого у молодых животных.

Совместное применение L-NAME и TEA у 20-месячных крыс WKY приводило к достоверно большему увеличению количества расширившихся сосудов средних и крупных диаметров, по сравнению с применением каждого из блокаторов в отдельности (рис. 3а). Следовательно, у крыс WKY в возрасте 20 мес в АХ-опосредованных реакциях этих сосудов в равной степени нарушаются оба исследованных механизма регуляции сосудистого тонуса. Обращает на себя внимание также и то, что на фоне одновременной блокады eNOS и BK_{Ca}-каналов увеличение числа дилатаций отмечалось и у сосудов мелких диаметров. В то время как применение каждого из блокаторов в отдельности в этой группе сосудов достоверно не изменяло количество АХ-опосредованных дилатаций. Полученные данные могут служить подтверждением гипотезы о существовании связи между активностью BK_{Ca}-каналов и эндотелиальными сигнальными путями NO [23].

Сравнение реакций у нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс показало отсутствие достоверных отличий общего количества расширившихся в ответ на воздействие АХ сосудов и степени их расширения у этих животных (табл. 2). Однако наибольшее количество расширившихся сосудов у крыс SHR отмечалось в группе мелких артерий – 47.3 ± 4.3%, что достоверно превышало значения у крыс WKY. В группах артерий средних и крупных диаметров расширилось 37.3 ± 2.1 и 27.6 ± 1.1% сосудов соответственно. Эти показатели не отличались от значений в группах соответствующего диаметра у нормотензивных крыс (рис. 1).

Предварительная блокада BK_{Ca}-каналов у молодых крыс SHR, в отличие от WKY, достоверно не изменяла количество расширившихся на воздействие АХ мелких сосудов (рис. 3b). А в группах артерий средних и крупных диаметров – увеличивала количество дилатаций в среднем на 26.3% и в 3.2 раза соответственно (рис. 3b). Полученные данные указывают на значительное снижение роли BK_{Ca}-каналов в дилатации пиальных артериальных сосудов у молодых спонтанно гипертензивных крыс, в основе которого может лежать наблюдаемое при АГ уменьшение их чувствительности к внутриклеточному местному току Ca^{2+} [24–26]. Повышение чувствительности к АХ после применения блокатора в группах пиальных артерий средних и крупных диаметров, вероятно, связано со способностью TEA, применяемого нами в качестве ингибитора калиевых каналов, увеличивать внутренний ток Ca^{2+} в ГМК клетках сосудов, что может повышать активность BK_{Ca}-каналов и усиливать дилатацию артерий этих групп, обладающих развитой мышечной оболочкой [27, 28].

Блокада eNOS раствором L-NAME у молодых крыс SHR в наших экспериментах снижала количество расширившихся в ответ на воздействие АХ сосудов и амплитуду дилатации во всех группах исследованных сосудов. В группе артерий крупных диаметров количество расширившихся сосудов снизилось на 76.93%, что достоверно не отличалось от показателей у молодых крыс WKY. Изменение степени дилатации в этой группе сосудов также соответствовало значениям у нормотензивных крыс (рис. 3а, 3b; 4а, 4b). Уменьшение количества дилатаций артерий мелких и средних диаметров у молодых крыс SHR по сравнению с WKY того же возраста было менее значительным (на 37.2 и 31.1% соответственно у SHR, по сравнению с 46.1 и 54.1% у WKY) (рис. 3а, 3b). Изменения степени дилатации не отмечалось (рис. 4а, 4b). Таким образом, у 4-месячных крыс SHR по сравнению с крысами WKY того же возраста наблюдалось снижение роли NO в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий мелких и средних диаметров. При совместном применении L-NAME и TEA у молодых крыс SHR снижение количества расширившихся артерий всех групп соответствовало данной величине при воздействии только одного блокатора eNOS (U-критерий Манна–Уитни; рис. 3b). Что может указывать на ведущую роль NO в дилатации пиальных артериальных сосудов всех диаметров у молодых крыс SHR.

Также как и у нормотензивных крыс, у SHR старение уменьшало общее количество расширившихся на воздействие АХ сосудов (с 43.2 ± 3.8% у молодых SHR до 21.9 ± 2.7% у 20-месячных SHR; табл. 2). В отличие от крыс WKY, у которых снижение количества АХ-опосредованных дилатаций было отмечено только в группах пиальных артерий средних и крупных диаметров, у крыс SHR при старении количество расширившихся сосудов снижалось во всех исследованных группах (рис. 1, 2). Количество дилатаций сосудов мелких и средних диаметров уменьшилось на 31.1 и 50.1% соответственно. Снижение количества расширившихся крупных артерий составило 54.1%, что достоверно не отличалось от значений, полученных при старении в этой группе сосудов у нормотензивных крыс (рис. 1).

TEA увеличивал количество расширившихся сосудов у 20-месячных крыс SHR во всех группах. Количество расширившихся мелких сосудов увеличилось на 67.9%, а средних – в 2.2 раза (рис. 3b). Что достоверно превышало значения у более моло-

дых крыс SHR. Увеличение количества расширившихся в ответ на воздействие АХ крупных артерий (в среднем на 80.2%) у 20-месячных крыс SHR по сравнению с молодыми было менее значительным (рис. 3b). Степень дилатации сосудов всех групп также увеличивалась (рис. 4b).

На фоне блокады eNOS у крыс SHR в возрасте 20 мес уменьшение количества АХ-опосредованных расширений сосудов мелких диаметров составило в среднем 46.9% и достоверно превышало значения, полученные у более молодых крыс SHR. Снижение количества расширившихся сосудов средних диаметров было менее значительным: на 24.9% – у 20-месячных SHR, 31.1% – у SHR в возрасте 4 мес (рис. 3b). В группе крупных сосудов количество расширившихся на воздействие АХ артерий при старении увеличивалось в среднем в 1.5 раза (рис. 3b). Полученные данные свидетельствуют о возрастании при старении у крыс SHR роли NO-зависимых механизмов в АХ-опосредованной дилатации мелких пиальных артериальных сосудов, вероятно, связанном с наблюдаемым у них возрастным повышением уровня NO в результате увеличения экспрессии/активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [4, 12]. Однако повышенная экспрессия iNOS является одним из факторов, способствующих возникновению окислительного/нитрозативного стресса, приводящего к уменьшению eNOS-зависимой продукции NO [19, 29, 30]. Ингибирование iNOS, в свою очередь, может усиливать eNOS-зависимую продукцию NO и восстанавливать ее до уровня, наблюдаемого у молодых крыс [30]. Экспрессия iNOS происходит как в эндотелии, так и в миоцитах. Поэтому ее действие более выражено в артериях, имеющих развитую мышечную оболочку [31]. Именно с этим может быть связано наблюдаемое нами у крыс SHR повышение чувствительности к АХ в группе крупных сосудов после применения L-NAME, являющегося неселективным ингибитором NOS.

Одновременное применение L-NAME и TEA у 20-месячных крыс SHR приводило к уменьшению количества расширившихся на воздействие АХ сосудов только в группе мелких пиальных артерий. Количество дилатаций уменьшалось в среднем на 28.7%, что достоверно не отличалось от значений, полученных с применением только одного блокатора eNOS (рис. 3b). Количество дилатаций артерий средних и крупных диаметров увеличилось. В группе средних артерий количество расширившихся сосудов возросло в среднем на 46.4% (рис. 3b). Увеличение количества дилатаций крупных артерий составило в среднем 53.2% и достоверно не отличалось от значений, полученных при применении каждого из блокаторов в отдельности. Полученные данные указывают на ведущую роль NO-зависимого механизма в регуляции дилататорных реакций мелких пиальных артериальных сосудов у 20-месячных крыс SHR. В группах сосудов средних и крупных диаметров оба из исследованных механизмов вовлечены в осуществление АХ-опосредованной дилатации в равной степени.

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что старение приводит к изменению вклада BK_{Ca}-каналов в осуществление АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов. У нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс эти изменения имеют свои особенности.

У нормотензивных крыс старение сопровождается снижением вклада BK_{Ca}-каналов в осуществлении АХ опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов всех диаметров. Эти изменения во многом сопряжены с нарушением системы синтеза оксида азота и изменением роли NO-опосредованных механизмов в дилатации. Обнаруженная сосудистая дисфункция может служить предрасполагающим фактором развития гипертензии, поскольку аналогичными процессами также сопровождается формирование АГ у молодых спонтанно гипертензивных крыс.

Старение в условиях длительно текущей АГ не приводит к значительным изменениям вазодилататорного механизма, основанного на активации кальций-чувствительных калиевых каналов большой проводимости. Однако в возрасте 20 месяцев у крыс SHR наблюдается усиление вклада NO-зависимого механизма в регуляции АХ-опосредованных дилататорных реакций мелких пиальных артериальных сосудов. Это может служить проявлением сосудистых адаптационных механизмов, направленных на поддержание нормальной церебральной перфузии в условиях длительно текущей артериальной гипертензии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК, раздел 64.1) и программы ПРАН (Программа ПI. 43, АААА-А18-118021690111-3).

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ungvari Z., Kaley G., de Cabo R., Sonntag W.E., Csiszar A.* Mechanisms of vascular aging: new perspectives. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 65: 1028–1041. 2010. https://doi.org/10.1093/gerona/glq113

2. *Earley S., Brayden J. E.* Transient receptor potential channels in the vasculature. Physiol. Rev. 95 (2): 645–690. 2015. https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2014

3. *Forouzanfar M.H., Liu P., Roth G.A., Ng M.* Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. JAMA. 317 (2): 165–182. 2017.
https://doi.org/10.1001/jama.2016.19043
4. *Nikkari S.T., Määttä K.M., Kunnas T.A.* Functional inducible nitric oxide synthase gene variants associate with hypertension: a case-control study in a finnish population-the TAMRISK study. Medicine (Baltimore). 94 (46): e1958. 2015.
https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001958
5. *Соколова И.Б., Рыжак Г.А., Хавинсон В.Х.* Функциональная кумуляция влияния пептидного биорегулятора сосудов на микроциркуляцию в коре головного мозга у спонтанно гипертензивных крыс. Успехи геронтол. 30 (5): 671–675. 2017. [*Sokolova I.B., Ryzhak G.A., Havinson V.H.* Funkcional'naya kumulyaciya vliyaniya peptidnogo bioregulyatora sosudov na mikrocirkulyaciyu v kore golovnogo mozga u spontanno gipertenzivnyh krys. Uspekhi gerontol. 30 (5): 671–675. 2017. (In Russ)].
6. *Pires P., Ramos C., Matin N., Dorrance A.* The effects of hypertension on the cerebral circulation. Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 304: H1598–H1614.2013.
https://doi.org/10.1152/ajpheart.00490.2012
7. *Tanaka Y., Koike K., Toro L.* Maxi K channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. J. Smooth Muscle Res. 40 (4–5): 125–153. 2004.
https://doi.org/10.1540/jsmr.40.125
8. *Yuill K.H., McNeish A.J., Kansui Y., Garland C.J., Dora K.A.* Nitric oxide suppresses cerebral vasomotion by sGC-independent effects on ryanodine receptors and voltage-gated calcium channels. J Vasc Res. 47 (2): 93–107. 2010.
https://doi.org/10.1159/000235964
9. *Robertson B.E., Schubert R., Hescheler J., Nelson M.T.* cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 265: C299–C303. 1993.
https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.1.C299
10. *Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F.* Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. Compr. Physiol. 7 (2): 485–581. 2017.
https://doi.org/10.1002/ cphy.c160011
11. *Schmid J., Müller B., Heppeler D., Gaynullina D., Kassmann M., Gagov H., Mladenov M., Gollasch M., Schubert R.* The unexpected role of calcium-activated potassium channels: limitation of NO-induced arterial relaxation. J. Am. Heart Assoc. 7 (7): e007808. 2018.
https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007808
12. *Puzserova A., Ilovska V., Balis P., Slezak P., Bernatova I.* Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. Biomed. Res. Int. 2014 (1): 658479. 2014.
https://doi.org/10.1155/2014/658479
13. *Bernatova I.* Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence? BioMed Research International. Article ID 598271. 14p. 2014.
https://doi.org/10.1155/2014/598271
14. *Behringer E.J., Shaw R.L., Westcott E.B., Socha M.J., Segal S.S.* Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced Ca^{2+}-activated K^+ channel activation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33 (8): 1892–1901. 2013.
https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301514
15. *Beleznai T.Z., Yarova P.L., Yuill K.H., Dora K.A.* Smooth muscle Ca^{2+}-activated and voltage-gated K^+ channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. Microcirc. 18: 487–500. 2011.
https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00109.x
16. *Behringer E.J., Hakim M.A.* Functional interaction among KCa and TRP channels for cardiovascular physiology: modern perspectives on aging and chronic disease. Int. J. Mol. Sci. 20 (6): 1380. 2019.
https://doi.org/10.3390/ijms20061380
17. *Behringer E.J., Segal S.S.* Tuning electrical conduction along endothelial tubes of resistance arteries through Ca^{2+}-activated K^+ channels. Circ. Res. 110: 1311–1321. 2012.
https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.262592
18. *Парахонский А.П.* Сосудистые эффекты липопротеинов и оксида азота. Современные проблемы науки и образования. 8: 120–122. 2008. [*Parakhonsky A.P.* Vascular effects of lipoproteins and nitric oxide. Modern problems of science and education. 8: 120–122. 2008 (In Russ)].
19. *Cau S.B., Carneiro F.S., Tostes R.C.* Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. Front Physiol. 3: 218. 2012.
https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218
20. *Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L.* Oxidative stress, aging, and diseases. Clin. Interv. Aging. 13: 757–772. 2018.
https://doi.org/10.2147/CIA.S158513
21. *Montesanto A., Crocco P., Tallaro F., Pisani F., Mazzei B., Mari V., Corsonello A., Lattanzio F., Passarino G., Roseet G.* Common polymorphisms in nitric oxide synthase (NOS) genes influence quality of aging and longevity in humans. Biogerontology. 14: 177–186. 2013.
https://doi.org/10.1007/s10522-013-9421-z
22. *Fichtlscherer S., Dimmeler S., Breuer S., Busse R., Zeiher A.M., Fleming I.* Inhibition of cytochrome P450 2C9 improves endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilatation in patients with coronary artery disease. Circulation 109: 178–183. 2004.
https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000105763.51286.7F
23. *Feher A., Broskova Z., Bagi Z.* Age-related impairment of conducted dilation in human coronary arterioles. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 306: H1595–H1601. 2014.
https://doi.org/10.1152/ ajpheart.00179.2014
24. *Amberg G.C., Bonev A.D., Rossow C.F., Nelson M.T., Santana L.F.* Modulation of the molecular composition of large conductance Ca (2+) activated K (+) channels in vascular smooth muscle during hypertension. J. Clin. Invest. 112 (5): 717–724. 2003.
https://doi.org/10.1172/JCI18684
25. *Amberg G.C., Santana L.F.* Downregulation of the BK channel β1 subunit in genetic hypertension. Circ. Res. 93: 965–971. 2003.
https://doi.org/10.1161/01.RES.0000100068.43006.36
26. *Yang Y., Li P.- Y., Cheng J., Mao L., Wen J., Tan X.-Q., Liu Z.-F., Zeng X.-R.* Function of BKCa channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from han

chinese patients with hypertension. Hypertension. 61: 519–525. 2013.
https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.10.025

27. *Gokina N.I., Wellman T.D., Bevan R.D., Walters C.L., Penar P.L., Bevan J.A.* Role of Ca^{2+}-activated K^+ channels in the regulation of membrane potential and tone of smooth muscle in human pial arteries. Circul. Res. 79: 881–886. 1996.
https://doi.org/10.1161/01.res.79.4.881

28. *Khavandi K., Baylie R.A., Sugden S.A., Ahmed M., Csato V., Eaton Ph., Hill-Eubanks D.C., Bonev A.D., Nelson M.T., Greenstein A. S.* Pressure-induced oxidative activation of PKG enables vasoregulation by Ca^{2+} sparks and BK channels. Sci. Signal. 9 (449): ra100. 2016.
https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf6625

29. *Feletou M., Kohler R., Vanhoutte P.M.* Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. Annals of Medicine. 44: 694–716. 2012.
https://doi.org/10.3109/07853890.2011.585658

30. *Santhanam L., Lim H.K., Lim H.K., Miriel V., Brown T., Patel M., Balanson S., Ryoo S., Anderson M., Irani K., Khanday F., Costanzo L.D., Nyhan D., Hare J. M., Christianson D.W., Rivers R., Shoukas A., Berkowitz D.E.* Inducible NO synthase–dependent S -nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. Circ. Res. 101 (7): 692–702. 2007.
https://doi.org/10.1161/ CIRCRESAHA.107.157727

31. *Chertok V. M., Kotsyuba A. E.* Changes in inducible NO synthase in the pial arteries of different diameters in hypertensive rats. Bull Exp. Biol. Med. 152: 258–261. 2011.
https://doi.org/10.1007/s10517-011-1502-x

AGE-RELATED CHANGES IN THE ROLE OF POTASSIUM CHANNELS IN ACETYLCHOLINE-INDUCED DILATION OF PIAL ARTERIES IN NORMOTENSIVE AND SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

O. P. Gorshkova

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Age-related changes in the contribution of BK_{Ca}-channels and NO to acetylcholine-induced dilation of pial arteries were studied in normotensive (Wistar-Kyoto) and spontaneously hypertensive rats (SHRs). Using intravital microphotography (×470), responses of pial arteries to acetylcholine chloride (ACh, 10^{-7} M, 5 min) with and without blockade of BK_{Ca}-channels by tetraethylammonium chloride (TEA, 2 mM) and nitric oxide (NO) synthesis by L-NAME (10^{-3} M) were comparatively evaluated in WKY rats and SHRs aged 4 and 20 months. The evaluation criteria were the number and degree of arterial dilations arising in response to ACh after the application of inhibitors, with the latter criterion being evaluated, in turn, by measuring the erythrocyte flow width separately in three groups of arteries: small (<20 μm in diameter), medium (20–40 μm) and large (>40 μm). It was established that in WKY rats aging leads to diminish the role of BK_{Ca}-channels in ACh-induced dilation of all pial arteries, no matter the caliber. Similar processes were observed in the pial vascular bed of young SHRs. It appears that changes in the role of BK_{Ca}-channels in vascular dilatatory responses in aging WKY rats and young SHRs are largely associated with the impairment of NO synthesis and changes in the role of NO-mediated mechanisms of vasodilation. Aging in SHRs is accompanied by increasing the contribution of the NO-dependent mechanism to the regulation of ACh-induced dilatatory responses of small-caliber arteries.

