

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 3, 2022

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

ОБЗОРЫ

Взаимосвязь окислительного метаболизма и эпигенетической регуляции экспрессии генов в условиях функциональной разгрузки

К. А. Шарло, И. Д. Львова, Б. С. Шенкман

171

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Сравнительный анализ влияния цестод, обитающих в кишечниках различных видов рыб, на активность протеолитических ферментов

Т. В. Фролова, Г. И. Извекова

188

Кальциевый компонент фотоответов сетчатки моллюска *Lymnaea stagnalis*: фармакологический и ультраструктурный анализ

В. В. Жуков, М. В. Сафонов

196

Витамин D3 ингибирует фагоцитарную активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре

Т. В. Соколова, М. П. Рычкова, Н. Е. Басова, М. Г. Ефимова

209

Восстанавливающий эффект комбинированного интраназального введения инсулина и С-пептида на гормональный статус и гипоталамический сигналинг в модели краткосрочного тяжелого стрептозотоцин-индуцированного диабета у самцов крыс

К. В. Деркач, А. А. Бахтюков, Н. Е. Басова, И. И. Зорина, А. О. Шпаков

219

Нарушение стимул-специфической адаптации у мышей, нокаутных по гену рецептора следовых аминов 1-го типа (TAAR1)

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

232

Функциональная роль нонапептидергической преоптико-гипофизарной нейросекреторной системы рыб в нерестовых миграциях

П. Е. Гарлов, В. В. Кузик

240

Contents

Vol. 58, No. 3, 2022

REVIEWS

Interaction of oxidative metabolism and epigenetic regulation
of gene expression under muscle functional unloading

K. A. Sharlo, I. D. Lvova, and B. S. Shenkman

171

EXPERIMENTAL ARTICLES

A comparative analysis of the effect of intestinal cestodes in different fish species
on activity of proteolytic enzymes

T. V. Frolova and G. I. Izvekova

188

Calcium component of the retinal light response in the snail *Lymnaea stagnalis*:
A pharmacological and ultrstructural study

V. V. Zhukov and M. V. Saphonov

196

Vitamin D3 inhibits phagocytic activity of rat brain astrocytes in primary culture

T. V. Sokolova, M. P. Rychkova, N. E. Basova, and M. G. Yefimova

209

The Restorative Effect of Combined Insulin and C-Peptide Intranasal Administration
on Hormonal Status and Hypothalamic Signaling in the Male Rat Model
of Severe Short-term Streptozotocin-Induced Diabetes

K. V. Derkach, A. A. Bakhtyukov, N. E. Basova, I. I. Zorina, and A. O. Shpakov

219

Stimulus Specific Adaptation is Impaired in Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1)
Knockout Mice

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

232

The Involvement and Functional Role of the Fish Nonapeptidergic
Preoptico-Hypophyseal Neurosecretory System in Spawning Migrations

P. E. Garlov and V. V. Kuzik

240

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2022 г. К. А. Шарло^{1,*}, И. Д. Львова¹, Б. С. Шенкман¹

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*e-mail: sharlokris@gmail.com

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

Широко известно, что как в реальных, так и в моделируемых условиях микрогравитации происходит снижение уровня окислительного метаболизма в скелетных мышцах человека и животных. В последние годы стало известно, что одним из последствий снижения уровня окислительного метаболизма в тканях может являться изменение эпигенетического статуса некоторых генов, а также накоплены данные, позволяющие предположить важную роль эпигенетического контроля экспрессии ряда генов в развитии негативных изменений, происходящих с мышцей в условиях реальной или моделируемой микрогравитации. Обзор посвящен анализу и систематизации данных о состоянии окислительного метаболизма и эпигенетического контроля экспрессии генов в скелетных мышцах в условиях функциональной разгрузки, рассмотрению молекулярных взаимосвязей между ключевыми регуляторами окислительного метаболизма и эпигенетическими модификациями и формулированию гипотезы о роли окислительного метаболизма в эпигенетическом блокировании экспрессии ряда генов, определяющих медленный, устойчивый к утомлению фенотип мышечных волокон.

Ключевые слова: окислительный метаболизм, эпигенетика, функциональная разгрузка, скелетные мышцы, митохондрии

DOI: 10.31857/S0044452922030056

Функциональное состояние скелетных мышц в условиях микрогравитации привлекало внимание исследователей, начиная с первых полетов человека в Космос. Техническая возможность устранить гравитационный стимул, действующий на все живые организмы на Земле, начиная с момента их возникновения, раскрыла перед исследователями перспективы развития новой отрасли науки, гравитационной физиологии. Данная отрасль науки посвящена изучению роли гравитационных сил в развитии различных биологических процессов. Гравитационная физиология скелетных мышц, помимо теоретического, имеет и важное практическое значение. Уже в первые часы космического полета у космонавтов снижается тонус скелетных мышц, что сопровождается снижением максимальной силы мышечного сокращения. В дальнейшем эти изменения усугубляются и сопровождаются мышечной атрофией и повышенной утомляемостью, причем возврат мышечных функций в норму требует длительного времени после возвращения космонавтов на Землю. Разработка методов профилактики подобных нарушений необходима для успешного освоения космического пространства.

С развитием гравитационной физиологии скелетных мышц стало понятным, что часть эффектов, вызываемых отсутствием влияния гравитационной силы Земли, можно получить и в земных условиях. Более того, часть нарушений функций скелетных мышц в условиях прекращения или снижения активности мышц и/или уровня механической нагрузки мышц на Земле вызваны теми же регуляторными изменениями и реализуются посредством тех же молекулярных механизмов, что и нарушения, развивающиеся в условиях космического полета. Таким образом, исследование эффектов моделируемой гравитационной разгрузки (функциональной разгрузки) скелетных мышц позволяет получать данные о реакции мышц на ряд факторов космического полета и разрабатывать меры профилактики негативных изменений. Более того, достижения гравитационной физиологии скелетных мышц, включая данные, полученные в условиях космического полета, можно использовать в лечении и реабилитации после периодов функциональной разгрузки мышц.

К настоящему моменту достаточно хорошо изучены ряд функционально значимых протеинкиназ и их воздействие на ряд транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц. Известны, по меньшей мере, некоторые транскрипционные факторы, регулирующие их протеинкиназы, а также вторичные мессенджеры, регулирующие активность этих протеинкиназ, реализующие активацию протеолиза, снижение уровня синтеза белка и снижение доли мышечных волокон медленного (устойчивого к утомлению) типа в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц. Куда меньше известно об эпигенетических механизмах регуляции экспрессии генов при различных вариантах функциональной разгрузки скелетных мышц. Большинство исследований, в которых описывается эпигенетическое состояние некоторых генов в данных условиях, посвящено исключительно описанию эпигенетических модификаций гистонов или ДНК промотора одного или нескольких генов, и не описывает физиологические механизмы, регуляцию или же функциональную значимость этих эпигенетических модификаций.

В данном обзоре впервые выдвигается и формулируется гипотеза о функциональной взаимосвязи между таким широко известным явлением, как снижение уровня окислительного метаболизма в скелетных мышцах при их функциональной разгрузке и повышением уровня репрессорных эпигенетических модификаций на промоторах ряда генов, экспрессия которых необходима для поддержания медленного, устойчивого к утомлению фенотипа волокон скелетных мышц. Также в данном обзоре систематизируются данные о состоянии ключевых регуляторов окислительного метаболизма в скелетных мышцах при разных сроках и разных вариантах функциональной разгрузки и приводятся гипотезы о причинах снижения уровня окислительного метаболизма в данных условиях.

Стоит отметить, что в этом обзоре не рассматривается связь структурных и функциональных изменений митохондрий с ростом мышечной утомляемости в условиях функциональной разгрузки, несмотря на то, что эта взаимосвязь представляет собой отдельную важную научную проблему. Такие исследования требуют отдельного объемного рассмотрения. Также здесь не рассматриваются гипотезы о связи митохондрий и атрофии при функциональной разгрузке, так как на эту тему существует достаточное количество обзоров хорошего качества [1, 2].