Keywords: vasodilation, calcium-activated high-conductance potassium channels, hypertension, aging, pial arteries

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 63–70

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ГЛИКОГЕН КАК ЗАПАСАЮЩИЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СУБСТРАТ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ РЫБ

© 2021 г. Ю. А. Силкин[1,*], Е. Н. Силкина[1], М. Ю. Силкин[1]

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

**e-mail: ysilkin@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.07.2020 г.
После доработки 10.08.2020 г.
Принята к публикации 07.10.2020 г.

Исследовали содержание гликогена в эритроцитах двух видов хрящевых *(Raja clavata, Dasyatis pastinaca)* и четырех видов черноморских костистых рыб (*Trachurus mediterraneus ponticus, Spicara flexuosa, Diplodus annularis, Scorpaena porcus*). Показано, что в эритроцитах костистых рыб накопление гликогена, примерно в два раза превышало этот показатель у исследованных скатов. Ввиду уникальной способности эритроцитов ската – морской лисицы (*Raja clavata*), хорошо переносить содержание целостности клеток *in vitro* на холоде (+4°C), прослежена динамика расхода гликогена в эритроцитах на протяжении 11-суточного их хранения до распада клеток. Показано, что клетки экономно осуществляют траты гликогена, расход которого за весь период 11-суточного хранения составлял в эритроцитах морской лисицы 52%. Эритроциты скорпены (*Scorpaena porcus*) были гораздо менее устойчивыми к содержанию их на холоде. Период устойчивости взвешенных в физиологическом растворе эритроцитов скорпены не превышал двух суток. За этот период в эритроцитах скорпены не наблюдали значимых изменений концентрации гликогена.

Ключевые слова: гликоген, эритроциты, хрящевые, костистые рыбы, Черное море

DOI: 10.31857/S0044452921010095

ВВЕДЕНИЕ

Ядерные эритроциты рыб относятся к нередуцированным клеткам, имеющим ядро, митохондрии и преимущественно аэробный тип обмена. Это означает, что эритроциты рыб в отсутствие дефицита кислорода активно потребляют его в митохондриальном комплексе для компенсации своих энергетических потребностей [1]. Кроме этого, эритроциты рыб имеют полный набор гликолитических энзимов для анаэробного метаболизма глюкозы и набор ферментов для синтеза гликогена [2]. В литературе дискутируется вопрос о том, какой из углеводных или неуглеводных субстратов является главным в энергетике эритроцитов рыб. Можно было бы полагать, что, как и у млекопитающих, основным субстратом является глюкоза плазмы крови рыб. Однако это может быть отчасти справедливо только для рыб, в плазме которых имеется стабильно высокий уровень этого углеводного субстрата. У рыб с высоким уровнем гликемии в плазме концентрация глюкозы может колебаться между видами от 2.0 до 11 ммоль/л плазмы крови [3]. В плазме некоторых рыб уровень глюкозы может иметь на порядок более низкие значения и составлять 0.1–0.2 ммоль/л плазмы крови [4]. Такой уровень гликемии у этих рыб уже никак не может быть достаточным для покрытия энергетических потребностей их эритроцитов. В литературе высказываются предположения, что такие эритроциты могут использовать другие субстраты для ресинтеза АТФ, включая как жиры (олеаты), аминокислоты (аланин), так и производные углеводного метаболизма (пируват и лактат) [5]. Еще менее изучен вопрос о роли и значении внутриклеточного гликогена эритроцитов рыб. Является ли гликоген эритроцитов основным энергетическим углеводом для эритроцитов, как это доказано, например, для мышц и печени рыб или его можно отнести к "минорному" компоненту субстратного обеспечения? Содержание гликогена в эритроцитах хрящевых и костистых рыб можно отнести к неизученному вопросу. Поэтому основной целью настоящего исследования являлось изучение внутриклеточной концентрации гликогена эритроцитов у некоторых хрящевых и костистых черноморских рыб. Для понимания участия гликогена в поддержании энергетики клетки *in vitro* в цели данного исследования также входило изучение динамики его утилизации

в эритроцитах рыб при хранении клеток на холоде при +4°С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили эритроциты 2 видов хрящевых и 4 видов костистых черноморских рыб, отловленных у Восточного побережья Крыма. Хрящевые рыбы – скаты: морская лисица (*Raja clavata Linnaeus*) и морской кот (*Dasyatis pastinaca Linnaeus*). Костистые рыбы: ставрида (*Trachurus mediterraneus ponticus Aleev*), смарида (*Spicara flexuosa Rafineaque*), ласкирь (*Diplodus annularis Linnaeus*), скорпена (*Scorpaena porcus Linnaeus*). Выбранные виды рыб отличались по эволюционному положению и по экологической специализации.

Скаты относятся к древним, хрящевым видам рыб. Морская лисица (шиповатый скат) и морской кот (хвостокол) различались по своим температурным предпочтениям. Шиповатый скат – холодолюбивый вид, обитающий на 30–70 м глубине, плохо переносит температуру выше +20°С. Хвостокол – теплолюбивый вид, легко переносит температуру +25°С и выше, может подходить близко к берегу и находиться на 0.5 м глубине в летнее время.

Представленные костистые рыбы отличались по скоростным характеристикам и степени оседлости. Ставрида – самый скоростной и постоянно кочующий, пелагический вид. Смарида, ласкирь – прибрежные маломигрирующие, маневренные виды рыб, обитающие среди зарослей водорослей. Скорпена – прибрежный, малоподвижный, оседлый вид, обитающий среди камней, хищник-засадчик.

Объекты исследования были отловлены у Восточного побережья Крымского полуострова в осенне-зимнее время. Отловленных скатов до экспериментов в течение 3–5 сут содержали в непроточном, хорошо аэрируемом бассейне, емкостью в 25 м^3, из расчета 2 м^3 на одну особь. Костистых рыб содержали в 2 аэрируемых бассейнах, емкостью в 1 м^3, из расчета 100 литров на особь. Температура воды в бассейнах составляла 14–16°С, перед экспериментом рыб не кормили.

В процессе экспериментов с рыбами все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Кровь получали у скатов пункцией сердца гепаринизированной иглой (от каждой особи на опыт), а у костистых рыб пункцией хвостовой вены специально заточенной стеклянной пипеткой (от 5–7 особей на опыт – у ставриды и от 2–3 особей на пробу у скорпены, смариды и ласкиря). Выделенную кровь помещали в пробирку с соответствующим для хрящевых и костистых рыб охлажденным на льду физиологическим раствором с гепарином (0.5 МЕ/мл) в соотношении 1 : 10. Затем эритроциты отмывали от плазмы, дважды добавляя физиологический раствор и осаждали клетки центрифугированием при 1500–2000 об/мин на центрифуге К-23 (Германия). Надосадочную жидкость отсасывали, а эритроциты рыб разводили физиологическим раствором до гематокрита, равным 0.25–0.35. Состав отмывающего и инкубирующего физиологического раствора для скатов был следующего состава (мМ): 220 NaCl + 300 мочевины + 50 Трис – HCl (pH = 7.4). Состав отмывающего и инкубирующего физиологического раствора для костистых рыб не содержал мочевину и состоял (мМ) из: 180 NaCl + 10 и Трис – HCl (pH = 7.4).

Определение гликогена в эритроцитах рыб проводили по общепринятой методике, основанной на цветной реакции с антроном [6] и адаптированной для рыб (Морозова, 1971). Для определения количества исследуемого углеводного субстрата отбирали 0.1 мл (для всех исследуемых видов) суспензии эритроцитов с четко определенным гематокритом (Ht = 0.25–0.35), величину которого затем учитывали при расчетах. Отобранную пробу суспензии эритроцитов (0.1 мл) фиксировали в 30% КОН и нагревали в кипящей водяной бане в течение 20 мин для гидролиза белков. Затем пробы охлаждали, добавляли в них 0.5 мл основного раствора (25 г сернокислого цинка, 5 г хлористого натрия на 100 мл воды) и проводили осаждение гидролизата 4.5 мл этилового спирта. После осаждения пробы центрифугировали в течение 15 мин при скорости, равной 3000 об/мин.; отделяли осадок, осушали его на воздухе и растворяли в 1 мл 4% соляной кислоты. Полученный элюат фильтровали и производили повторное осаждение гликогена в 8 мл этилового спирта (в пробу). После этого пробы опять подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 15 мин, затем осадок растворяли горячей водой (по 5 мл). 1 мл такого раствора использовали для цветной реакции с антроном (+2 мл 0.2% растворенного в концентрированной серной кислоте антрона). Концентрацию цветного экстракта определяли с помощью прибора Specol-11 (Германия).

Расчет производили по формуле:

$$X = \frac{E_{\text{пробы}} \times 80\gamma \times 100\,000 \times 5}{E_{\text{станд}} \times 1000 \times d},$$

где $E_{\text{пробы}}$ – экстинкция опытной пробы; $E_{\text{станд}}$ – экстинкция стандартной пробы; d – вес пробы в граммах; 100000, 1000, 5 – коэффициенты пересчета в мг %.

Для исследования динамики утилизации гликогена эритроцитами суспензии эритроцитов морской лисицы и скорпены хранили в холодильнике при +4°С в течение 1, 3, 5, 8 и 11 сут при ежедневном визуальном контроле уровня гемолиза клеток

Таблица 1. Содержание гликогена (мг %) в эритроцитах некоторых черноморских рыб

Класс рыб	Вид рыбы	Содержание гликогена в эритроцитах в мг % сырой массы суспензии	*n*
Хрящевые	*Raja clavata* L.	142.8 ± 15.0 *	8
	Dasyatis pastinaca L.	139.2 ± 10.0 *	8
Костистые	*Trachurus mediterraneus ponticus Aleev*	372.3 ± 39.1	15
	Diplodus annularis l.	326.8 ± 22.5	7
	Spicara flexuosa R.	242.2 ± 14.0	12
	Scorpaena porcus L.	305.5 ± 35.5	11

Примечание: число *n* – количество повторных опытов; * – достоверные различия ($\rho < 0.05$) между значениями концентрации гликогена в эритроцитах при попарном сравнении хрящевых и всех видов костистых рыб.

в суспензии и определении содержания гликогена в эритроцитах по вышеописанной методике.

Полученные результаты выражали в мг % сырого веса клеток. Данные подвергали статистической обработке и представляли как среднее арифметическое ± средняя ошибка ($\bar{x} \pm S\bar{x}$). Все результаты были получены при проведении 7–15 независимых экспериментов для каждого исследованного вида рыб. Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты по содержанию гликогена (мг %) в эритроцитах хрящевых и костистых исследованных рыб представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1 эритроциты всех исследованных рыб накапливали гликоген в больших количествах, сопоставимых с накоплением этого субстрата в мышцах рыб [7]. Так, в эритроцитах костистых рыб его накопление колебалось в диапазоне от 242.2 до 372.3 мг %. Необходимо отметить, что накопление гликогена в эритроцитах костистых рыб было, в среднем, в два раза более высоким по сравнению с эритроцитами хрящевых рыб. При этом эритроциты исследованных скатов показали практически одинаковые значения накопления внутриклеточного гликогена (табл. 1). Среди костистых рыб можно проследить тенденцию зависимости внутриклеточной концентрации гликогена от естественной подвижности исследованных видов. Так, эритроциты наиболее подвижной ставриды имели самый высокий уровень внутриклеточного гликогена. У маневренного ласкиря, характеризующегося средней подвижностью, также можно отметить высокое содержание гликогена. У смариды и малоподвижной скорпены его концентрация была на 18–35% ниже (табл. 1), что указывало на достаточно большой разброс в колебаниях этого показателя в эритроцитах с низким уровнем двигательной активности рыб.

Эритроциты морской лисицы являются уникальными клетками ввиду высокой устойчивости *in vitro* их суспензий, способных до 11 сут в холоде (+4°C) без признаков видимого гемолиза сохранять свою целостность. Благодаря этому нам удалось проследить динамику изменения содержания внутриклеточного гликогена в эритроцитах ската на протяжении указанного выше периода хранения. Полученные результаты выражали в % к физиологическому состоянию, принятому за 100% (рис. 1).

Как видно на рис. 1 эритроциты морской лисицы в процессе хранения их при +4°C достаточно медленно теряли гликоген. В первые сутки потери практически отсутствовали. На третьи–пятые сутки его убыль составляла 36–40%. В последующий период хранения клеток гликоген тратился еще медленнее и его потери к 8-м суткам были 45%, а на 11-е сутки – 52% (рис. 1).

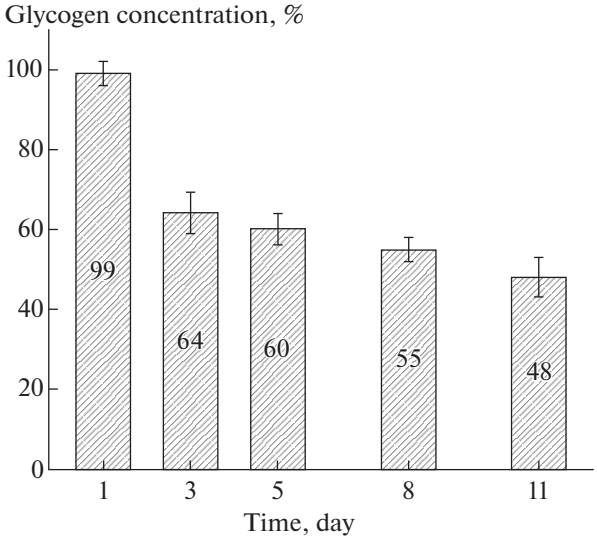

Рис. 1. Динамика изменения концентрации гликогена в эритроцитах морской лисицы в процессе содержания клеток на холоде (+4°C).

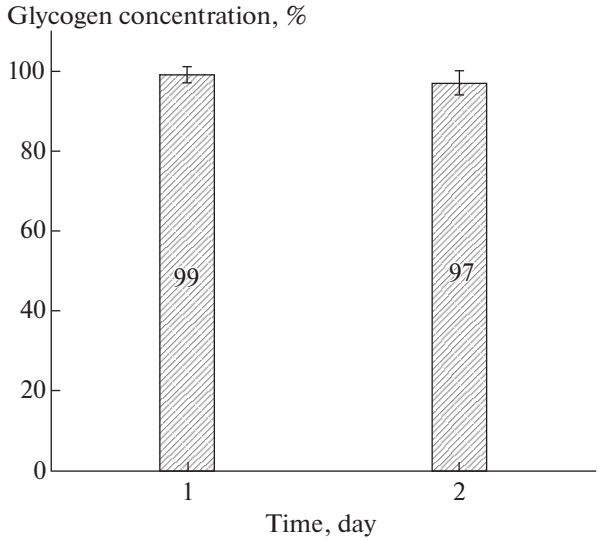

Рис. 2. Динамика изменения концентрации гликогена в эритроцитах скорпены в процессе содержания клеток на холоде (+4°C).

Эритроциты скорпены были гораздо менее устойчивыми к хранению по сравнению с клетками ската. Устойчивость клеточных суспензий скорпены при хранении в холоде во времени не превышала двух суток (рис. 2). Как видно на рис. 2 красные клетки крови скорпены на протяжении всего 2-х суточного периода хранения практически не теряли гликоген и его уровень оставался стабильным до начала гемолитических процессов в суспензии клеток, которые наступали через 48 ч с момента выделения клеток из организма (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эритроциты рыб относятся к клеткам с аэробным метаболизмом, о чем свидетельствуют литературные источники [8] и наши исследования скоростей поглощения кислорода митохондриями этих клеток [9]. Благодаря наличию митохондрий и цикла трикарбоновых кислот эритроциты рыб потенциально могут использовать *in vivo* разные энергетические субстраты. Так, было показано, что эритроциты форели *(Oncorhynchus mykiss)* и американского угря *(Anguilla rostrata)* могут окислять глюкозу, лактат и аланин [5, 10]. Эритроциты карпа *(Cyprinus carpio)* в дополнение к этим субстратам могут использовать пируват и глютамат [11]. Использование разных субстратов эритроцитами рыб можно было бы рассматривать как важное преимущество ядерных эритроцитов особенно в условиях гипотермии, голодания, гипоксии или при ацидозных состояниях. Однако вопрос об использовании других субстратов в энергетике эритроцитов рыб при стрессовых состояниях остается спорным, особенно если учесть, что для их вовлечения в метаболизм необходим кислород, который в этих случаях как раз и является лимитирующим фактором.

Хорошо известно, что эритроциты млекопитающих не содержат ядра и в физиологических условиях, как источник энергии, утилизируют только глюкозу. Отсутствие цитохромной системы минимизирует кислородные потребности безъядерных эритроцитов, и их энергетическая система функционирует на основе анаэробного гликолиза. Глюкоза из русла крови проникает в эритроцит с помощью специфического переносчика, расположенного в мембране, не зависит от инсулина и не является лимитирующим фактором. Выделенные из организма человека, лишенные глюкозы эритроциты быстро погибают ввиду снижения внутриклеточной концентрации АТФ, которое вызывает падение поддержки градиента концентрации на мембране Na^+ и K^+, накопления метгемоглобина и окисленного глутатиона [2]. Из всего сказанного можно полагать, что эритроциты млекопитающих и человека не нуждаются в запасании глюкозы в виде гликогена. Тем не менее активный метаболизм гликогена был продемонстрирован как в нормальных эритроцитах человека [12], так и в богатых гликогеном красных клетках крови, вызванных их гликоген-накопительной болезнью (тип III и тип IV) а [13]. В норме содержание гликогена в безъядерных эритроцитах невелико. В эритроцитах человека по разным оценкам его величина составляла от 57.3 до 69.5 мг/г Hb [14, 15].

Гликоген в эритроцитах рыб, как и в других тканях, является запасаемым этими клетками углеводом. Однако, в отличие от мышечного или печеночного гликогена, который в этих тканях рыб относится к быстро мобилизуемому энергетическому субстрату, роль эритроцитарного гликогена не совсем ясна. Так, не ясно, когда и при каких условиях происходит накопление полисахарида в эритроцитах. Не ясно, когда и при каких условиях происходит его мобилизация и тем более не ясна его роль, как субстрата в энергетике эритроцитов рыб. Немногочисленные данные по накоплению гликогена в эритроцитах рыб свидетельствуют о том, что его внутриклеточная концентрация варьирует в широком диапазоне. Так, в эритроцитах атлантической трески *(Gadus morhua)* его концентрация составляла 0.35 мкмоль глюкозных единиц $г^{-1}$ клеток, а в эритроцитах европейского керчака *(Myoxocephalus scorpius)* – 2.9 мкмоль глюкозных единиц $г^{-1}$ клеток [4]. Величина накопления гликогена в эритроцитах керчака была близка накоплению его в эритроцитах морского ворона *(Hemitripterus americanus)* (3.9 мкмоль глюкозных единиц $г^{-1}$ клеток), тогда как уровень накопления полисахарида в эритроцитах атлантической трески был сопоставим с его внутриклеточной концентрацией в эритроцитах радужной форели [16].