ЧАСТЬ I. МИТОХОНДРИИ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ

Структурные и функциональные изменения митохондрий

Исследования параметров метаболизма в условиях реальной или моделируемой микрогравитации проводились, начиная со второй половины XX века. Данные, полученные в условиях функциональной разгрузки различной длительности, свидетельствуют как о снижении функции митохондрий, так и о снижении содержания ряда ферментов окислительного метаболизма и митохондриальной ДНК. После 10-суточного вывешивания крыс в камбаловидной мышце было обнаружено 40%-ное снижение активности цитратсинтазы, 50%-ное снижение активности цитохромоксидазы и 30%-ное снижение активности 3-гидроксиацил-коА-дегидрогеназы. При этом снижения активности сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в этом эксперименте обнаружено не было [3]. В исследовании с 5-недельным вывешиванием крыс в камбаловидной мышце также было детектировано снижение активности 3-гидроксиацил-коА-дегидрогеназы и цитратсинтазы, но не лактатдегидрогеназы, а также на 19% было снижено максимальное потребление кислорода экспериментальными животными [4]. После 7-суточного вывешивания крыс в *m. soleus* и *m. gastrocnemius* обнаружено достоверное снижение активности цитратсинтазы [5, 6], после трех недель вывешивания в камбаловидной мышце крысы также снижается активность сукцинатдегидрогеназы [7]. Однако в другой работе в камбаловидной мышце крысы было обнаружено значительное увеличение активности цитратсинтазы после 14 и 28 суток вывешивания [8], и в ряде работ в условиях вывешивания и космического полета различной длительности в мышечных волокнах наблюдалась активация сукцинатдегидрогеназы [9]. В эксперименте с оценкой дыхательной функции отдельных митохондриальных комплексов после 4-недельного вывешивания крыс было показано, что в наибольшей степени снижается активность I комплекса дыхательной цепи, однако достоверные изменения были показаны только для митохондрий, выделенных из *m. gastrocnemius* экспериментальных животных [10]. Из вышеперечисленных экспериментальных данных следует, что активность ферментов цикла Кребса в условиях функциональной разгрузки (по крайней мере на некоторых стадиях) изменяется не согласованно: часть ферментов увеличивают свою активность в сравнении с контролем, тогда как другая часть инактивируется. В пользу этого обобщения свидетельствуют данные о содержании различных интермедиатов цикла Кребса в условиях 7-суточного вывешивания в камбаловидной мышце крыс [11]. Если бы инактивация ферментов цикла Кребса происходила согласованно, то наблюдалось бы

пропорциональное снижение содержания всех интермедиатов цикла Кребса. Однако в данной работе не было обнаружено достоверных отличий в уровне лактата, цитрата и пирувата в сравнении с контролем, но было достоверно снижено содержание альфа-кетоглутарата, фумарата и малата [11]. Это неравномерное изменение содержания интермедиатов может объясняться разнонаправленными изменениями активности ферментов цикла Кребса.

Тем не менее стоит отметить, что при анализе активности митохондриальных ферментов на поперечных срезах мышц на результат значительно влияет степень атрофии мышечных волокон [12, 13]. При этом известно, что мышечные волокна медленного типа в условиях вывешивания задних конечностей атрофируются значительно сильнее, чем волокна быстрого типа: таким образом, незначительные или отсутствующие изменения активности митохондриальных ферментов в мышцах медленного типа при функциональной разгрузке могут быть связаны с более быстрым уменьшением площади поперечного сечения волокон по сравнению с падением содержания митохондриальных ферментов на некоторых стадиях функциональной разгрузки [13]. Однако этот факт не объясняет разнонаправленное изменение активностей ферментов цикла Кребса в волокнах одного и того же типа.

Изменения в функционировании митохондрий наблюдаются уже на ранних сроках функциональной разгрузки. В исследовании с 3-суточным вывешиванием мышей было показано, что уже на этом сроке достоверно снижается дыхательная активность комплексов I и II митохондрий мышц задних конечностей, что сопровождается повышением содержания H_2O_2 в мышечных волокнах, а также снижается уровень экспрессии генов, кодирующих компоненты дыхательной цепи и участвующих в окислении жирных кислот, причем эти изменения появляются раньше, чем снижение содержания митохондриальных белков и ДНК. Повышенный уровень генерации H_2O_2 митохондриями наблюдался и на 7-е и 14-е сутки вывешивания в камбаловидной мышце мышей [14]; по-видимому, повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в мышцах при разгрузке наблюдается уже на самых ранних сроках — в частности, в работе Gorza и соавт. было детектировано повышение уровня АФК в камбаловидной мышце уже после 6 ч вывешивания задних конечностей крыс [15]. Gomez-Cabrera и соавт. полагают, что нарушения функционирования митохондрий играют решающую роль в накоплении АФК в мышцах при функциональной разгрузке, однако не исключено, что АФК накапливаются в том числе и за счет изменения работы NOX (НАДФН-оксидазы), а также дерегуляции работы синтазы оксида азота; относительная роль разных

механизмов в накоплении АФК при функциональной разгрузке изучена недостаточно [16]. В эксперименте с иммобилизацией задних конечностей крыс было показано, что потребление кислорода митохондриями в *m. gastrocnemius* резко снижается — более, чем в два раза уже после первых суток воздействия, а в дальнейшем продолжает снижаться уже в более медленном темпе [17]. Тем не менее в одной работе было обнаружено повышение дыхательной активности комплекса I, комплексов I и II и разобщенного митохондриального дыхания, наряду со снижением активности цитратсинтазы в *m. vastus lateralis* после 4-суточной постельной гипокинезии [18]. Из этих данных можно сделать вывод, что в условиях функциональной разгрузки нарушение функций митохондрий происходит раньше, чем снижается содержание митохондриальных белков и ДНК. Таким образом, нельзя исключать, что нарушение функций митохондрий на первом этапе функциональной разгрузки скелетных мышц может вносить вклад в инактивацию биогенеза митохондрий и активацию митофагии, происходящие на более поздних этапах данного процесса.

Помимо функциональных изменений происходят и количественные изменения в содержании митохондриальных белков и ДНК. После трех суток функциональной разгрузки и далее нарушение функций митохондрий сопровождается снижением содержания митохондриальных белков и ДНК, причем этот эффект наблюдается и для наземной, и для космической функциональной разгрузки для различных мышц. В камбаловидной мышце крыс уже после двух недель вывешивания снижается как количество ферментов дыхательной цепи, так и содержание митохондриальной ДНК [19]. В условиях 30-суточного вывешивания крыс в *m. gastrocnemius* и *m. tibialis anterior* происходит достоверное снижение содержания ряда белков комплексов дыхательной цепи, в *m. gastrocnemius* этот процесс сопровождается также снижением содержания митохондриальной ДНК [20]. У человека снижение содержания митохондриальных ферментов и снижение транскрипции генов, ассоциированных с активностью митохондрий, наблюдается в *m. vastus lateralis* после 10 дней постельной гипокинезии [14, 21]. Снижение дыхательной активности митохондрий происходит и после 12-дневного одностороннего вывешивания ноги (ULLS) в *m. tibialis* [22]. После 6-суточного космического полета в *m. triceps brachii* крыс было обнаружено значительное снижение активности цитохром С оксидазы, однако ее содержание не изменялось, как и содержание некоторых ферментов цикла Кребса [23], а после 30-суточного космического полета с помощью метода протеомного анализа было показано снижение содержания компонентов дыхательной цепи митохондрий в камбаловидной мышце мышей [24].