Полученные нами результаты по содержанию гликогена в эритроцитах хрящевых и костистых черноморских рыб показали (табл. 1), что в эритроцитах скатов накопление этого энергетического субстрата в два раза было ниже по сравнению с красными клетками крови костистых рыб. Небольшое накопление гликогена могло свидетельствовать о более низком уровне энергетического метаболизма в эритроцитах хрящевых рыб в сравнении с костистыми. В пользу этого предположения могут свидетельствовать наши исследования по изучению дыхательной активности митохондриального комплекса эритроцитов хрящевых и костистых рыб [9]. Нами показано, что эритроциты костистых рыб характеризовались большими скоростями поглощения кислорода по сравнению с эритроцитами скатов в ответ на стимуляцию дыхательной активности митохондрий энергетическими субстратами – глутаматом, малатом и сукцинатом. Высокий уровень гликогена в эритроцитах костистых рыб может также указывать на большую активизацию их ферментов, осуществляющих синтез запасаемого полисахарида. Безусловно, для биосинтетических процессов гликогеногенеза важным фактором является концентрация глюкозы в крови. Поэтому глюкозу крови и внутриклеточный гликоген эритроцитов рыб можно рассматривать как две взаимосвязанные компоненты одного единого пула субстратного обеспечения углеводами в системе плазма–эритроциты. Немногочисленные данные свидетельствуют, что уровень глюкозы в крови скатов не имеет высоких значений. Так, содержание глюкозы в крови пресноводного ската *(Hypanus sabinus*) составляло 0.71 ± ± 0.1 ммоль/л [17]. У морского ската (*Dasyatis americana*) концентрация глюкозы в крови также была невысокой и составляла 1.69 ммоль/л [18]. Возможно, низкий уровень глюкозы в плазме черноморских скатов является значимой предпосылкой низкого уровня гликогена в эритроцитах этих рыб. Однако низкое содержание глюкозы в плазме крови скатов не является общим признаком для хрящевых рыб. У их ближайших родственников – более подвижных акул, характеризующихся высоким уровнем метаболизма, содержание глюкозы в плазме крови было, как минимум, на порядок выше. Так, в плазме карибской рифовой акулы (*Carcharhinus perezi*) содержание глюкозы в плазме крови составляло 10.4 ммоль/л, а у акулы-няньки (*Ginglymostoma cirratum*) – 20.0 ммоль/л [19].

Согласно литературным данным концентрация глюкозы в крови костистых рыб также имеет очень большую вариабельность, при этом некоторые виды имеют уровень субстрата ниже 1 ммоль/л, а другие – уровень, превышающий 10 моль/л [20]. У морских видов рыб – европейского керчака *(Myoxocephalus scorpius)*, куннера – голубого окуня *(Tautogolabrus adsperdus)*, атлантического лосося *(Salmo salar)*, атлантической трески *(Gadus morhua)* концентрация глюкозы в плазме крови рыб составляла соответственно: 0.73, 1.95, 4.1, 4.0 ммоль/л [4]. В нашей лаборатории тоже проводили определение концентрации глюкозы в плазме некоторых морских костистых рыб [7]. Так, у ставриды, смариды, скорпены уровень глюкозы в плазме крови составлял 7.7, 10.3 и 1.8 ммоль/л соответственно. Исходя из этих данных нами не установлено какой-либо корреляции между концентрацией глюкозы в плазме крови и содержанием гликогена в эритроцитах исследованных черноморских костистых рыб (табл. 1).

Условия, при которых это происходит, и сам вопрос гликогеногенеза в эритроцитах рыб практически не исследованы. Нам, в доступной литературе, не удалось найти источников посвященных этом вопросу. Тем более не ясно, при каких условиях эритроциты рыб используют накопленный гликоген *in vivo* и *in vitro*. Эритроциты ската морской лисицы относятся к уникальным клеткам в отношении их способности длительно сохранять свою целостность *in vitro*. Выделенные и взвешенные в физиологическом растворе клетки сохранялись на холоде (+4°C) до 11 сут без видимых признаков гемолиза. Это позволило проследить динамику использования гликогена эритроцитами рыб при длительном хранении. Как видно на рис. 1 в процессе хранения гликоген постепенно расходовался эритроцитами ската для поддержания своих энергетических потребностей. К концу срока хранения его концентрация составляла 48%, что свидетельствовало о вовлечении этого полисахарида в клеточный метаболизм в отсутствие других энергетических субстратов в физиологическом растворе, в котором эритроциты были отмыты и взвешены для хранения. Отсутствие в физиологическом растворе глюкозы делает процесс использования эритроцитами внутриклеточного гликогена неизбежным и, скорее всего, единственным возможным вариантом для поддержания своего метаболизма. Довольно пологое падение величины его внутриклеточной концентрации можно объяснить способностью клеток при стрессовых ситуациях блокировать свои энергетические затраты на 80% и тем самым экономно расходовать внутриклеточные ресурсы [8]. Выделение клеток и хранение их в физиологическом растворе как раз можно отнести к существенному стрессу для эритроцитов рыб. Ввиду нестойкости эритроцитов скорпены при хранении в холоде (+4°C) и их гемолиза после двухсуточного содержания (рис. 2) нам не удалось проследить динамику внутриклеточной концентрации гликогена в этих клетках. Эритроциты других исследованных костистых рыб были еще менее стойкими и начинали самопроизвольно разрушаться через 17–24 ч после выделения (не опубликованные данные).

Сам факт использования гликогена эритроцитами рыб в процессе хранения свидетельствует о

востребованности этого субстрата эритроцитами, величина накопления которого в них сопоставима с уровнем этого полисахарида в белых мышцах рыб [7]. Это подчеркивает значимость гликогена для эритроцитов в тех жизненных случаях, когда использование других субстратов затруднено или невозможно. На возможность использования гликогена в качестве эндогенного источника энергии указали в своих исследованиях Д. Пескуэро и соавт. [21]. Для вовлечения гликогена в метаболизм эритроцитов, по-видимому, критически важным является падение концентрации глюкозы в плазме крови. Такие ситуации в жизни рыб встречаются часто и связаны, например, со стрессовыми мышечными нагрузками, длительными периодами голодания [22]. Особое место занимают гипоксийные состояния, которые случаются у рыб достаточно часто. Как известно, углеводы относятся к субстратам, утилизация которых может происходить анаэробно и при этом не требуется расхода кислорода. В эритроцитах их метаболизм осуществляется по классическому пути Эмдена–Мейергофа и, хотя выход энергетических эквивалентов АТФ в 16 раз уступает аэробному распаду, у рыб такой путь утилизации глюкозы востребован. Как показал ряд исследований [5, 11, 16, 21], глюкоза плазмы у рыб является основным субстратом для получения энергии. Даже в присутствии нормального напряжения кислорода глюкоза крови используется эритроцитами анаэробно и, как минимум, 30% этого субстрата преобразуется в лактат [5]. Видимо, использование глюкозы и гликогена эритроцитами рыб в качестве анаэробного источника позволяет экономить переносимый этими клетками кислород. Следует подчеркнуть, что низкое содержание гликогена в эритроцитах свойственно холодолюбивым рыбам, треске и радужной форели. У этих видов экономия кислорода не имеет смысла ввиду отсутствия дефицита кислорода в холодной среде их обитания. У исследованных нами теплолюбивых подвижных рыб (ставрида, ласкирь, смарида) содержание внутриклеточного гликогена было высоким. Высокое содержание гликогена было отмечено также у прибрежных сидячих форм рыб (керчак, морской ворон [16]), а также и у исследованной нами скорпены, которые имели существенно большие запасы этого полисахарида, чем холодолюбивые треска и радужная форель. Прибрежные виды рыб чаще испытывают гипоксийные состояния и использование глюкозы и гликогена в этих ситуациях позволяет экономить переносимый ими кислород для обеспечения энергетики других жизненно-важных тканей и органов. Такие же потребности в экономии кислорода необходимы теплолюбивым подвижным рыбам, у которых парциальное давление кислорода в среде падает с повышением ее температуры, а высокий энергетический обмен требует переноса эритроцитами больших объемов кислорода. Как мы полагаем, важность такого использования углеводов в специализированных клетках, какими являются эритроциты, было подхвачено естественным отбором и доведено до “совершенства” в безъядерных эритроцитах млекопитающих. Это позволило максимально увеличить КПД газотранспортной системы млекопитающих и занять им господствующее положение в царстве животных.

Эритроциты некоторых рыб относятся к клеткам, которые наделены высокой толерантностью к гипоксии/аноксии и другим стрессовым факторам, и способны быстро перепрограммировать свой метаболизм в сторону вовлечения гликогена в энергетический процесс для коррекции продуцирования и потребления АТФ [23]. Это позволяет предотвратить катастрофические последствия резких колебаний внутриклеточного АТФ и энергетического статуса клетки в целом. Такая перегруппировка энергетики клетки при дефиците кислорода в сторону предпочтительного использования гликогена свойственна и другим тканям стрессоустойчивых рыб [24–26] и, по-видимому, лежит в основе их толерантности. Как уже сообщали Р. Фергюсон и соавт. [8], в отсутствие кислорода эритроциты рыб сохраняют только 20–30% энергетического метаболизма, что совпадает с долей вклада углеводов в общий обмен красных клеток крови [5]. Такое совпадение позволяет высказать предположение о том, что эти 30% энергетических затрат являются необходимой и достаточной базой для обеспечения текущих потребностей эритроцитов рыб в поддержание своего функционального состояния. Остальные 70% энергетики клеток, видимо, расходуются на поддержание биосинтетических и регенерационных молекулярных процессов, что способствует более длительному поддержанию их газотранспортной функции и бóльшему нахождению эритроцитов в кровотоке рыб. Как известно, у рыб продолжительность “жизни” эритроцитов примерно в два раза выше, чем у млекопитающих, и составляет более 200 сут [27].

Полученные данные по содержанию гликогена в эритроцитах рыб расширяют наши представления о важности участия этого углеводного субстрата в энергетике этих клеток и открывают перспективу дальнейших исследований. Эти исследования должны быть направлены на выяснение факторов и механизмов, вызывающих активацию/деактивацию вовлечения гликогена в энергетический метаболизм эритроцитов рыб, что важно для понимания адаптационных возможностей этих клеток и гидробионтов в целом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы гос. задания № АААА-А19-119012490045-0 “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.А. Силкин и Е.Н. Силкина, осуществили планирование, сбор данных, написание и редактирование манускрипта. М.Ю. Силкин осуществлял техническую поддержку при проведении экспериментальных исследований, участвовал в обработке и обсуждении экспериментальных данных, оформлении графиков манускрипта. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Phillips M.C.L., Moyes C.D., Tufts B.L.* The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) red blood cells. J. Exp. Biol. 203: 1039–1045. 2000.
2. *Липунова Е.А., Скоркина М.Ю.* Физиология крови. Белгород: Из-во БелГУ. 324 с. 2007. [*Lipunova E.A., Skorkina M.Ju.* Fiziologija krovi. Belgorod: Iz-vo BelGU. 324 s. 2007. (in Russ)].
3. *Polakof S., Panserat S., Soengas J.L., Moon T.W.* Glucose metabolism in fish: a review. J. Comp. Physiol. B 182: 1015–1045. 2012. https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7
4. *Driedzic W.R., Clow K.A., Short C.E.* Glucose uptake and metabolism by red blood cells from fish with different extracellular glucose levels. J. Exp. Biol. 216: 437–446. 2013. https://doi.org/10.1242/jeb.079178
5. *Walsh P.J., Wood C.M., Thomas S., Perry S.F.* Characterization of red blood cell metabolism in rainbow trout. J. Exp. Biol. 154: 475–489. 1990.
6. *Морозова А.Л.* Исследование содержания углеводов и фосфорных соединений в тканях ставриды и скорпены при разном функциональном состоянии. Автореф. канд. дисс. Л., 1971. 24 с. [*Morozova A.L.* Issledovanie soderzhaniya uglevodov i fosfornyh soedinenij v tkanyah stavridy i skorpeny pri raznom funkcional'nom sostoyanii. Avtoref. kand. diss. L. 1971. (in Russ)].
7. *Морозова А.Л., Астахова Л.П., Силкина Е.Н.* Углеводный обмен при плавании рыб, глава VII в монографии "Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб". К.: Наукова Думка. С. 122–143. 1978. [*Morozova A.L., Astahova L.P., Silkina E.N.* Uglevodnyj obmen pri plavanii ryb, glava VII v monografii "Jelementy fiziologii i biohimii obshhego i aktivnogo obmena u ryb". K.: Naukova Dumka. S. 122–143. 1978. (in Russ)].
8. *Ferguson R.A., Tufts B.L., Boutilier R.G.* Energy metabolism in trout red cells: consequences of adrenergic stimulation in vivo and in vitro. J. Exp. Biol. 143: 133–147. 1989
9. *Silkin Yu.A., Korotkov S.M., Silkina E.N.* The Study of the Bioenergetic Characteristics of the Red Blood Cells of Black Sea Fish: the Common Stingray (Dasyatis pastinaca L.) and Black Scorpionfish (Scorpaena porcus L.). Biophysics. 62 (3): 434–439. 2017. https://doi.org/10.1134/S0006350917030204
10. *Soengas J.L., Moon T.W.* Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel Anguilla rastrata. J. Exp. Biol. 198: 877–888. 1995.
11. *Nikinmaa M., Tiinonen K.* Substrate transport and utilization in fish erythrocytes. Acta Physiol. Scand. 152: 183–189. 1994. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1994.tb09798.x
12. *Mouses S.W., Bashan N., Gutman A.* Glycogen metabolism in the normal red blood cells. Blood. 40 (6): 836–8432. 1972.
13. *Mouses S.W., Bashan N., Gutman A., Ockerman P.A.* Glycogen metabolism in glycogen-rich erythrocytes. Blood. 44 (2): 275–284. 1974.
14. *Sidbury J.B. Jr., Cornblath M., Fisher J., House E.* Glycogen in erythrocytes of patients with glycogen storage disease. Pediatrics. 27: 103–111. 1961.
15. *Miwa I., Suzuki S.* An improved quantitative assay of glycogen in erythrocytes. Ann. Clin. Biochem. 39: 612–613. 2002. https://doi.org/10.1177/000456320203900613
16. *Dridzic W.R., Clow K.A., Short C.E.* Extracellular glucose can fuel metabolism in red blood cells from high glycemic Atlantic cod (Gadus morhua) but not low glycemic short-horned sculpin (Myoxocephalus scorpius). J. Exp. Biol. 217: 3797–3804. 2014. https://doi.org/10.1242/jeb.110221
17. *Lambert F.N., Treberg J.R., Anderson W.G., Brandt C., Evans A.N.* The physiological stress response of the Atlantic stingray (Hypanus sabinus) to aerial exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 219–220: 38–43. 2018. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.009
18. *Cain D.K., Harms C.A., Segars A.* Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (Dasyatis americana). J. Zoo. Wildl. Med. 200. 35 (4): 471–476. 2004. https://doi.org/10.1638/03-107
19. *Bouyoucos I.A., Talwar B.S., Brooks E.J., Brownscombe J.W., Cooke S.J., Suski S., Mandelman J.W.* Exercise intensity while hooked is associated with physiological status of longline-captured sharks. Conserv. Physiol. 20.6 (1): 1–13. 2018. https://doi.org/10.1093/conphys/coy074
20. *Polakof S., Mommsen T.P., Soengas J.L.* Glucosensing and glucse homeostasis from fish to mammals // Comp. Biochem. Physiol. 160B: 123–149. 2011. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.006
21. *Pesquero J., Roig T., Bermudez J., Sanchez J.* Energy metabolism by trout red blood cells: substrate utilization // J. Exp. Biol. 193: 183–190. 1994. PMID: 9317599
22. *Плисецкая Э.М.* О гормональной регуляции углеводного обмена у низших позвоночных (круглоротых и рыб). Автореферат докт дис. Ленинград. 38 с. 1972. [*Pliseckaja Je. M.* O gormonal'noj reguljacii uglevodnogo obmena u nizshih pozvonochnyh (kruglorotyh i ryb). Avtoreferat dokt dis. Leningrad. 38 s. 1972. (in Russ)].
23. *Солдатов А.А., Парфенова И.А., Новицкая В.Н.* Содержание одновалентных катирнов и АТФ в эритроцитах морских рыб при экспериментальной гипоксии. Укр. биохим. журн. 82: 36–41. 2010. [*Soldatov A.A., Parfenova I.A., Novickaya V.N.* Soderzhanie odnovalentnyh katirnov i ATF v eritrocitah morskih ryb pri eksperimental'noj gipoksii. Ukr. biohim. zhurn. 82: 36–41. 2010 (in Russ)].

24. *Солдатов А.А., Головина И.В., Колесникова Е.Э., Сысоева И.В., Сысоев А.А., Кухарева Т.А., Кладченко Е.С.* Активность ферментов энергетического обмена и содержание АТФ в тканях мозга и жабр морского ерша Scorpaena porcus Linnaeus при кратковременной гипоксии. Ж. эвол. биохим. и физиол. 56 (3): 213–223. 2020. [*Soldatov A.A., Golovina I.V., Kolesnikova E.E., Sysoeva I.V., Sysoev A.A., Kuhareva T.A., Kladchenko E.S.* Aktivnost' fermentov energeticheskogo obmena i soderzhanie ATF v tkanyah mozga i zhabr morskogo ersha Scorpaena porcus Linnaeus pri kratkovremennoj gipoksii. J. Evol. Biohim. Phys. 56 (3): 213–223. 2020. (in Russ)]. https://doi.org/10.31857/S0044452920010143

25. *Serebrenikova T.P., Nesterov V.P.* Activation of glycogen phosphorylases by glycogen phosphorylase kinases: dependence on ATP concentration and species specificity of the enzymes. J. Evol. Biohim. Phys. 38 (2): 242–244. 2002.

26. *Шмелев В.К., Серебреникова Т.П.* Влияние температуры на кинетику фосфорилазной реакции и активацию фосфорилазы под действием киназы фосфорилазы у ската Dasyatis pastinaca. Украинский биохимический журнал. 1987. 59 (1): 34–38. [*Shmelev V.K., Serebrenikova T.P.* Effect of temperature on the kinetics of the phosphorylase reaction and phosphorylase activation induced by phosphorylase kinase in the skate Dasyatis pastinaca/ Ukrainskij biohimicheskij zhurnal. 1987. 59 (1): 34–38].