Отдельно стоит рассмотреть морфологические изменения, происходящие при разных моделях и на разных сроках функциональной разгрузки. После 14-суточного космического полета в камбаловидной мышце макак-резусов наблюдалось незначительное снижение объемной плотности митохондрий в субсарколеммальной области, тогда как в *m. vastus lateralis* наблюдалось значительное снижение объемной плотности митохондрий как в субсарколеммальной, так и в центральной зоне [25]. После 60-суточной постельной гипокинезии в камбаловидной мышце человека в субсарколеммальной зоне волокон достоверно снижалась объемная плотность митохондрий [26], а после 120-суточной антиортостатической гипокинезии объемная плотность митохондрий снижалась и в центральной, и в субсарколеммальной зоне [12]. После 5-недельного вывешивания крыс в камбаловидной мышце происходит снижение объемной плотности субсарколеммальных митохондрий и повышение объемной плотности интермиофибриллярных митохондрий, при этом их общая объемная плотность не изменяется [27]. Причины более интенсивного снижения объемной плотности митохондрий в субсарколеммальной зоне остаются неясными. Одно из спекулятивных соображений состоит в том, что в центральной зоне, где основное потребление АТФ связано с работой миофибрилл, их инактивация вызывает в начальный период разгрузки интенсивное накопление АТФ, что приводит к дефосфорилированию АМПК и соответственно к торможению как митофагии, так и биогенеза рибосом. В периферической зоне, напротив, потребление АТФ снижается менее интенсивно, что может способствовать более интенсивной динамике процессов расщепления (fission) и слияния (fusion) митохондрий.

Причины снижения содержания митохондрий и нарушения их функций

Причины нарушения функций митохондрий (снижение активности митохондриальных ферментов наряду с активацией генерирования АФК), а также причины снижения содержания митохондриальных белков и ДНК до сих пор остаются слабо изученными. Очевидной предпосылкой к нарушению функций митохондрий при функциональной разгрузке является прекращение активности мышцы, мгновенно происходящее, в частности, в камбаловидной мышце при устранении опорного стимула [28]. Отсутствие электрической активности мышцы приводит к накоплению макроэргических фосфатов и гликогена, к инактивации АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК), а также к инактивации Na,K-АТФазы, деполаризации сарколеммы и избыточному накоплению ионов кальция в миоплазме [29–33]. Накопление макроэргических фосфатов и инактивация АМПК в камба-

ловидной мышце происходят уже на первые сутки функциональной разгрузки и сохраняются как минимум до третьих суток [30, 34, 35], тогда как избыточное накопление кальция в миоплазме камбаловидной мышцы начинается, по-видимому, со вторых суток функциональной разгрузки и сохраняется как минимум в течение следующих двух недель [36, 37].

Накопление ионов кальция в миоплазме, с одной стороны, способствует активации работы ряда ферментов дыхательной цепи и цикла Кребса, но, с другой стороны, способствует генерации АФК [38]. Роль блокирования сократительной активности в нарушении функций митохондрий скелетных мышц была убедительно показана в работе 2017 г. Кагам и соавт.: после 24-часовой денервации в митохондриях волокон *m. flexor digitorum brevis* был детектирован сигнал флуоресцентного зонда, активирующегося в ответ на эмиссию митохондриальных АФК. Повышение содержания кальция в миоплазме в этом эксперименте сопровождалось соответствующим повышением кальция внутри митохондрий, как и усилением генерации АФК. При этом восстановление сократительной активности путем электростимуляции предотвращало генерацию митохондриями АФК [39]. На основании этого Кагам и соавт. делают вывод о том, что нарушение кальциевого гомеостаза играет ключевую роль в накоплении АФК на самом раннем сроке инактивации мышцы. Стоит отметить, что митохондриальные АФК способны приводить к окислению и открытию рианодиновых каналов саркоплазматического ретикулула. Это способствует “утечке” кальция из саркоплазматического ретикулула и дальнейшему повышению содержания кальция в сарколемме [40, 41]. К сожалению, роль этого процесса в условиях функциональной разгрузки не изучалась. В нашей лабораторной механической стимуляции опорных зон стопы (поддерживающая активность камбаловидной мышцы) на фоне 7-суточного вывешивания предотвратила снижение содержания митохондриальной ДНК и транскрипции мРНК генов ряда комплексов дыхательной цепи митохондрий. [42]. Тем не менее оценки митохондриальных функций и уровня АФК в этой работе не проводилось.