27. *Солдатов А.А.* Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб. Ж. эвол. биохим. и физиол. Т. 41. № 3. С. 217–223. 2005. [Soldatov A.A. Osobennosti organizacii i funkcionirovaniya sistemy krasnoj krovi ryb. J. Evol. Biohim. Phys. 41 (3): 217–223. 2005. (in Russ)].

GLYCOGEN AS AN ENERGY STORAGE SUBSTRATE IN FISH NUCLEATED ERYTHROCYTES

Yu. A. Silkin[a,#], E. N. Silkina[a], and M. Yu. Silkin[a]

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

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

We studied the glycogen content in erythrocytes of two Black Sea cartilaginous (*Raja clavata, Dasyatis pastinaca*) and four teleost (*Trachurus mediterraneus ponticus, Spicara flexuosa, Diplodus annularis, Scorpaena porcus*) species. Glycogen accumulation in erythrocytes of teleost fish was about twice as high as in the stingrays. Due to the unique ability of stingray *R. clavata* erythrocytes to well preserve cell integrity *in vitro* in the cold (+4°C), the dynamics of glycogen expenditure in erythrocytes was tracked over 11 days of storage until cell disintegration. Erythrocytes spent glycogen economically: during the entire storage period, only 52% of glycogen were consumed. In the black scorpionfish *S. porcus*, erythrocytes were far less tolerant to be stored in the cold. The stability period of *S. porcus* erythrocytes suspended in physiological saline did not exceed two days. During this period, no significant changes in the glycogen concentration were observed.

Keywords: glycogen, erythrocytes, cartilaginous fish, teleost fish, Black Sea

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 71–82

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕВОЙ МИКРОГЕМОДИНАМИКИ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С МЕТАЛЛАМИ

© 2021 г.
М. Ю. Раваева[1,*], Е. Н. Чуян[1], И. С. Миронюк[1], И. В. Черетаев[1], Т. В. Гришина[1]

[1] *Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Республика Крым, Россия*

**e-mail: ravaevam@yandex.ru*

Поступила в редакцию 05.07.2020 г.
После доработки 19.09.2020 г.
Принята к публикации 07.10.2020 г.

В работе исследовалось действие ацетилсалициловой кислоты и ацетилсалицилатов кобальта (Co^{2+}), цинка (Zn^{2+}), никеля (Ni^{2+}) и марганца (Mn^{2+}) в дозах 5 и 10 мг/кг на показатели тканевой микрогемодинамики крыс. Установлено, что координационные соединения металлов с ацетилсалициловой кислотой демонстрируют новые свойства, а также обладают более выраженным биологическим эффектом по сравнению с исходным соединением – ацетилсалициловой кислотой, что делает перспективным дальнейший поиск биологической и фармакологической активности среди новосинтезированных координационных соединений ацетилсалицилатов.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, координационные соединения ацетилсалицилатов, показатели тканевой микрогемодинамики, лазерная допплеровская флоуметрия

DOI: 10.31857/S0044452921010083

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы значительные успехи в различных областях медицины во многом обязаны внедрению новых высокоактивных лекарственных средств, созданных на основе известных и изученных лекарственных препаратов. К их числу относится ацетилсалициловая кислота – как одна из самых важных оксиароматических кислот, которая нашла большое практическое применение. Эта кислота широко используется в фармацевтической промышленности при производстве антисептиков, дезинфицирующих веществ, антиревматических и противолихорадочных средств [1]. Непосредственно сама кислота оказывает раздражающее действие на организм человека, но поиск новых биологически активных соединений на ее основе привел к получению не только широко известных ныне ее производных, таких, например, как аспирин (ацетилсалициловая кислота), но и к синтезу ее солей и комплексных соединений с солями металлов, нашедших практическое применение [2, 3]. Кандидатами на роль таких относительно безопасных средств могут быть представители ненаркотических анальгетиков – салицилаты [3]. Они вошли в группу наиболее безопасных химико-терапевтических средств, однако, не лишенных побочных эффектов и обладающих токсичностью.

Проблему токсичности салицилатов решает синтез новых координационных соединений, в которых помимо лиганда, обладающего биоактивными свойствами, присутствует переходный металл-микроэлемент, поскольку такое сочетание полезных компонентов снижает раздражающее действие кислоты, токсичность салицилатных комплексов по сравнению с простыми солями переходных металлов-микроэлементов. Именно такой синтетический подход к созданию соединений ацетилсалициловой кислоты с металлами (Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}) был выбран на кафедре общей и органической химии Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (проф. А.Н. Гусев). На кафедре физиологии человека и животных и биофизики проведены первые исследования биологической активности новосинтезированных ацетилсалицилатов кобальта ($ACCo^{2+}$), цинка ($ACZn^{2+}$), никеля ($ACNi^{2+}$) и марганца ($ACMn^{2+}$), которые продемонстрировали наличие у них разнообразных кардио- и вазотропных свойств. Однако изучение реакции микрорусла на введение данных соединений существенно дополнит уже имеющиеся сведения об особенностях влияния новосинтезированных соединений на кардиореспираторную систему.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось установление эффектов ацетилсалицила-

тов $ACCo^{2+}$, $ACZn^{2+}$, $ACNi^{2+}$ и $ACMn^{2+}$ на показатели тканевой микрогемодинамики крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием “Экспериментальная физиология и биофизика” кафедры физиологии человека и животных и биофизики КФУ им. В.И. Вернадского.

Для эксперимента отбирали здоровых половозрелых самцов лабораторных крыс массой 180–200 г линии Вистар (“ФГУП “Питомник лабораторных животных “Рапполово”), прошедших карантин не менее 14 дней. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 18–22°С на подстиле “Рехофикс МК 2000” (на основе початков кукурузы) с естественным 12-часовым свето-темновым циклом, свободным доступом к воде (ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур”) и полноценному гранулированному корму ГОСТ Р-50258-92.

Экспериментальные исследования проводились на 140 белых крысах самцах, характеризующихся средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью в тесте “открытого поля”, которые составляют большинство в популяции, и поэтому у них развивается наиболее типичная реакция на действие различных факторов [4], в том числе и тестируемых химических соединений.

В ходе эксперимента проведено 2 серии исследований:

1 серия – исследование реакции микроциркуляции кожи крыс на внутрибрюшинное введение АСК и координационных соединений ацетилсалициловой кислоты с катионами кобальта ($ACCo^{2+}$) и цинка $(ACZn^{2+})^{+}$ в дозах 5 и 10 мг/кг.

2 серия – исследование реакции микроциркуляции кожи крыс на внутрибрюшинное введение координационных соединений АСК с катионами никеля ($ACNi^{2+}$) и марганца (ACMn2) в дозах 5 и 10 мг/кг.

Для этого животных после предварительного отбора разделили на 7 групп по 10 крыс в каждой.

1 серия экспериментов:

1 группа – контрольная (К; $n = 10$) – животные, которым производились внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора (NaCl, 0.9%), объем 0.2 мл;

2–3 группы – животные, которым производились внутрибрюшинные инъекции АСК в дозах 5 и 10 мг/кг, объем 0.2 мл ($n = 10$);

4–5 группы – животные, которым производились внутрибрюшинные инъекции $ACCo^{2+}$ в дозах 5 и 10 мг/кг, объем 0.2 мл ($n = 10$);

6–7 группы – животные, которым производились внутрибрюшинные инъекции $ACZn^{2+}$ в дозах 5 и 10 мг/кг, объем 0.2 мл ($n = 10$).

Схема второй серии экспериментов была идентичной первой, однако группы 4–5 и 6–7 составляли животные, которым производились инъекции ацетилсалицилатов никеля и марганца в дозах 5 и 10 мг/кг, объем 0.2 мл ($n = 10$).

Тестируемые вещества были синтезированы на кафедре общей и неорганической химии факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского” под руководством проф. А.Н. Гусева (химическая чистота составляла не менее 98.0%).

Биоскрининг ацетилсалицилатов проводился через 20 мин после внутрибрюшинного введения соединений в указанных концентрациях, поскольку в этот период наблюдается максимальная их концентрация [5].

Показатели тканевой микрогемодинамики у животных изучали с помощью метода лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) [6–8]. Значительным преимуществом метода ЛДФ перед другими методами исследования тканевого кровотока является его возможность измерения микрокровотока *in vivo* и бесконтактно, возможность получения большого количества измерений, их регистрации и обработки в реальном масштабе времени, что позволяет проводить мониторинг, в том числе, и при действии факторов химической природы.

Регистрация показателей микроциркуляции (Мц) проводилась при помощи лазерного анализатора кровотока “Лазма-МЦ” (производство НПП “Лазма”, Россия) с использованием программы LDF 2.20.0.507WL.

Поскольку ЛДФ является высокочувствительным методом, то, для сведения к минимуму внешних помех, крысу на время записи помещали в прозрачный пенал из оргстекла, ограничивающий подвижность животного. Размер пенала регулировался индивидуально и подбирался так, чтобы животное могло свободно дышать, и ни одна часть тела не была плотно зажата. Хвост животного фиксировали на ровной поверхности на одной линии с телом в горизонтальном положении тканевым пластырем. Оптоволоконный зонд прибора “Лазма-МЦ” фиксировался тканевым пластырем перпендикулярно у основания хвоста. Время записи составляло 360 с (рис. 1).

Регистрировали неосцилляторные и осцилляторные показатели базального кровотока [4, 6], значения которых рассчитывали с помощью компьютерной программы обработки ЛДФ-граммы LDF 2.20.0.507WL:

– показатель микроциркуляции (ПМ; перф. ед.) – характеризует общую (капиллярную и внекапил-

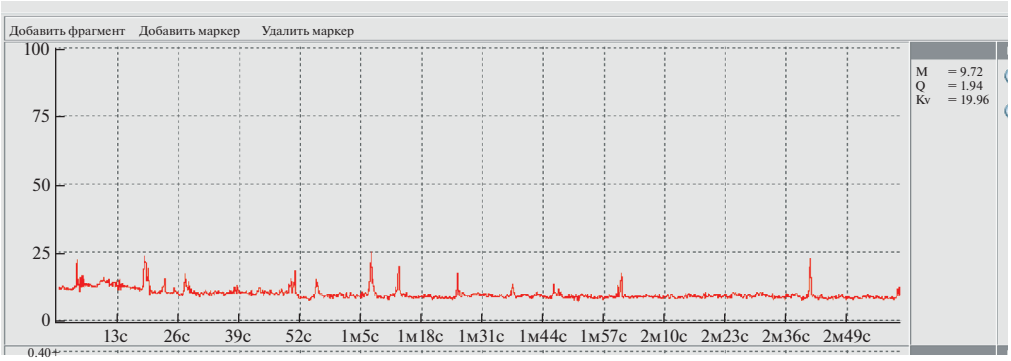

Рис. 1. Пример записи ЛДФ-граммы у крысы контрольной группы.

лярную) усредненную стационарную перфузию микрососудов за время исследования и позволяет проследить ее динамику при реакции кровотока на различные воздействия; определяется количеством и скоростью движения эритроцитов, тканевым гематокритом, а также количеством функционирующих капилляров [7, 8];

– среднее квадратическое отклонение (флакс, СКО, σ; перф. ед.) – средние колебания перфузии относительно среднего арифметического значения ПМ, отражающее среднюю модуляцию кровотока во всех частотных диапазонах [7, 8];

– Кв (%) – коэффициент вариации, характеризующий отношение флакса к среднему уровню перфузии, указывает на процентный вклад вазомоторного компонента в общую модуляцию тканевого кровотока: чем он выше, тем больше вазомоторная активность сосудов [7, 8].

Расчетные параметры М, СКО, Кв дают общую оценку состояния микроциркуляции крови. Более детальный анализ функционирования микроциркуляторного русла можно провести на втором этапе обработки ЛДФ-грамм при исследовании структуры ритмов колебаний кровотока в микроциркуляторном русле [7]. Интенсивность потока крови при этом является результатом суперпозиции основных гемодинамических ритмов [8]. Вейвлет преобразование позволяет точно и корректно проводить анализ нормированных характеристик ритмов колебаний кровотока: эндотелиального, нейрогенного, миогенного, дыхательного и пульсового компонентов [7, 8]. Амплитудно-частотные характеристики осцилляций кожного кровотока приведены в работе [8], однако имеются определенные особенности у крыс [26] (табл. 1).

Ввиду разброса колебаний амплитуд ритмов (А), их нормированные характеристики анализировались по формуле [7, 8]:

$$\text{Анорм} = A/3\sigma, \quad (1)$$

где А – амплитуда колебаний в диапазоне от 0.02–2 Гц. Использование программы LDF 2.20.0.507WL дает возможность автоматически рассчитывать нормированные амплитуды колебаний кровотока к СКО (А/СКО) для каждого диапазона частот.

Расчеты, статистическая обработка и графическое оформление полученных в работе данных по действию тестируемых соединений проводились с использованием программы Microsoft Excel и программного пакета StatSoft\STATISTICA 8.

Применялись непараметрические методы статистики, поскольку распределение значений переменных отличалось от нормального. Достоверность статистических различий между контрольной (внутрибрюшинное введение физиологического раствора) и экспериментальными группами с различными дозами введения ацетилсалициловой кислоты и ацетилсалицилатов $ACCo^{2+}$, $ACZn^{2+}$, $ACNi^{2+}$ и $ACMn^{2+}$ (5 и 10 мг/кг) определяли с помощью критерия Манна–Уитни.

Кроме этого, для анализа эффективности биологического действия соединений ацетилсалициловой кислоты с металлами по сравнению с молекулой предшественницей (ацетилсалициловой кислотой) проводился расчет коэффициента эффективности (КЭ) по формуле:

$$\text{КЭ} = (\text{АСмет.} - \text{АСК})/\text{АСК}, \quad (2)$$

где АС мет. – показатели микроциркуляции, зарегистрированные у животных при введении ацетилсалицилатов металлов Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+};

АСК – показатели микроциркуляции, зарегистрированные у животных при введении ацетилсалициловой кислоты.

АС мет. и АСК являлись результатом усреднения данных измерений на 10 животных в каждой экспериментальной группе. КЭ равен нулю, если эффективность изучаемого соединения (АС мет.) в отношении изучаемого показателя соответствует таковой для АСК.

Таблица 1. Амплитудно-частотные характеристики осцилляций кожного кровотока

Механизмы регуляции микро-кровотока	Названия основных ритмов колебаний тканевого кровотока	Частотный диапазон у крыс	Физиологическое значение
1	**2**	**3**	**4**
Активные	Эндотелиальные колебания, Аэ	0.01–0.076 Гц [9]	Обусловлены секреторной активностью эндотелия, а именно выбросом вазодилататора NO [10].
	Нейрогенные колебания, Ан	0.076–0.2 Гц [9]	Связаны с симпатическими адренергическими (в основном терморегуляторными) влияниями на гладкие мышцы артериол и артериолярных участков АВА [8].
	Миогенные колебания, Ам	0.2–0.74 Гц [9]	Обусловлены внутренней активностью прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол [11].
Пассивные	Дыхательные волны, Ад	0.74–2.0 Гц [9]	Связаны как с дыхательной модуляцией венулярного кровотока, так и с респираторными влияниями на вегетативное обеспечение деятельности сердца [11].
	Пульсовые волны, Ап	2.0–5.0 Гц [9]	Присутствуют как в приносящем звене микрососудистого русла, так и в капиллярах, их амплитуда отражает перфузионное давление в микрососудах, обусловленное как сердечным выбросом, перепадами систолического и диастолического давления, так и влиянием посткапиллярного сопротивления [10].

Примечание: * – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей в контроле; Аэ – амплитуды эндотелиального генеза, Ан – амплитуды нейрогенных колебаний, Ам – амплитуды миогенных колебаний, Ад –амплитуды дыхательных колебаний, Ас – амплитуды пульсовых колебаний. ПМ – показатель перфузии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели микроциркуляции у животных контрольной группы приведены в табл. 2, 3.

Показатели микроциркуляции у животных при действии ацетилсалициловой кислоты. В отличие от показателей кожного микрокровотока у животных контрольной группы при введении АСК крысам в 1-й и 2-й сериях экспериментов в дозах 5 и 10 мг/кг происходили значительные изменения как осцилляторных, так и неосцилляторных показателей (см. табл. 2, 3; рис. 2а, 2б).

Так, в 1-й серии экспериментального исследования введение АСК в дозе 5 мг/кг привело к достоверному увеличению амплитуд колебаний эндотелиального (Аэ, на 50,1%; $p \leq 0.05$), нейрогенного (Ан, на 55.5%; $p \leq 0.05$), дыхательного (Ад, на 71.2%; $p \leq 0{,}05$) ритмов, интегрального показателя микроциркуляции (ПМ, на 78.4%, $p \leq 0.05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных. Аналогичная динамика показателей зарегистрирована и при повышении дозы АСК до 10 мг/кг: Аэ составила 54.9% ($p \leq 0.05$), Ан – 58.4% ($p \leq 0.05$), ПМ – 84.5% ($p \leq 0.05$) по отношению к значениям этих показателей в контрольной группе животных (см. табл. 2; рис. 2а).

Результаты второй серии эксперимента подтвердили полученные в 1-й серии данные, о чем свидетельствовало достоверное повышение амплитуд колебаний эндотелиального (Аэ), нейрогенного (Ан) ритмов и показателя микроциркуляции (ПМ) (табл. 3, рис. 2б). Так, после введения АСК в дозе 5 мг/кг у животных зарегистрировано достоверное увеличение Аэ на 45.2% ($p \leq 0.05$), Ан на 54.4% ($p \leq 0.05$) и ПМ на 80% ($p \leq 0.05$); в дозе 10 мг/кг: Аэ увеличился на 54.9% ($p \leq 0.05$), Ан – на 58.4% ($p \leq 0.05$), ПМ – на 84.5%, ($p \leq 0.05$) по отношению к значениям данных показателей в контрольной группе животных.

Таким образом, воспроизводимость результатов в разных сериях экспериментов повышает степень достоверности полученных результатов в отношении действия АСК на микроциркуляторные параметры. При этом дозовой зависимости в реакции кожного микрокровотока на действие АСК в исследуемых концентрациях не выявлено.

Введение в молекулу АСК металлов Co^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} и Ni^{2+} модифицировало биологическую активность новосинтезированных соединений, что выражалось в значительном изменении исследуемых микроциркуляторных показателей.

Показатели микроциркуляции у животных при действии ацетилсалицилата $\mathbf{Co^{2+}}$**.** Введение животным ацетилсалицилата Co^{2+} сопровождалось увеличением амплитуд колебаний всех компонентов регуляции микрососудистого тонуса (см. табл. 2, рис. 2а).