Помимо непосредственно внутримитохондриального кальция, нарушение функций митохондрий может вызывать и кальций-зависимая активация протеаз кальпаинов на фоне пониженного содержания NO (эндогенного ингибитора кальпаинов) [43], приводящая к разрушению цитоскелетных белков. В частности, известно, что разрушение, отсутствие или мутации десмина приводят к масштабному нарушению функций митохондрий и снижению содержания митохондриальной ДНК и белков в камбаловидной мышце [44, 45]. На фоне функциональной разгрузки кальпаин-зависимое разрушение десмина происходит на раннем сроке

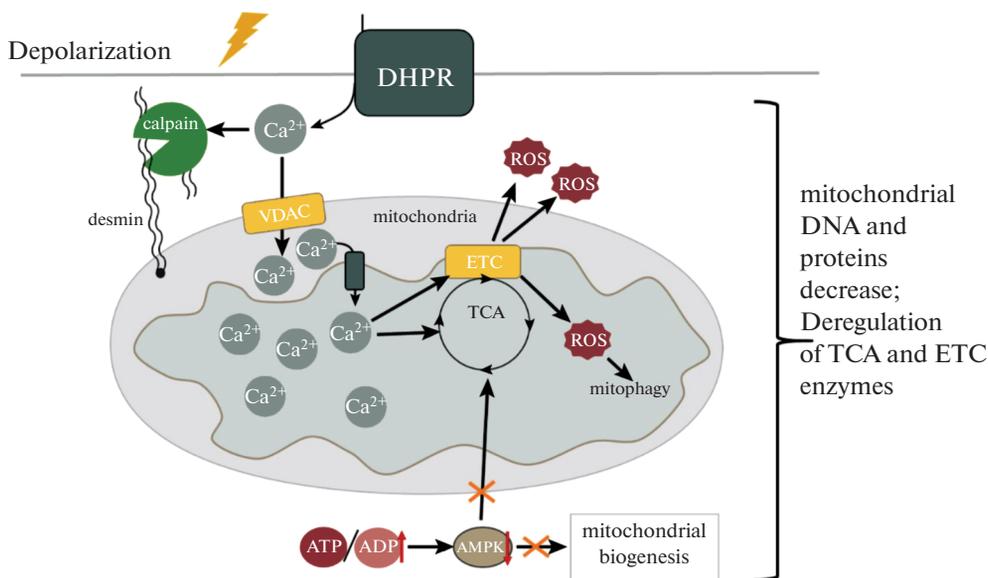


Рис. 1. Сигнальные процессы, регулирующие функции митохондрий на начальном этапе функциональной разгрузки. ROS – активные формы кислорода, VDAC – потенциал-зависимый анионный канал внешней митохондриальной мембраны, MCU – митохондриальный кальциевый унипортер, DHPR- дигидропиридиновые каналы, ETC – электрон-транспортная цепь, AMPK – АМФ-зависимая протеинкиназа.

(1–3-и сутки) [46, 47]. В связи с этим стоит отметить, что трансфекция гена кальпастина, эндогенного ингибитора кальпаина в волокна диафрагмы предотвращала как накопление АФК, так и снижение функций митохондрий, на фоне 12-часовой искусственной вентиляции легких [48]. Общая схема сигнальных процессов, регулирующих объем и функциональное состояние митохондрий на начальных этапах функциональной разгрузки, представлена на рис. 1.

Деполяризация сарколеммы на раннем этапе функциональной разгрузки скелетных мышц приводит к активации DHPR и накоплению кальция в миоплазме. Кальций поступает внутрь митохондрий, что приводит к генерации ROS и активации митофагии. Также кальций активирует кальпаины, что приводит к разрушению десминового цитоскелета мышечного волокна. Параллельно с этим из-за роста соотношения АТФ к АДФ инактивируется АМПК, что приводит к инаktivации биогенеза митохондрий. Одновременно с этим накопление ROS и рост соотношения АТФ к АДФ приводят к дерегуляции ферментов цикла Кребса.