Таблица 2. Показатели кожной микроциркуляции животных при действии ацетилсалициловой кислоты (АСК) и ацетилсалицилатов кобальта ($ACCo^{2+}$) и цинка ($ACZn^{2+}$)

Группа/ Group		Осцилляторные показатели					Неосцилляторные показатели		
		Аэ, усл. ед.	Ан, усл. ед.	Ам, усл. ед.	Ад, усл. ед.	Ас, усл. ед.	ПМ, перф. ед.	СКО	Кв
Контроль (1)		3.2 ± 0.3	3.5 ± 0.4	3.1 ± 0.3	2.4 ± 0.2	3.1 ± 0.4	4.0 ± 0.7	3.6 ± 0.2	54.4 ± 0.9
АСК	5 мг/кг (2)	4.8 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$ $p_4 \le 0.05$ $p_6 \le 0.05$	5.4 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$	3.9 ± 0.6	4.1 ± 0.7 $p_1 \le 0.05$	4.4 ± 0.9	7.2 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$ $p_6 \le 0.05$	3.1 ± 0.5	56.7 ± 0.5
	10 мг/кг (3)	5.0 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$ $p_5 \le 0.05$	5.5 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	4.2 ± 0.6	4.2 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$	4.6 ± 0.8	7.3 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	3.1 ± 0.5	57.1 ± 0.7 $p_1 \le 0.05$
$ACCo^{2+}$	5 мг/кг (4)	5.7 ± 0.9 $p_1 \le 0.05$ $p_2 \le 0.05$	5.8 ± 0.9 p_1 ≤ 0.05	5.3 ± 0.95 $p_1 \le 0.05$	5.3 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$	5.7 ± 0.7 $p_1 \le 0.05$	6.2 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$	1.9 ± 0.3 $p_1 \le 0.05$	28.5 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$ $p_2 \le 0.05$
	10 мг/кг (5)	6.9 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$	6.5 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	6.0 ± 0.4 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$	5.0 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	5.2 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$	6.8 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	1.6 ± 0.1 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$	32.8 ± 0.9 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$
$ACZn^{2+}$	5 мг/кг (6)	6.5 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$ $p_2 \le 0.05$	6.5 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$	5.2 ± 0.9 $p_1 \le 0.05$	4.9 ± 0.2 $p_1 \le 0.05$	6.1 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$	7.1 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	4.5 ± 0.5 $p_4 \le 0.05$	61.9 ± 0.9 $p_1 \le 0.05$ $p_2 \le 0.05$ $p_4 \le 0.05$
	10 мг/кг (7)	5.3 ± 0.1 $p_1 \le 0.05$ $p_5 \le 0.05$ $p_6 \le 0.05$	6.0 ± 0.6 $p_1 \le 0.05$	4.7 ± 0.5 $p_1 \le 0.05$	4.3 ± 0.3 $p_1 \le 0.05$	5.2 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$	7.5 ± 0.4 $p_1 \le 0.05$	3.8 ± 0.1 $p_5 \le 0.05$	64.5 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$ $p_5 \le 0.05$

Примечания: M – среднее арифметическое значение, M ± m – ошибка среднего, p_{1-7} – уровень достоверности различий по критерию Манна–Уитни относительно таковых в группах, обозначенных 1–7 соответственно; Аэ – амплитуды эндотелиального генеза, Ан – амплитуды нейрогенных колебаний, Ам – амплитуды миогенных колебаний, Ад –амплитуды дыхательных колебаний, Ас – амплитуды пульсовых колебаний. ПМ – показатель перфузии, СКО – среднее квадратичное отклонение (флакс, СКО, перф. ед.), Кв – коэффициент вариации (КВ, %).

При введении $ACCo^{2+}$ в дозе 5 мг/кг увеличивались амплитуды колебаний всех ритмов: Аэ на 78.6% ($p \le 0.05$), Ан на 66.1% ($p \le 0.05$), Ам на 72.8% ($p \le 0.05$), Ад на 122.5% ($p \le 0.05$), Ас на 80.8%($p \le$ ≤ 0.05) и ПМ на 54.7% ($p \le 0.05$), а также снизились значения неосцилляторных показателей: СКО на 47.8% ($p \le 0.05$) и Кв на 47.7% ($p \le 0.05$) по отношению к значениям данных показателей в контрольной группе животных (см. табл. 2, рис. 2а).

Увеличение дозы $ACCo^{2+}$ до 10 мг/кг привело также к достоверному изменению абсолютно всех исследуемых показателей Мц, а именно: к увеличению Аэ на 114.2% ($p \le 0.05$), Ан на 86.6% ($p \le 0.05$), Ам на 93,9% ($p \le 0,05$), Ад на 111.2% ($p \le 0.05$), Ас на 65% ($p \le 0.05$) и ПМ на 69.4% ($p \le 0.05$) и снижению СКО на 55.1% ($p \le 0.05$) и Кв на 40% ($p \le 0.05$) по отношению к таковым в контрольной группе животных (см. табл. 2; рис. 2а).

При этом достоверных различий в эффектах кожной Мц на введение $ACCo^{2+}$ в дозах 5 и 10 мг/кг не выявлено, наблюдалась лишь тенденция к увеличению всех показателей при увеличении дозы данного соединения.

***Показатели микроциркуляции у животных при действии ацетилсалицилата* Zn^{2+}.** Введение животным ацетилсалицилата Zn^{2+}, также, как и $ACCo^{2+}$, сопровождалось увеличением амплитуд колебаний всех компонентов регуляции микрососудистого тонуса относительно значений исследуемых показателей у животных контрольной группы (см. табл. 2, рис. 2а).

При введении животным ацетилсалицилата Zn^{2+} в дозе 5 мг/кг увеличились Аэ на 102.3% ($p \le$ ≤ 0.05), Ан на 84.5% ($p \le 0.05$), Ам на 68.8% ($p \le$ ≤ 0.05), Ад на 107.9% ($p \le 0.05$), Ас на 95.1% ($p \le$ 0.05), ПМ на 77.9% ($p \le 0.05$), Кв на 13.7% ($p \le 0.05$) по отношению к значениям данных показателей в контрольной группе животных.

Увеличение дозы данного соединения до 10 мг/кг привело к несколько меньшему росту значений

Таблица 3. Показатели кожной микроциркуляции животных при действии ацетилсалициловой кислоты (АСК) и ацетилсалицилатов марганца ($ACMn^{2+}$) и никеля ($ACNi^{2+}$)

Группа		Осцилляторные показатели					Неосцилляторные показатели		
		Аэ, усл. ед.	Ан, усл. ед.	Ам, усл. ед.	Ад, усл. ед.	Ас, усл. ед.	ПМ, перф. ед.	СКО	Кв
Контроль(1)		6.3 ± 0.7	15.3 ± 1.6	16.6 ± 1.2	13.5 ± 0.8	9.4 ± 0.7	8.0 ± 0.5	3.9 ± 0.4	49.7 ± 5.7
АСК	5 мг/кг (2)	9.2 ± 1.8 $p_1 \le 0.05$	23.7 ± 1.6 $p_1 \le 0.05$	21.3 ± 1.5	23.2 ± 0.9 $p_1 \le 0.05$	13.3 ± 4.0	14.4 ± 0.7 $p_1 \le 0.05$	3.3 ± 0.3 $p_1 \le 0.05$	51.7 ± 5.8
	10 мг/кг (3)	9.9 ± 1.2 $p_1 \le 0.05$	24.3 ± 0.4 $p_1 \le 0.05$	22.7 ± 0.8	23.7 ± 0.9 $p_1 \le 0.05$	13.8 ± 1.5	14.8 ± 0.3 $p_1 \le 0.05$	3.4 ± 0.3 $p_1 \le 0.05$	52.3 ± 9.9
$ACMn^{2+}$	5 мг/кг (4)	11.2 ± 2.1 $p_1 \le 0.05$	13.0 ± 1.3	15.6 ± 1.6	13.5 ± 0.6 $p_5 \le 0.05$	11.6 ± 0.9	5.7 ± 0.5 $p_6 \le 0.05$ $p_5 \le 0.05$	2.3 ± 0.3	40.3 ± 4.8 $p_6 \le 0.05$
	10 мг/кг (5)	13.4 ± 1.4 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$	16.1 ± 1.3	11.9 ± 1.5 $p_7 \le 0.05$	9.5 ± 1.2 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$ $p_4 \le 0.05$ $p_7 \le 0.05$	8.1 ± 1.5	11.1 ± 0.8 $p_1 \le 0.05$ $p_3 \le 0.05$ $p_4 \le 0.05$ $p_7 \le 0.05$	2.7 ± 0.9	24.5 ± 8.5
$ACNi^{2+}$	5 мг/кг (6)	11.1 ± 1.3 $p_1 \le 0.05$	17.8 ± 3.1	16.4 ± 3.5	10.8 ± 1.3	10.0 ± 1.3	9.5 ± 0.4 $p_2 \le 0.05$	1.5 ± 0.2 $p_1 \le 0.05$	16.5 ± 3.4 $p_1 \le 0.05$ $p_2 \le 0.05$ $p_4 \le 0.05$
	10 мг/кг (7)	9.5 ± 0.8	17.0 ± 1.9 $p_3 \le 0.05$	17.6 ± 1.3 $p_3 \le 0.05$ $p_5 \le 0.05$	13.220.8 $p_5 \le 0.05$	9.2 ± 0.7 $p_3 \le 0.05$	9.0 ± 1.2 $p_3 \le 0.05$	2.0 ± 0.3	24.1 ± 5.0

Примечания: те же, что в табл. 1.

всех показателей Мц, однако они были достоверно выше таковых в контроле: Аэ на 65.7% ($p \le 0.05$), Ан на 72.4% ($p \le 0.05$), Ам на 53.7% ($p \le 0.05$), Ад на 80.9% ($p \le 0.05$), Ас на 65.4% ($p \le 0.05$), ПМ на 86.7% ($p \le 0.05$) и Кв на 18.4% ($p \le 0.05$).

При этом достоверное различие в эффектах кожной Мц на введение $ACZn^{2+}$ в дозах 5 и 10 мг/кг выявлено только для амплитуды эндотелиального ритма, которая в дозе 10 мг/кг снизилась на 18.5% ($p \le 0.05$) по сравнению с таковой, зарегистрированной у животных при инъекции $ACZn^{2+}$ в дозе 5 мг/кг. Для остальных показателей Мц наблюдалась лишь тенденция к уменьшению их значений при увеличении дозы данного соединения.

***Показатели микроциркуляции у животных при действии ацетилсалицилата* Mn^{2+}.** При введении животным ацетилсалицилата Mn^{2+} в дозе 5 мг/кг происходило достоверное увеличение только Аэ на 75.8% ($p \le 0,05$) по отношению к значению этого показателя в контрольной группе животных. При увеличении дозы $ACMn^{2+}$ до 10 мг/кг наблюдалось максимальное (на 110.6%; $p \le 0.05$) увеличение Аэ по отношению к таковому в контрольной группе животных. Данный эффект сопровождался снижением Ад на 29.1% ($p \le 0.05$) и увеличением ПМ на 38% ($p \le 0.05$) относительно значений в контрольной группе животных (см. табл. 3; рис. 2б). Причем эти же показатели имели и достоверные отличия от значений таковых в группе животных, которым вводили это соединение в дозе 5 мг/кг: амплитуда дыхательного ритма снизилась на 29.4% ($p \le 0.05$), а ПМ вырос на 91.7% ($p \le 0.05$).

Следовательно, в отличие от АСК и $ACZn^{2+}$, эффекты Мц на введение $ACMn^{2+}$ имели дозовую зависимость.

***Показатели микроциркуляции у животных при действии ацетилсалицилата* Ni^{2+}.** При введении $ACNi^{2+}$ в дозе 5 мг/кг отмечались только увеличение Аэ на 75.1% ($p \le 0.05$) и снижение неосцилляторных показателей базального кровотока: СКО – на 62.3% ($p \le 0.05$) и Кв – на 66.7% ($p \le 0.05$) соответственно по отношению к значениям данных показателей в контрольной группе животных.

При увеличении дозы ацетилсалицилата Ni^{2+} до 10 мг/кг достоверных изменений показателей микроциркуляции относительно значений изученных показателей в контроле не происходило (см. табл. 3; рис. 2б).

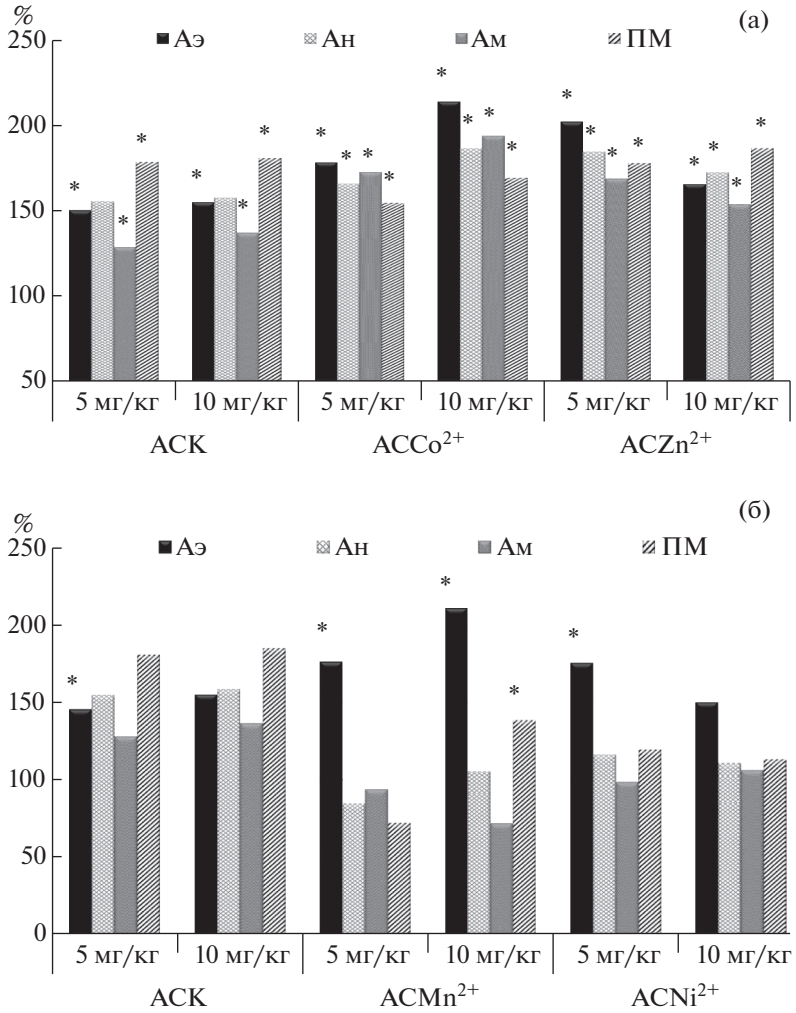

Рис. 2. Изменения показателей кожной микроциркуляции у животных при действии ацетилсалициловой кислоты (АСК) и ацетилсалицилатов кобальта ($ACCo^{2+}$) и цинка ($ACZn^{2+}$) (а), никеля ($ACNi^{2+}$) и марганца ($ACMn^{2+}$) (б) в концентрации 5 мг/кг и 10 мг/кг (в % относительно значений в контрольной группе животных, принятых за 100%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показал анализ результатов исследования, введение животным АСК в дозах 5 и 10 мг/кг вызвало изменение кожной микроциркуляции, что выражалось в достоверном изменении параметров ЛДФ-граммы, а именно в повышении амплитуд колебаний эндотелиального (Аэ), нейрогенного (Ан), дыхательного ритмов и интегрального показателя микроциркуляции (ПМ) относительно значений этих показателей в контроле.

Поскольку известно, что увеличение амплитуды волн эндотелиального генеза синхронизировано с периодическим релизингом оксида азота (NO) эндотелием сосудов [7], то повышение данного показателя свидетельствует об увеличении секреции NO эндотелием и, как следствие, развитии эндотелий-зависимой вазодилатации. Изменение амплитуд колебаний ЛДФ-граммы в нейрогенном диапазоне (Ан) связано с симпатическими адренергическими влияниями на гладкие мышцы артериол и артериолярных участков артерио-венулярных анастомозов [7] и отражает снижение периферического сопротивления в данных областях микрорусла [8]. Следовательно, увеличение данного показателя, свидетельствует о том, что при действии АСК происходит снижение симпатических адренергических влияний на гладкомышечные клетки артериол и артериолярных участков артерио-венулярных анастомозов. Дыхательные ритмы (Ад) связаны с дыхательной модуляцией венулярного кровотока и с респираторными влияниями на вегетативное обеспечение деятельности сердца [8].

Данные изменения микрогемодинамики нашли свое отражение в увеличении неосцилляторных показателей базального кровотока. Так, достоверное увеличение ПМ указывает на увеличение перфузии крови при действии АСК, а увеличение Кв

свидетельствует об активации вазомоторного контроля тонуса микроциркуляторного русла [7].

В целом, можно заключить, что при введении животным АСК наблюдалось достоверное изменение активности практически всех компонентов регуляции микрососудистого тонуса (за исключением амплитуды ритмов миогенного генеза), что выражалось в увеличении эндотелий-зависимой вазодилатации, снижении периферического сопротивления, увеличении притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшении венулярного оттока. Данные изменения в регуляции Мц могут свидетельствовать о развитии гиперемии микрососудов кожи. При этом дозовой зависимости в реакции кожного микрокровотока на действие АСК в исследуемых концентрациях не выявлено.

Введение в молекулу АСК металлов Co^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} и Ni^{2+} модифицировало биологическую активность новосинтезированных соединений, что выражалось в значительном изменении параметров кожной микрогемодинамики животных.

Действительно, сравнительный анализ эффективности координационных соединений с исходным веществом АСК показал, что при действии на животных АСCo^{2+} происходит более существенный рост амплитуд эндотелиального компонента регуляции микроциркуляции как в дозе 5 мг/кг (на 18.9%; $p \leq 0{,}05$), так и в дозе 10 мг/кг (на 38.1%; $p \leq 0.05$), миогенного ритма в дозе 10 мг/кг (на 41.2%; $p \leq 0{,}05$), а также снижение Кв как в дозе 5 мг/кг (на 50%; $p \leq 0.05$), так и в дозе 10 мг/кг (на 42.6%; $p \leq 0.05$) и СКО в дозе 10 мг/кг (на 47.1%; $p \leq 0.05$).

Подтверждением этого является коэффициент эффективности данного соединения по сравнению с АСК (рис. 3а, 3б), который продемонстрировал значительное увеличение всех осцилляторных показателей и снижение неосцилляторных относительно вещества-предшественника. Причем данный эффект имел дозозависимый характер, поскольку в дозе 5 мг/кг коэффициент для Аэ составил 0.18, а в дозе 10 мг/кг – 0.38.

Таким образом, при введении АСCo^{2+} в реакцию Мц на данное вещество включаются не только регуляторные механизмы, выявленные при введении АСК, но и отличные. Так, увеличение амплитуд миогенных ритмов (Ам) отражает снижение тонуса прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол [7]. Поскольку известно [8], что ритмы данного диапазона обусловлены колебаниями концентрации Ca^{2+} через мембраны мышечных клеток, следовательно, повышение Ам свидетельствует о снижении тонуса прекапилляров вследствие развития Ca^{2+}-зависимой мышечной релаксации. Известно, что АСК может приводить к подавлению мобилизации Ca^{2+} из депо [9]. Вероятно, что уменьшение Са-зависимого тонуса прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол при действии АСК может быть обусловлено уменьшением кальциевого компонента мышечного сокращения.

Кроме того, под влиянием АСCo^{2+}происходило увеличение амплитуд пульсовых колебаний, а данный показатель отражает перфузионное давление в микрососудах, обусловленное как сердечным выбросом, перепадами систолического и диастолического давления, так и влиянием посткапиллярного сопротивления [8]. Следовательно, увеличение данного показателя свидетельствует об увеличении притока артериальной крови в микрорусло.

На фоне увеличения осцилляторных выявлено снижение неосцилляторных показателей базального кровотока. В частности, снижение СКО указывает на уменьшение перфузии и модуляции кровотока во всех частотных диапазонах [8], а уменьшение Кв – о снижении вазомоторного контроля тонуса микроциркуляторного русла [7]. Причем следует заметить, что снижение Кв, как правило, связано не только с ослаблением активных механизмов контроля, но и уменьшением энергетики колебательного процесса [8].

Следовательно, в целом, вазотропный эффект АСCo^{2+} сходен с таковым у АСК и выражается в развитии вазодилатации и гиперемии. Однако, в отличие от АСК, ацетилсалицилат кобальта в большей степени увеличивает метаболическую активность эндотелия и снижает тонус прекапиллярных метартериол вследствие развития Ca^{2+}-зависимой мышечной релаксации (увеличение Ам), но при этом значительно уступает АСК в способности модуляции кровотока во всех частотных диапазонах (снижение СКО) и активации вазомоторного контроля тонуса микроциркуляторного русла (снижение Кв).

Введение животным ацетилсалицилата Zn^{2+}, также, как и АСCo^{2+}, сопровождалось изменением всех изученных показателей микрососудистого тонуса, за исключением СКО (см. табл. 2, рис. 2а). Однако, по сравнению с АСCo^{2+}, введение животным АСZn^{2+} в дозе 10 мг/кг привело к меньшему росту эндотелиального компонента Мц (на 23.2%; $p \leq 0.05$) и существенному возрастанию СКО и Кв ($p \leq 0.05$) (см. табл. 2, рис. 2а).

По сравнению с АСК, при действии на животных АСZn^{2+} происходило более существенное изменение эндотелиального компонента регуляции микроциркуляции (на 34%; $p \leq 0.05$) в дозе 5 мг/кг и увеличение Кв в дозе 5 мг/кг (на 9%; $p \leq 0.05$) и 10 мг/кг (на 13%; $p \leq 0.05$). Кроме того, в отличие от АСК, достоверно повышались амплитуды Ам и Ас относительно значений данных показателей в контроле (см. рис. 2а).

Коэффициент эффективности АСZn^{2+}по сравнению с АСК демонстрирует повышение всех ос-

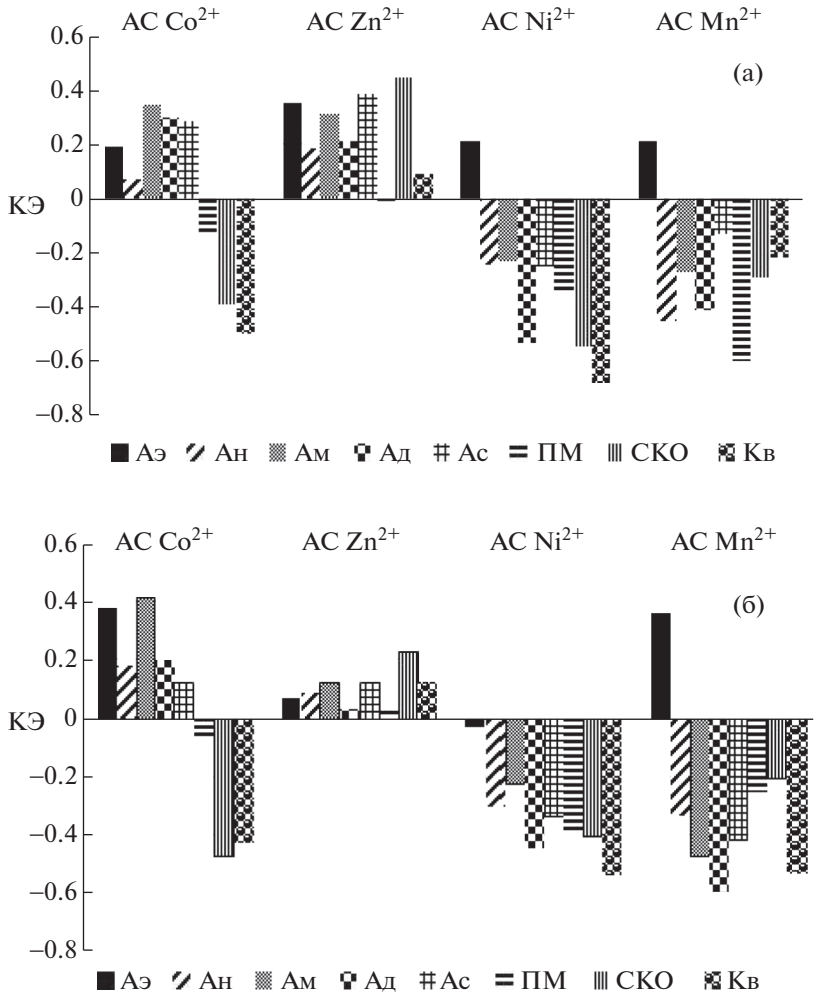

Рис. 3. Коэффициент эффективности (КЭ) показателей микроциркуляции, зарегистрированных у животных при введении ацетилсалицилатов металлов Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+} в сравнении с показателями микроциркуляции при введении животным ацетилсалициловой кислоты в дозах 5 мг/кг (а) и 10 мг/кг (б).

цилляторных и неосцилляторных показателей Мц относительно исходного вещества, что особенно проявляется в дозе 5 мг/кг (см. рис. 3а). При этом КЭ ПМ равен нулю, а следовательно, не отличается от значений данного показателя при действии исходного вещества АСК. Необходимо отметить, что КЭ для $ACZn^{2+}$ демонстрирует отличную картину по сравнению с КЭ $ACCo^{2+}$ (см. рис. 3а, 3б).

Таким образом, $ACZn^{2+}$, как и исходное вещество АСК, приводит к развитию вазодилатации и гиперемии, однако, в отличие от АСК, данный эффект обусловлен увеличением метаболической активности эндотелия, снижением симпатических адренергических влияний на гладкомышечные клетки артериол и артериолярных участков артерио-венулярных анастомозов, уменьшением Са-зависимого тонуса прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол, увеличением притока артериальной крови в микрорусло и активацией вазомоторного контроля тонуса сосудов.

Введение в молекулу АСК Ni^{2+} приводит к другим эффектам. Так, при введении ацетилсалицилата Ni^{2+}в дозе 5 мг/кг было зарегистрировано достоверное снижение ПМ на 33.2% ($p \leq 0.05$) и Кв – на 68.1% ($p \leq 0{,}05$), а в дозе 10 мг/кг снижение Ан – на 29.7% ($p \leq 0.05$), Ам – на 22.5% ($p \leq 0.05$), Ас – на 33.5% ($p \leq 0.05$) и ПМ – на 37.5% ($p \leq 0.05$) относительно значений этих показателей в группе животных, получавших инъекции АСК в соответствующих дозах (см. табл. 3).

КЭ данного соединения ярко демонстрирует снижение модуляции тканевой микрогемодинамики во всех частотных диапазонах, за исключением незначительного увеличения метаболической активности эндотелия в дозе 5 мг/кг.

Анализ “структура-эффект” показал, что введение в структуру $ACNi^{2+}$приводит к дозозависимому

снижению перфузии тканей и уменьшению гиперемии, индуцированной АСК, причем в дозе 10 мг/кг это происходит за счет снижения активности всех механизмов регуляции микроциркуляции, кроме ритмов эндотелиального и дыхательного генеза.

В целом вазотропный эффект $ACNi^{2+}$ заключается в увеличении метаболической активности эндотелия и снижении модуляции микрокровотока, причем данный эффект проявляется только в дозе 5 мг/кг, а в дозе 10 мг/кг данное соединение не эффективно относительно показателей Мц.

Координация АСК с Mn^{2+}привела к значительному увеличению Аэ на фоне незначительных изменений остальных показателей. Относительно значений в группе животных, получавших инъекции АСК, введение крысам ацетилсалицилата Mn^{2+}в дозе 5 мг/кг не привело к достоверным изменениям показателей Мц. Однако в дозе 10 мг/кг зарегистрировано достоверное увеличение Аэ на 35.8% ($p \leq 0.05$) на фоне снижения показателей Ад на 59.6% ($p \leq 0,05$), ПМ на 23,6% ($p \leq 0.05$) (см. табл. 2, рис. 3а). При этом диаграмма КЭ $ACMn^{2+}$ очень сходна с таковой для КЭ $ACNi^{2+}$ за исключением значительного роста КЭ амплитуды колебаний эндотелиального генеза при введении $ACMn^{2+}$ в дозе 10 мг/кг. Причем Ам и Ад достоверно ниже, а ПМ, напротив, выше значений этих показателей при действии $ACNi^{2+}$ в той же дозе (см. рис. 3б).

Таким образом, можно заключить, что $ACMn^{2+}$, также как и $ACNi^{2+}$, модулирует вазотропные эффекты, ингибируя практически все звенья регуляции микроциркуляции. Этот факт можно расценивать как предотвращение развития гиперемии, наблюдаемой при действии АСК.

Как показали результаты исследования, координация металлов Co^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} и Ni^{2+}в структуру АСК изменяет способность молекулы-предшественницы влиять на периферическую микроциркуляцию, что является существенным свойством для соединений, применяемых с целью профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. При этом $ACCo^{2+}$и $ACZn^{2+}$ приводят к развитию вазодилатации и гиперемии, которая по некоторым параметрам превосходит таковую при АСК, а при введении $ACMn^{2+}$ и $ACNi^{2+}$, наоборот, к снижению практически всех показателей и ингибированию гиперемии.

Таким образом, выбранный нами подход в создании новых координационных соединений, в которых помимо лиганда, обладающего биоактивными свойствами, присутствует переходный металл-микроэлемент, позволил получить новые соединения, модулирующие имеющиеся биологические свойства АСК и проявляющие новые.

Экспериментальные данные, полученные в наших исследованиях, подтверждают литературные, в которых показано, что в процессе комплексообразования отмечается не только появление новых свойств производных веществ, но и усиление определенных эффектов, которые свойственны молекулам предшественницам – салицилатам [12–14]. Например, установлено, что АСТ цинка проявляют более выраженный, чем АСК противовоспалительный эффект на каолиновой модели воспаления у крыс Вистар (все дозы по 50 мг/кг) [15], в формалиновом тесте у крыс (40 мг/кг внутрибрюшинно) [16], обладая значительно меньшим эрозивным влиянием на слизистую желудка [17]. Причем этот эффект увеличивался в ряду ацетилсалицилатов никель-кобальт-цинк-медь.

В последние годы установлено, что комплексные соединения АСК с металлами, а именно цинк содержащие, зарекомендовали себя и как клинически значимые антиоксиданты. Например, в экспериментах [18] на крысах показано, что аспиринат цинка (5 дней, 100 мг/кг) оказывает кардиопротективное действие в модели изопреналинового инфаркта за счет предотвращения снижения уровня мРНК супероксиддисмутазы 1 (СОД 1) [18]. Последний эффект связан со строением СОД1, которая содержит в активном центре атом меди и для стабилизации структуры белка ей необходим цинк [19]. Установлено, что не только СОД1, но и многие другие ферменты имеют в своей структуре атомы металлов и/или способны связываться с ними: никель (СОД, глиоксилаза I и др.) [20], марганец (СОД, каталаза, аргиназа и др.) [21], кобальт (карбоксипептидаза, карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа и др.) [22], а цинк регулирует активность более 300 различных ферментов (оксидоредуктазы, лиазы, гидролазы, трансферазы и т.д.) [23]. Некоторые из указанных ферментов принимают важное участие в функционировании антиоксидантной и сердечно-сосудистой систем организма, среди которых можно отметить аргиназу II как перспективную фармакологическую мишень в коррекции эндотелиальной дисфункции и целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний [24]. Возможность комплексообразования салициловой кислоты с переходными металлами позволяет предположить, что определенные биологические эффекты салицилатов могут быть связаны с взаимодействием с металлоферментами [25]. Было установлено, что салицилаты и АСК способны изменять активность ряда ферментов [26], в том числе и аргиназы [27].

Таким образом, полученные новые координационные соединения являются перспективными для дальнейших исследований их биологического и фармакологического действия. Результаты этих экспериментов позволяют в дальнейшем более глубоко исследовать терапевтический потенциал АСТ металлов, создавая новые соединения для анализа.

Исследование выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием "Экспериментальная физиология и биофизика" кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (структурное подразделение) ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского"

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-70142.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Антропов Ю.Ф., Шевченко Ю.С.* Психосоматические расстройства и патологические привычные действия у детей и подростков. М.: Ин-т психотерапии. 297. 1999. [*Antropov Ju.F., Shevchenko Ju.S.* Psihosomaticheskie rasstrojstva i patologicheskie privychnye dejstvija u deteji podrostkov. – M.: In-tpsihoterapii. 297. 1999. (In Russ.)].
2. *Вейн А.М.* Болевые синдромы в неврологической практике. МЕД-пресс-информ, 368 с. 2001. [*Vejn A.M.* Bolevye sindromy v nevrologicheskoj praktike. MED-press-inform, 368 s. 2001 (In Russ.)].
3. *Гилман А.Г.* Клиническая фармакология. Т. 4. М.: Практика. 336. 2006. [*Gilman A.G.* Klinicheskaja farmakologija. T. 4. M.: Praktika. 336. 2006. (In Russ.)].
4. *Cheretaev I.V., Ravaeva M.Yu., Dzheldubaeva E.R., Chuyan E.N., Shulgin V.F., Sheichmambetov N., Palaevskaya M.V.* Comparative analysis of analgesic activity of 1-hydroxy-1,1-ethylidendiphosphone acid, bis (2-pyridyl-1,2,4-triazolyl3) propane and their adduct in rats (part 2). Scientific notes of the Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky. Biology, Chemistry. 5 (71): 204–206. 2019.
5. *Levyh A.Je., Mamchur V.I.* Acetylsalicylic acid as an effective and safe basis for antiplatelet therapy. Hypertension. 6 (44): 57–63. 2015.
6. *Чуян Е.Н., Трибрат Н.С., Ананченко М.Н., Раваева М.Ю.* Тканевая микрогемодинамика: влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона: монография. Симферополь: ИТ “АРИАЛ”, 2017. с. 445. [*Chujan E.N., Tribrat N.S., Ananchenko M.N., Ravaeva M.Ju.* Tkanevaja mikrogemodinamika: vlijanie nizkointensivnogo jelektromagnitnogo izluchenija millimetrovogo diapazona: monografija. Simferopol’: IT “ARIAL”, 2017. s. 445 (In Russ.)].
7. *Козлов В.И., Мач Э.С., Литвин Ф.Б., Терман О.А., Сидоров В.В.* Метод лазерной допплеровской флоуметрии. Пособие для врачей. 22. 2001. [*Kozlov V.I., Mach Je.S., Litvin F.B., Terman O.A., Sidorov V.V.* Metod lazernoj dopplerovskoj floumetrii. Posobie dlja vrachej. 22. 2001. (In Russ.)].
8. *Крупаткин А.И., Сидоров В.В.* Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: руководство для врачей. М.: Медицина. 254. 2005. [*Krupatkin A.I., Sidorov V.V.* Lazernaja dopplerovskaja floumetrija mikrocirkuljacii krovi: rukovodstvo dlja vrachej. M.: Medicina. 254. 2005. (In Russ)].
9. *Humeau A., Koïtka A., Abraham P.* Time-frequency analysis of laser Doppler flowmetry signals recorded in response to a progressive pressure applied locally on anaesthetized healthy rats. Phys Med Biol. 49 (5): 843–857. 2004.
10. *Stefanovska A.* Physics of the human cardiovascular system. [Текст] / A. Stefanovska, M. Bracic. Contemporary Physics. 40 (1): 31–35. 1999.
11. *Bollinger A.* Evaluation of Flux Motion in Man by the Laser Doppler Technique [Текст] / A. Bollinger, U. Hoffmann, U. K. Franzesc. Blood vessels. 28: 21–26. 1991.
12. *Sokolik J., Tumova I., Blahova M. et al.* Anti-inflammatory activities of copper (II) and zinc (II) 3,6-dimetylsalicylates and their equimolar mixture. Acta Facult. Farm. Univ.comenianae. 53 (1): 224–228. 2006.
13. *Ignatyev I., Kondratenko Y., Fundamensky V., Kochina T.* Synthesis and characterization of cobalt (II) complexes with triethanolamine and succinate and/or nitrate anions. J. Transition Metal Chemistry. 43 (2): 127–136. 2018.
14. *Кондратенко Ю.А.* Синтез, строение и термическое поведение комплекса {Co2[N (CH2CH2OH)3]2Cl2}Cl2. Журн. общ. хим. 87 (4): 698–700. 2017. [*Kondratenko Ju.A.* Sintez, stroenie i termicheskoe povedenie kompleksa {Co2[N (CH2CH2OH)3]2Cl2}Cl2. ZhOH. 87 (4): 698–700. 2017. (In Russ.)].
15. *Chohan Z.H., Iqbal M.S., Iqbal H.S., Scozzafava A., Supuran C.T.* Transition metal acetylsalicylates and their anti-inflammatory activity. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. 17 (2): 87–91. 2002.
16. *Яковчук Т.В., Катюшина О.В., Хусаинов Д.Р. и др.* Противовоспалительная активность солей салициловой и ацетилсалициловой кислот. Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. Т. 24, 2 (63): 332–338. 2011. [*Jakovchuk T.V., Katjushina O.V., Husainov D.R. et al.* Protivovospalitel’naja aktivnost’ solej salicilovoji acetilsalicilovoj kislot. Uchenye zapiski Krymskogo federal’nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologija. Himija. T. 24, 2 (63): 332–338. 2011. (In Russ.)].
17. *Xue S., Chen S., Wang M., Chen J.* Antipyretic and analgesic effects of zinc acetylsalicylateюJournal of Shenyang Pharmaceutical University. 12 (2): 133. 1995.
18. *Korkmaz S., Atmanli A., Li S., Radovits T., Hegedűs P., Barnucz E., Hirschberg K., Loganathan S., Yoshikawa Y., Yasui H., Karck M., Szabó G.* Superiority of zinc complex of acetylsalicylic acid to acetylsalicylic acid in preventing postischemic myocardial dysfunction. Exp. Bio. Med. 240 (9): 1247–1255. 2015.
19. *Sea K., Sohn S.H., Durazo A., Sheng Y., Shaw B.F., Cao X., Taylor A.B., Whitson L.J., Holloway S.P., Hart P.J., Cabelli D.E., Gralla E.B., Valentine J.S.* Insights into the role

of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 290 (4): 2405–2418. 2015.