Накопление макроэргических фосфатов в условиях функциональной разгрузки блокирует активность АМПК, которая является основным регулятором как уровня биогенеза, так и “контроля качества” митохондрий за счет координации их биогенеза и митофагии [49]. В одном исследовании было показано, что введение β-GPA приводит как к снижению содержания фосфокреатина, так и к восстановлению активности цитратсинтазы в скелетных мышцах [50]. Тем не менее исследования

роли накопления макроэргических фосфатов и инаktivации АМПК на функции и содержание митохондрий при функциональной разгрузке не проводилось. Стоит отметить, что повышенное содержание макроэргических фосфатов и последующая инаktivация АМПК наблюдается лишь на первом этапе функциональной разгрузки (1–3-и сутки). В дальнейшем содержание АТФ в камбаловидной мышце становится ниже контрольных значений, а активность АМПК к 7-м суткам возвращается к контрольному уровню, а после 14 суток вдвое превышает контрольные показатели [51, 52], что, однако, не сопровождается соответствующим увеличением содержания митохондриальных белков и ДНК, и экспрессии генов, связанных с функционированием митохондрий.

Состояние сигнальных путей, контролирующих биогенез, митофагию и динамику митохондрий в условиях функциональной разгрузки мышц

Несмотря на почти полное отсутствие информации о триггерах нарушения функций митохондрий и снижения содержания митохондриальных белков, было выполнено много исследований, описывающих состояние регуляторных путей, контролирующих биогенез митохондрий, митофагию, а также митохондриальную динамику при различных моделях функциональной разгрузки.

В целом в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц снижается уровень биогенеза митохондрий и активируется митофагия. При этом в большинстве случаев снижается как уровень экс-

прессии регуляторов митохондриального слияния (fusion), так и расщепления митохондриальной сети (fission).

Содержание мРНК ключевого регулятора биогенеза митохондрий PGC-1 α в камбаловидной мышце грызунов снижается уже на третьи сутки вывешивания [53], эта же ситуация сохраняется на 7-, 21- и 28-е сутки [19, 54–57]. После 28 сут вывешивания в камбаловидной мышце крыс снижается экспрессия мРНК ряда факторов инициации и элонгации транскрипции митохондриальных белков (гены *Taco1* и *Tufm*) [54]. После 14-суточного вывешивания в *m. gastrocnemius* мышцей также снижается экспрессия PGC-1 α и его близкого гомолога PGC-1 β , наряду с фактором транскрипции митохондриальных генов TFAM [19]. Снижение экспрессии PGC-1 α происходит и при других вариантах функциональной разгрузки: в *m. tibialis anterior* мышцей при 14-суточной иммобилизации [58], в *m. gastrocnemius* при 11-суточном космическом полете и в камбаловидной мышце при 30-суточном космическом полете мышцей [59]. У человека снижение экспрессии мРНК PGC-1 α происходит после 10 дней постельной гипокинезии в мышце *vastus lateralis* [60], после 5-недельного одностороннего вывешивания ноги в *m. vastus lateralis* [61], а также в камбаловидной мышце после 3-суточной и 21-суточной “сухой” иммерсии (неопубликованные данные нашей лаборатории). Тем не менее исследование камбаловидной мышцы двух астронавтов после 6-месячного космического полета показало увеличение экспрессии мРНК PGC-1 α : впрочем, авторы этого исследования связывают свои результаты с эффективностью профилактических мер, предпринимавшихся на протяжении полета [62].

Стоит отметить, что наряду со снижением экспрессии PGC-1 α и его генов-мишеней в некоторых работах также было описано снижение экспрессии ряда других регуляторов биогенеза митохондрий, таких как ERR α и Pgm1. В частности, снижение экспрессии ERR α наблюдалось после 28-суточного вывешивания в камбаловидной мышце крыс и после 21-суточного вывешивания в *m. gastrocnemius* (несмотря на то, что в последней работе также описано увеличение экспрессии PGC-1 α при вывешивании, при снижении экспрессии его генов-мишеней) [54, 57, 63]. Снижение экспрессии мРНК Pgm1 наблюдалось после 3-, 7- и 14-суточного вывешивания в камбаловидной мышце мышцей [14], после 21-суточной постельной гипокинезии в *m. vastus lateralis* [64] и после 21-суточной “сухой” иммерсии в камбаловидной мышце у человека (неопубликованные данные нашей лаборатории). Белок Pgm1 способен активировать биогенез митохондрий у человека и грызунов, и его экспрессия повышается при выполнении упражнений на выносливость, тем не менее,

о его молекулярных регуляторах пока ничего неизвестно [65].