20. *Boer J.L., Mulrooney S.B., Hausinger R.P.* Nickel-dependent metalloenzymes. Archives of biochemistry and biophysics. 544: 142–152. 2014.
21. *Christianson D.W.* Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. Progress in biophysics and molecular biology. 67 (2–3): 217–252. 1997.
22. *Lindskog S.* Cobalt (II) in metalloenzymes. A reporter of structure-function relations. Biochemistry. – Springer, Berlin, Heidelberg. 153–196. 1970.
23. *McCall K.A., Huang C., Fierke C.A.* Function and mechanism of zinc metalloenzymes. The Journal of nutrition. 130 (5): 1437–1446. 2000.
24. *Якушев В.И., Покровский М.В., Бесхмельницына Е.А., Мясищева О.В., Литвинова А.С., Кривошпанова И.И., Демченко С.А.* Аргиназа II – новая мишень для создания эндотелиопротекторов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. № 1: 26–30. 2015. [*Jakushev V.I. Pokrovskij M.V., Beshmel'nicyna E.A., Myasishcheva O.V., Litvinova A.S., Krivoshpanova I.I., Demchenko S.A.* ArginazaI I – novaja mishen' dlja sozdanijaj endotelioprotektorov. Vedomosti Nauchnogo centraj ekspertizy sredstv medicinskogo primenenija. № 1: 26–30. 2015. (In Russ.)].
25. *Foye W.O. Baum M.D., Williams D.A.* Stability of metal complexes of salicylic acid derivative sandanalogs III. 3, 6 dialkylderivativesandpyridine analogs. J. Pharmaceutical Sci. 56 (3): 332–336. 1967.
26. *Belhassena I., Nouari W., Messaoud A., Nouar M., Brahimi M., Chawki Lamara S.-A., Aribi A.* Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. International Immunopharmacology. 83: 106349. 2020.
27. *Grisolia S., Mendelson J., Diederich D.* Inactivation of metalloenzymes by salicylate. FEB Sletters. 11 (2): 140–143. 1970.

INDICATORS OF TISSUE MICROHEMODYNAMICS IN RATS EXPOSED TO ACETYL SALICYLIC ACID AND METAL SALICYLATES

M. Yu. Ravaeva[a,#], E. N. Chuyan[a], I. V. Cheretaev[a], I. S. Mironyuk[a], and T. V. Grishina[a]

[a] *Taurida Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

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

The effect of acetylsalicylic acid and acetylsalicylates of (Co^{2+}), zinc (Zn^{2+}), nickel (Ni^{2+}) and manganese (Mn^{2+}) at doses of 5 and 10 mg/kg on rat tissue microhemodynamics was studied. It was established that the coordination compounds of metal salicylates demonstrate novel properties and a more pronounced biological effect compared to a parent compound, acetylsalicylic acid. This favors further search for biological and pharmacological activities among newly synthesized coordination compounds of acetylsalicylic acid.

Keywords: acetylsalicylic acid, coordination compounds of acetylsalicylates, indicators of tissue microhemodynamics, laser doppler flowmetry

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 1, с. 83–89

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МАРКИРОВАНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМИ ВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ ГИППОКАМПА МЫШИ НЕЙРОНОВ МЕЗЕНЦЕФАЛИЧЕСКОГО ТЕГМЕНТУМА МОЛОДИ ТИХООКЕАНСКОЙ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

© 2021 г. Е. В. Пущина[1,2,*], И. А. Капустянов[1], Е. В. Шамшурина[1], А. А. Вараксин[1]

[1] *Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток, Россия*

[2] *Институт физиологии им. Богомольца Национальной академии наук Украины, Киев, Украина*

**e-mail: puschina@mail.ru*

Поступила в редакцию 09.10.2020 г.
После доработки 31.10.2020 г.
Принята к публикации 02.11.2020 г.

В настоящее время данные о наличии аденовирусных рецепторов у рыб весьма ограничены. В работе использовали мышиные рекомбинантные аденовирусные векторы (rAAV) с кальциевым сенсором GCaMP6m, которые обычно используются для дорсального CA1 гиппокампа мышей, но ранее не применялись для доставки генов в мозге рыб. Цель работы заключалась в оценке способности маркирования rAAV гиппокампа мышей клеток мозга молоди кеты и последующего определения фенотипа rAAV-маркированных клеток методом конфокальной микроскопии. Доставка гена *in vivo* осуществлялась с помощью внутричерепной инъекции GFP-содержащего вектора непосредственно в область мезенцефалического тегментума годовалой молоди кеты *Oncorhynchus keta*. Оценка уровня инфекционной эффективности была произведена через 1 нед после инъекции вектора. Методом конфокальной сканирующей микроскопии была проведена оценка экспрессии аденоассоциированного вектора в различных зонах тегментума молоди *O. keta* с последующим ИГХ анализом нейроноспецифического протеина HuCD в сочетании с окрашиванием DAPI. Результаты анализа показали колокализацию клеток, экспрессирующих аденовирусный вектор с зеленой флуоресценцией с нейроноспецифическим протеином HuCD с красной флуоресценцией. Результаты свидетельствуют, что клетки тегментума молоди кеты, экспрессирующие AAV, относятся к нейроноспецифичной линии клеток мозга кеты, что свидетельствует о способности гиппокампальных аденовирусов млекопитающих инфицировать нейроны ЦНС рыб. Таким образом, специфичные для гиппокампа AAV млекопитающих могут встраиваться в нейроны мозга рыб с последующей экспрессией вирусных протеинов, и, очевидно, нейроны тегментума молоди кеты содержат гомолог аденовирусного рецептора млекопитающих.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус, аденовирусный вектор большой емкости, система доставки, *Oncorhynchus keta*, тегментум, HuCD

DOI: 10.31857/S0044452921010071

Исследование закономерностей функционирования нейронных сетей в онтогенезе и их способности встраивать новые элементы в течение жизни является актуальным вопросом нейробиологии. Успешное выполнение подобных нейробиологических исследований требует эффективных и точных методов. В связи с этим рекомбинантные аденоассоциированные вирусные векторы (AAV) являются эффективными инструментами, которые можно использовать как для нацеливания, так и для манипулирования определенными подтипами нейронов (определяющихся на основе экспрессии генов, местоположения и связей) и ненейрональных клеток в нервной системе [1].

В нейробиологических исследованиях аденовирусные векторы используются для различных целей, в частности для маркирования отдельных нейронов и нейрональных популяций [2], отслеживания линии нейрональных клеток [3] и модулирования функции нейронов [4]. В качестве модельных животных для перспективных нейрогенных исследований все чаще используются костистые рыбы [5–7]. Подобные исследования актуальны для молекулярной генетики в различных других областях, таких как биология развития [8] и неврология [5, 9]. Таким образом, использование вирусных векторов на рыбах способствует дальнейшему генетическому анализу нейронных функций и исследованиям нейрогенеза у взрослых животных.

GCaMPs – генетически кодируемые показатели кальция, содержащие флуорофор, которые состоят из зеленого флуоресцентного белка (GFP), ассоциированного с кальмодулином и пептидом M13 [10]. После связывания кальция с системой кальмодулин-M13 возникают конформационные изменения в полученном белковом комплексе, что приводит к увеличению флуоресценции GFP. GCaMP6, в частности, является одним из новых генетически кодируемых показателей кальция, с более высоким отношением сигнала к шуму и улучшенной временной кинетикой по сравнению с предыдущими поколениями кальциевых индикаторов [10]. Существует много доступных серотипов аденоассоциированных вирусов (AAV), каждый из которых включает в себя отдельный вирусный белок капсида и обеспечивает различные характеристики трансдукции в пределах мозга [11]. Некоторые серотипы AAV транспортируются по нейрональным проекциям инъецируемого ядра или области мозга [12].

Мы предположили, что инъекция переносимого вектора AAV в тегментальную область молоди кеты *O. keta* приведет к широкому распространению репортерного гена, тем самым охватывая большую область мезенцефалического тегментума, включающую различные типы клеток. Цель работы заключалась в оценке способности маркирования рекомбинантным аденовирусом (rAAV) гиппокампа мышей CA1 клеток мозга молоди кеты *Oncorhynchus keta* и последующем определении фенотипа rAAV-маркированных клеток методом конфокальной микроскопии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе было использовано 10 годовалых особей молоди тихоокеанской кеты *Oncorhynchus keta* в возрасте одного года, с длиной тела 13–15.5 см и массой 45–55 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2019 г. Молодь кеты содержали в аквариуме с аэрируемой пресной водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением в течение суток. Соотношение освещенного и темнового периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм^3, что соответствует нормальному насыщению. Все экспериментальные манипуляции с животными были проведены в соответствии с правилами, регулируемыми уставом ННЦБМ, и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными.

Введение аденовирусного вектора. В работе использовали готовые рекомбинантные аденоассоциированные вирусы гиппокампа мыши AAV1.Camc2a.GCaMP6f.WPRE.bGHpA (Пало-Альто, США). Упаковка, очистка и определение векторных титров были выполнены Стенфордским университетом (Inscopix, США). Рекомбинантные векторы очищали с использованием метода осаждения CsCl, и титры геномной копии были определены, как описано ранее [13]. Титры инъекций были оптимизированы по концентрации и составляли 1.68E + 13 μg/ml, что функционально подтверждено для кальциевой визуализации пирамидных нейронов в дорсальном CA1 гиппокампе мыши.

После анестезии каждому животному в область правого полушария тегментума с помощью шприца Гамильтона вводили 0.2 μl раствора рекомбинантного AAV на PBS (n = 5 для каждой группы). Контрольные животные получали 0.2 μl 0.1 M PBS (n = 5). Непосредственно после нанесения повреждения животных выпускали в аквариум для восстановления и дальнейшего мониторинга.

После внутричерепной инъекции в область мезенцефалического тегментума в течение 1 ч проводили видеомониторинг изменений двигательной и поведенческой активности у рыб в экспериментальной группе. Через 1 нед животные выводились из эксперимента и подвергались эвтаназии методом быстрой декапитации. Головной мозг префиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 M фосфатном буфере (pH 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в том же растворе в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем в течение двух суток промывали в 30%-м растворе сахарозы при 4°C, с пятикратной сменой раствора. Серийные фронтальные срезы мозга кеты толщиной 50 мкм изготавливали с помощью замораживающего микротома (Cryo-star HM 560 MV, Thermo Scientific, США), монтировали на полилизиновые предметные стекла (Биовитрум, Россия).

Иммунофлюоресцентное маркирование. С целью выявления нейроноспецифичного протеина HuCD на срезах мозга, содержащих маркированные AAV клетки, применялось маркирование соответствующими первичными мышиными антителами фирмы Chemicon (clone: AD2.38; Chemicon Billerica, MA, США) в разведении 1:300. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% неиммунной сыворотки лошади, 0.01% Tween 20 (Sigma, США) и 0.1% БСА (Sigma, США). Затем срезы инкубировали с первичными антителами при температуре 4°C в течение 48 ч. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с ослиными вторичными антителами против Ig мыши, конъюгированными с Alexa 546 (Invitrogen, США, разведение 1:300). Для расчета процента иммунопозитивных нейронов, кроме метки к HuCD, производилось окрашивание раствором DAPI ядер всех клеток на срезе (Invitrogen, США, D9542, конечное разведение DAPI 0.01 мкг/мл на PBS).

Таблица 1. Соотношение* HuCD-иммунопозитивных и AAV-маркированных нейронов в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты *O. keta* через 1 неделю после однократного введения аденовирусного вектора

Область мозга	**AAV %**	**HuCD %**	**AAV+HuCD %**
Дорсальная часть гипоталамич. бухты	37.2	80.5	23.3
Дорсолатеральный тегментум	35	87.8	18.5
Посткомиссуральная область	48	81.1	24.4
Дорсомедиальный тегментум	44.1	80	27.5
Мезенцефалическая ретикулярная формация	65	85.7	48.5

*Долю маркированных нейронов определяли как их отношение к общему числу ядер, окрашенных DAPI, которое принимали за 100%.

Негативный контроль проводили при отсутствии первичных антител, препараты заключали в глицерин и оконтуривали с помощью лака.

Микроскопия. В работе для визуализации и проведения морфологического анализа был использован моторизированный инвертированный микроскоп, исследовательского класса с флюооресцентным модулем и приставкой улучшенного контрастирования при работе с люминесценцией Axiovert 200 M с модулем ApoTome (Carl Zeiss, Германия). Для более детального исследования тегментальной области в трехмерном пространстве с использованием мультиспектрального (с несколькими флуорохромами) режима работы исследовали GFP/HuCD/DAPI колокализацию с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 NLO с модулем высокого разрешения Эйрискан (Carl Zeiss, Германия).

Для исследования микрофотографии препаратов и анализ материала осуществляли с помощью программы Axio Vision (Carl Zeiss, Германия). Измерения проводили при использовании объективов с увеличением ×10, ×20, и ×40 в 10 случайно выбранных полях зрения для каждой области исследования. Подсчет количества иммуномаркированных клеток на поле зрения осуществляли при увеличении ×200. Морфометрический анализ параметров клеточных тел (измерение большого и малого диаметров сомы нейронов) проводили с помощью программного обеспечения микроскопа Axio Vision. Подсчет производили в 10 случайно выбранных измеренных областях (1 микроскопическое поле составляло 0.12 мм^2) при 200-кратном увеличении у каждого животного. Среднее определяли путем усреднения пропорций, полученных от пяти животных.

Количественная обработка материала была выполнена с помощью программ “Описательная статистика” Microsoft Excel 2010 и Statistica 12. Плотность распределения и размерные характеристики клеток оценивались с помощью методов вариационной статистики. Для количественной оценки результатов находились средние значения малого и большого диаметров клеток и стандартное отклонение (M ± SD). Для ранжирования маркированных элементов в соответствии с размерными группами все данные по измеренным клеткам/ядрам были разделены на неперекрывающиеся размерные группы (табл. 2) и представлены в виде среднее ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 1 нед. после инъекции аденовирусного вектора в область мезенцефалического тегментума в мозге молоди кеты AAV-маркированные клетки были идентифицированы в передней бухте гипоталамуса, дорсолатеральном тегментуме, посткомиссуральной области, дорсомедиальном тегментуме и мезенцефалической ретикулярной формации (табл. 1).

На рис. 1a–1d представлены Z-стеки, на которых показаны результаты сканирования срезов мозга по различным каналам: окрашивание DAPI среза мозга с указанием области, содержащей GFP/HuCD-маркированные клетки (рис. 1a, пиктограмма). Результаты показали, что AAV встраивались в нейронах и/или ядрах различных типов тегментальной области и идентифицировались по экспрессии GFP-белков. Иммунофлуоресценция наблюдалась главным образом в телах нейронов (рис. 1b). AAV-специфичные для гиппокампа мыши были выбраны для первоначальной оценки векторной трансдукции и биораспределения в области мезенцефалического тегментума молоди кеты. Вектор вводился в средний мозг, расположенный между конечным мозгом и мозжечком молоди кеты в возрасте 1 года, и через 1 неделю визуализировался на трансверсальных срезах мозга с использованием конфокальной микроскопии. В результате окрашивания DAPI на срезах мозга идентифицировались ядра клеток и в некоторых случаях тела небольших нейронов (рис. 1a). Поскольку у молоди кеты в перивентрикулярной зоне тегментума присутствует большое количество незрелых (бластных) форм клеток, характеризующихся высокими ядерно-цитоплазматическими отношениями (крупные ядра и узкий ободок цитоплазмы), то в данном случае при окрашивании DAPI красились

Таблица 2. Морфометрические параметры* маркированных нейронов (M±SD) в мезенцефалическом тегментуме молоди кеты *O. keta* через 1 нед после однократного введения аденовирусного вектора

Область мозга	DAPI размер ядер/клеток мкм	AAV размер ядер/клеток мкм	HuCD размер клеток мкм	AAV+HuCD размер ядер/клеток мкм
Дорсальная часть гипоталамич. бухты	4.9 ± 0.3/3.4 ± 0.4 4.2 ± 0.1/3.1 ± 0.3 3.8 ± 0.1/2.9 ± 0.3 3.1 ± 0.4/2.8 ± 0.2	6.2 ± 0.6/6.2 ± 0.5 4.9 ± 0.3/4.6 ± 0.4 4.5 ± 0.1/3.6 ± 1.1 3.6 ± 0.2/3.1 ± 0.3 2.6 ± 0.4/2.3 ± 0.4	8.7 ± 0.4/6.0 ± 0.8 7.4 ± 0.4/5.8 ± 1.9 6.1 ± 0.3/5.1 ± 0.6 4.9 ± 0.3/4.4 ± 0.1 3.9 ± 0.3/3.4 ± 0.4	6.5 ± 0.2/5.6 ± 0.4 4.8 ± 0.5/4.6 ± 0.6 3.8 ± 0.2/3.2 ± 0.5 3.2 ± 0.2/2.7 ± 0.3
Дорсолатеральный тегментум	4.8 ± 0.3/3.2 ± 0.5 4.2 ± 0.2/3.1 ± 0.3 3.7 ± 0.1/2.8 ± 0.3 3.2 ± 0.2/2.7 ± 0.5	5.9 ± 0.6/4.7 ± 0.2 4.9 ± 0.1/3.6 ± 0.4 4.4 ± 0.1/3.6 ± 0.4 3.6 ± 0.2/2.8 ± 0.3 2.9 ± 0.4/2.6 ± 0.3	5.6 ± 0.3/4.2 ± 0.5 4.7 ± 0.2/3.6 ± 0.4 4.3 ± 0.2/3.3 ± 0.4 3.5 ± 0.2/2.8 ± 0.3	5.5 ± 0.6/4.3 ± 0.8 4.5 ± 0.3/3.8 ± 0.6 3.9 ± 0.1/3.5 ± 0.2
Посткомиссуральная область	5.3 ± 0.2/4.0 ± 0.5 4.5 ± 0.2/3.8 ± 0.4 3.7 ± 0.3/3.4 ± 0.4	8.8 ± 0.4/6.6 ± 0.2 5.2 ± 0.3/3.3 ± 0.8 3.0 ± 0.3/2.3 ± 0.3	7.8 ± 2.1/5.9 ± 2.6 4.6 ± 0.2/3.7 ± 0.4 3.7 ± 0.3/2.8 ± 0.5	5.7 ± 0.4/3.5 ± 0.5 4.6 ± 0.3/3.4 ± 0.4 3.8 ± 0.1/3.2 ± 0.5 3.3 ± 0.4/2.6 ± 0.3
Дорсомедиальный тегментум	7.8 ± 0.4/5.0 ± 0.6 5.9 ± 0.6/4.4 ± 0.5 4.5 ± 0.5/3.6 ± 0.2	10.8 ± 0.3/8.0 ± 0.7 8.7 ± 0.1/6.6 ± 0.5 7.2 ± 0.4/5.5 ± 0.6 5.9 ± 0.5/4.7 ± 0.7 4.5 ± 0.4/3.9 ± 0.6	26.1 ± 1.3/13.4 ± 1.5 11.0 ± 0.7/7.3 ± 2.0 8.3 ± 0.6/6.4 ± 1.2 6.5 ± 0.6/5.2 ± 0.9 5.0 ± 0.1/4.6 ± 0.3	8.3 ± 0.7/6.4 ± 0.8 6.3 ± 0.8/5.1 ± 0.6 4.5 ± 0.2/3.8 ± 0.6
Мезенцефалическая ретикулярная формация	5.4 ± 0.3/3.8 ± 0.3 4.2 ± 0.3/3.3 ± 0.4 3.4 ± 0.3/2.7 ± 0.1	5.8 ± 0.3/4.4 ± 0.7 4.8 ± 0.3/3.9 ± 0.8	5.7 ± 0.4/4.3 ± 0.7 4.7 ± 0.2/3.7 ± 0.7 4.0 ± 0.3/3.5 ± 0.4	5.7 ± 0.5/4.5 ± 0.2 4.4 ± 0.3/4.1 ± 0.4

*Значения большого и малого диаметров ядер либо клеточных тел. Данные ранжированы по убыванию. Размеры маркированных ядер составляли от 3 до 4.5 мкм [20], более крупные элементы представляли клетки различных размерных типов.

как ядра, так и в некоторых случаях небольшие нейроны (рис. 1a*)*. Подобное свойство окрашивания DAPI нейробластов было выявлено также в работах на млекопитающих [14].

Обнаружен четкий сигнал GFP в 44.1% клеток (табл. 1), сосредоточенных в области дорсомедиального тегментума (рис. 1b). Морфометрические параметры (M ± SD) ядер и клеток различных областей среднего мозга, в которых была выявлена экспрессия AAV, приведены в табл. 2. Результаты исследования показывают, что среди маркированных клеток в различных областях среднего мозга преобладали нейроны небольшого размера, а также более мелкие частицы (рис. 1b, 1c). Результаты иммунофлюоресцентного маркирования нейронального протеина HuCD показали локализацию метки в нейронах различного размера (рис. 1c, табл. 2). Исследование наложения Z-стеков маркирования DAPI, GFP и HuCD показало, что в области дорсомедиального тегментума обнаружена колокализация GFP и HuCD в 27. 5% клеток (рис. 1d, табл. 1). В различных областях тегментума соотношение GFP/HuCD клеток отличалось, достигая максимального значения в клетках мезенцефалической ретикулярной формации (табл. 1). Таким образом, колокализация зеленого флюоресцентного протеина и маркера нейрональной специализации была обнаружена во всех областях мезенцефалона, экспрессирующего AAV.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусные векторы представляют большой клинический интерес благодаря их высокой эффективности, особенно когда генетический материал предназначен для достижения ядра. Аденовирус был одним из первых вирусов, которые были адаптированы в качестве вектора генной терапии [15]. Эти вирусы без оболочки, имеющие капсиды икосаэдрической формы размером до 100 нм и линейные двухцепочечные геномы ДНК размером около 36 кб, обеспечивают высокую генетическую стабильность и эффективность инфекции в различных типах клеток [15]. Попав внутрь клетки, вирусные капсиды разлагаются запрограммированным

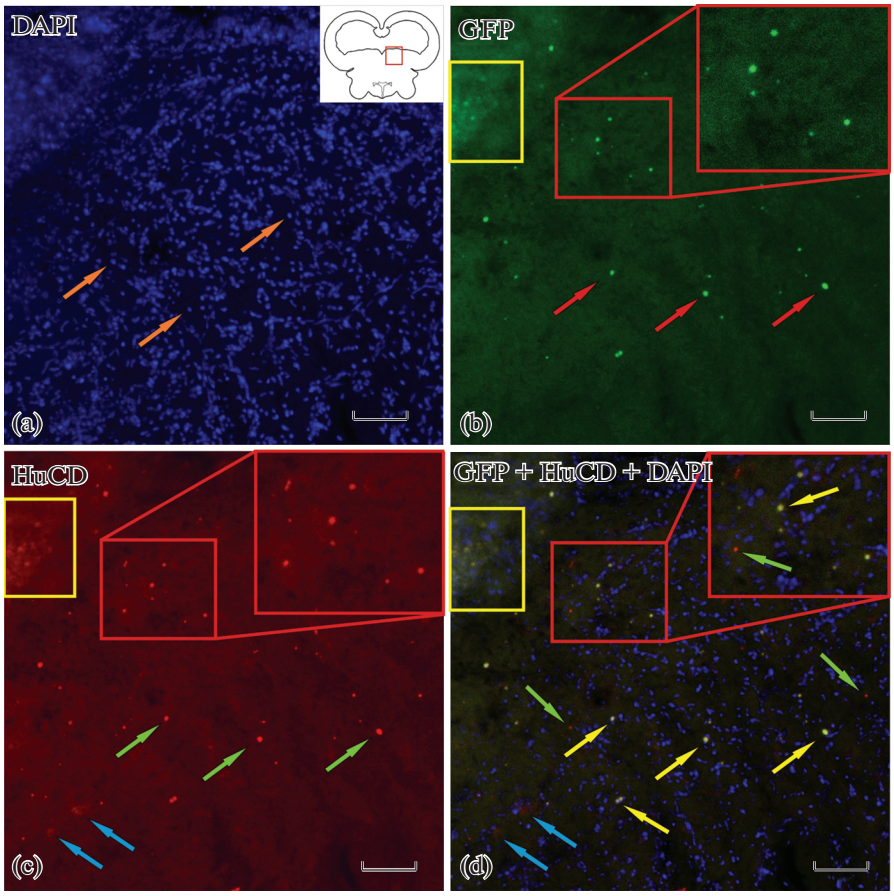

Рис. 1. Z-стеки, демонстрирующие иммуномечение HuCD области дорсомедиального тегментума молоди кеты *Oncorhynchus keta* через 1 неделю после однократного введения AAV. a – окрашивание DAPI, оранжевыми стрелками показаны ядра клеток, в левом верхнем углу на пиктограмме показана схема мезенцефалона с исследуемой областью (в красном квадрате). b – экспрессия зеленого флюоресцентного протеина (GFP) в клетках тегментума (красные стрелки); скопление интенсивно маркированных клеток показано в красном прямоугольнике (увеличенный фрагмент на врезке), в желтом прямоугольнике – умеренно маркированные клетки. c – иммунофлюоресценция протеина HuCD в нейронах тегментума, зелеными стрелками показаны интенсивно маркированные мелкие нейроны, голубыми – умеренно маркированные крупные нейроны, остальные обозначения как на b, d – оптическое наложение трех каналов окрашивания DAPI/GFP/HuCD, показывающее области колокализации GFP/HuCD в нейронах (желтые стрелки). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 200 мкм.

образом и ведут геномы в ядро, где они остаются в эписомальном состоянии.

Результаты настоящего исследования показали, что аденоассоциированный вектор гиппокампа мышей эффективно экспрессируется в различных клетках среднего мозга молоди кеты. Использование конфокальной микроскопии прямым методом показывает, что GFP-экспрессирующие клетки, появляющиеся в результате однократной векторной трансдукции, широко распределены и могут быть колокализованы с нейрональным протеином HuCD. Полученные результаты свидетельствуют, что GFP экспрессирующие клетки тегментума молоди кеты имеют нейрональный фенотип. Однако в различных областях тегментума молоди кеты доля колокализации GFP/HuCD в клетках отличается (табл. 1). Мы полагаем, что это может определяться различными причинами, в частности режимом конфокальной визуализации маркированных клеток, условиями проведения иммунофлюоресцентного маркирования, различной проницаемостью ткани для антител и т.д.

В исследованиях на различных позвоночных было установлено, что аденовирусные векторы вызывают менее токсичный эффект, чем некоторые другие вирусы, однако не являются инертными по отношению к врожденному [16] или адаптивному иммунитету и могут также влиять на внутриклеточную активность [17]. Согласно некоторым данным нейротоксические эффекты наблюдаются в случае системной доставки аденовируса или через прямые инъекции в ЦНС, а также в субретинальное пространство сетчатки [18, 19]. Результаты настоящего исследования показывают, что рекомбинантный AAV гиппокампа мышей при однократном введении в мезенцефалон молоди кеты не оказывает за-

метного токсического влияния на клетки мозга рыб в исследованном временном периоде, что позволяет использовать данный вектор в качестве эффективного инструмента для доставки генетического материала в клетки мозга молоди кеты как потенциальной модели для нейрогенных исследований. Тем не менее учитывая, что данные исследования носят предварительный характер и нуждаются в последующем экспериментальном подтверждении, мы планируем проведение дальнейшей оценки ненейрональных фенотипов AAV-экспрессирующих клеток в мозге молоди лососевых рыб. Таким образом, аденоассоциированный вектор может эффективно трансдуцироваться и поддерживать экспрессию трансгенов в нейронах мозга молоди кеты при однократном введении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке ННЦМБ ДВО РАН (госконтракт № 120k-19 от 11.14.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haery L., Deverman B.E., Matho K.S., Cetin A., Woodard K., Cepko C., Guerin K.I., Rego M.A., Ersing I., Bachle S.M., Kamens J., Fan M.* Adeno-associated virus technologies and methods for targeted neuronal manipulation. Front. Neuroanat. 13:93. 2019. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00093
2. *Hashimoto M., Mikoshiba K.* Neuronal birthdate-specific gene transfer with adenoviral vectors. J. Neurosci. 24: 286–296. 2004.
3. *Hashimoto M., Mikoshiba K.* Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the ‘‘birth date” of Purkinje cells. J. Neurosci. 23: 11342–11351. 2003.
4. *Zhao H.Q., Ivic L., Otaki J.M., Hashimoto M., Mikoshiba K., Firestein S.* Functional expression of a mammalian odorant receptor. Science. 279: 237–242. 1998.
5. *Gulías P., Guerra-Varela J., Gonzalez-Aparicio M., Ricobaraza A., Vales A., Gonzalez-Aseguinolaza G., Hernandez-Alcoceba R., Sánchez L. Danio rerio* as model organism for adenoviral vector evaluation. Genes. 10: 1053. 2019. https://doi.org/10.3390/genes10121053
6. *Kawasaki T., Saito K., Mitsui K., Ikawa M., Yamashita M., Taniguchi Y., Takeda S., Mitani K., Sakai N.* Introduction of a foreign gene into zebrafish and medaka cells using adenoviral vectors. Zebrafish. 6: 253–258. 2009. https://doi.org/ 10.1089/zeb.2009.0596
7. *Rainbow A.J., Zacal N.J.* Expression of an adenovirus encoded reporter gene and its reactivation following UVC and oxidative damage in cultured fish cells. Int. J. Radiat. Biol. 84: 455–466. 2008.
8. *Furutani-Seiki M., Wittbrodt J.* Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. Mech. Dev. 121: 629–637. 2004.
9. *Asakawa K., Suster M.L., Mizusawa K., Nagayoshi S., Kotani T., Urasaki A., Kishimoto Y., Hibi M., Kawakami K.* Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 1255–1260. 2008.
10. *Broussard G.J., Liang R., Tian L.* Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. Front. Mol. Neurosci. 7: 97. 2014. https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00097
11. *Cearley C.N., Wolfe J.H.* Transduction characteristics of adenoassociated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. Mol. Ther. 13: 528–537. 2006.
12. *Cearley C.N., Wolfe J.H.* A single Injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. J. Neurosci. 27 (37) : 9928–9940. 2007.
13. *Gao G., Qu G., Burnham M.S., Huang J., Chirmule N., Joshi B., Yu Q.C., Marsh J.A., Conceicao C.M., Wilson J.M.* Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*. Hum. Gene Ther. 11:2079–2091. 2000.
14. *Колос Е.А., Коржевский Д.Э.* Влияние теплового демаскирования антигена на качество флуоресцентной окраски ДНК в гистологических срезах. Мед. Акад. ж. 18: (1) 71–76. 2018. [*Kolos E.A., Korzhevskij D.E.* Vliyanie teplovogo demaskirovaniya antigena na kachestvo fluorescentnoj okraski DNK v gistologicheskih srezah. Med. Akad. J. 18: (1) 71–76. 2018. (in Russ)].
15. *Crustal R.* Adenovirus: The first effective in vivo gene delivery vector. Hum. Gene Ther. 25: 3–11. 2014.
16. *Rogers G.L., Martino A.T., Aslanidi G.V., Jayandharan G.R., Srivastava, A., Herzog R.W.* Innate immune responses to AAV vectors. Front. Microbiol. 2:194. 2011. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00194
17. *Mingozzi F., High K.A.* Immune responses to AAV in clinical trials. Curr. Gene Ther. 11: 321–330. 2011. https://doi.org/10.2174/156652311796150354
18. *Hinderer C., Bell P., Vite C.H., Louboutin P.J., Grant R., Bote E.* Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 1:14051. 2014. https://doi.org/10.1038/mtm.2014.51
19. *Xiong W., Wu D.M., Xue Y., Wang S.K., Chung M.J., Ji X.* AAV cis-regulatory sequences are correlated with ocular toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116: 5785–5794. 2019. https://doi.org/10.1073/pnas.1821000116
20. *Candal E., Anadon R., DeGrip W.J., and Rodriguez-Moldes I.* Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. Dev. Brain Res. 154:101–119. 2005.

LABELING OF MESENCEPHALIC TEGMENTAL NEURONS IN A JUVENILE PACIFIC CHUM SALMON *ONCORHYNCHUS KETA* WITH MOUSE HIPPOCAMPAL ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS

E. V. Pushchina[a,b,#], I. A. Kapustyanov[a], E. V. Shamshurina[a], and A. A. Varaksin[a]

[a] *Zhirmunsky National Research Center for Marine Biology, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia*

[b] *Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*

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

Currently, the data on the presence of adenoviral receptors in fish are very limited. We used mouse recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV) with a calcium sensor GCaMP6m, which are typically used for the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus but have not previously been used for gene delivery in the fish brain. The aim of this work was (1) to assess the ability of the mouse hippocampal rAAV to label brain cells in a juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta* and (2) to determine the phenotype of rAAV-labeled cells. In vivo gene delivery was carried out through intracranial injection of the GFP-tagged rAAV directly into the mesencephalic tegmentum of a yearling chum salmon. The level of infectious efficacy was assessed 1 week after the injection of the vector. Using confocal scanning microscopy, rAAV-GFP expression was assessed in various tegmental regions of a juvenile *O. keta*, followed by the localization of the neuron-specific protein HuCD tagged with orange-fluorescent Alexa Fluor 546. An immunohistochemical analysis combined with DAPI staining revealed rAAV/HuCD colocalization in various neurons of the mouse mesencephalic tegmentum. This finding provides evidence that rAAV-expressing tegmental cells in the juvenile chum salmon refer to a neuron-specific line of brain cells, indicative of the ability of mammalian hippocampal adenoviruses to infect neurons of the fish central nervous system. Thus, mammalian hippocampus-specific rAAVs can incorporate into fish brain neurons with subsequent expression of the viral proteins. It appears that tegmental neurons in a juvenile chum salmon contain a homologue of the mammalian adenoviral receptor.

Keywords: Adeno-associated virus, high-capacity adenoviral vector, delivery system, *Oncorhynchus keta*, tegmentum, HuCD

Поправки

DOI: 10.31857/S0044452921010113

Исправление к статье: ВОЗМОЖНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ И ОРГАНИЗАЦИЕЙ Т-СИСТЕМЫ МИОЦИТОВ ЖЕЛУДОЧКОВ И ПРЕДСЕРДИЙ СЕРДЦА КРЫСЫ

И. В. Кубасов, М. Г. Добрецов, Д. Е. Бобков, А. А. Панов

DOI: 10.31857/S0044452920040075

2020, том 56, № 4, с. 299–302

В раздел “Благодарности” требуется внести следующее:

Авторы глубоко благодарны М.А. Терпиловскому за разработку компьютерной программы и первичный анализ полученных изображений на предмет определения вероятности распределения устьев t-трубочек под микроэлектродом с использованием метода Монте-Карло.

Исправление к статье: КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВЫБРОСА НЕЙРОМЕДИАТОРА В ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ СИНАПСЕ ПРИ АКТИВАЦИИ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

Д. В. Самигуллин, Н. В. Жиляков, А. Ю. Архипов

DOI: 10.31857/S004445292007244

2020, том 56, доп. № 7, с. 686

Вместо [1]Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Необходимо читать: [1] Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук””, Казань, Россия

Исправление к статье: “ТОРМОЖЕНИЕ ИОНАМИ Gd^{3+} КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ ЛЯГУШКИ И МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА КРЫСЫ”

Коротков С.М., Соболь К.В., Шемарова И.В., Новожилов А.В., Никитина Е.Р.

DOI: 10.31857/S0044452920070669

2020, том 56, доп. № 7, с. 616

Пропущен последний автор В.П. Нестеров

Исправление к статье: СОПОСТАВЛЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ФИЗИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКИ НА АФК-ЗАВИСИМУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ТОНУСА МЕЛКИХ АРТЕРИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ МУСКУЛАТУРЫ КРЫСЫ

А. А. Борзых, А. А. Швецова, О. О. Кирюхина, Е. К. Селиванова, И. В. Кузьмин, О.С. Тарасова

DOI: 10.31857/S0044452920070244

2020, том 56, доп. № 7, с. 545.

В последнем абзаце тезисов вместо “Финансирование работы: РНФ 19-75-00610”

необходимо читать “Финансирование работы: РНФ 19-75-0060.”