В последние годы был идентифицирован один из молекулярных механизмов, регулирующий экспрессию PGC-1 α в условиях вывешивания крыс: в 2017 г. Theeuwes и соавт. показали, что при 14-суточном вывешивании мышцей-нокауты по гену киназы гликогенсинтазы GSK-3 β в *m. gastrocnemius* не происходит снижения уровня экспрессии PGC-1 α , как и снижения содержания ряда белков дыхательной цепи митохондрий [19]. В 2020–2021 гг. в нашей лаборатории было показано, что в камбаловидной мышце крыс при 7-суточном вывешивании с введением донора оксида азота L-аргинина не происходит как активации GSK-3 β , так и снижения экспрессии мРНК PGC-1 α [55]. При фармакологическом ингибировании GSK-3 β при 7-суточном вывешивании крыс в их камбаловидной мышце также не происходит снижения содержания PGC-1 α , TFAM1 и содержания митохондриальной ДНК [66]. Также мы показали, что поддержание опорной афферентации путем механической стимуляции опорных зон стопы предотвращает активацию GSK-3 β при 7-суточной функциональной разгрузке в камбаловидных мышцах крыс, и эффект опорной стимуляции на содержание митохондриальной ДНК аналогичен эффекту фармакологической инактивации GSK-3 β [42, 66]. Таким образом, мы показали, что, когда в отсутствие опоры при разгрузке мышцей задних конечностей в камбаловидной мышце крыс снижается уровень оксида азота, происходит активация GSK-3 β . Это ведет к снижению экспрессии PGC-1 α и снижению содержания митохондриальной ДНК. Тем не менее маловероятно, что GSK-3 β является единственным регулятором экспрессии PGC-1 α в условиях функциональной разгрузки: в частности, по данным ряда исследований, GSK-3 β активирована лишь на ранних сроках функциональной разгрузки, и с восстановлением ЭМГ камбаловидной мышцей активность GSK-3 β возвращается к контрольным значениям, что, однако, не сопровождается восстановлением уровня биогенеза митохондрий [51, 67].

Данные по состоянию процессов митофагии в условиях функциональной разгрузки несколько более противоречивы, чем данные о регуляторах биогенеза митохондрий. После 28 сут вывешивания крыс в *m. gastrocnemius* было обнаружено снижение маркеров митофагии (BNIP3, Фосфо-Ser-65-Parkin) наряду с увеличением содержания маркеров аутофагии [54]. Однако при 3-суточном вывешивании задних конечностей мышцей в их *m. gastrocnemius* было обнаружено повышение мРНК и белков маркеров митофагии BNIP3 и BNIP3L-II, наряду со снижением содержания FUNDC и PARK2 [68]. При одно-, двух- и трехсуточном вывешивании мышцей в динамике изменений параметров накопления АФК, митофагии,

слияния и расщепления митохондрий были обнаружены значительные различия в зависимости от пола животных и исследуемой мышцы [69]. При этом при двухнедельной иммобилизации *m. tibialis anterior* мышцей было обнаружен достоверный рост маркеров митофагии (Beclin-1, Vn1p3, PINK1, parkin, Muf1 и LC3II/LC3) [70]. При 7-суточной одно-сторонней иммобилизации ноги у человека в *m. vastus lateralis* также было обнаружено повышение уровня экспрессии Vn1p3L [68]. При этом Rosa-Caldwell и соавт. считают, что повышение уровня митофагии происходит лишь на раннем этапе функциональной разгрузки, вслед за повышением уровня генерации АФК митохондриями, а на более поздних этапах митофагия инактивируется, приходя в равновесие с уровнем биогенеза митохондрий [54]. Стоит отметить, что недавно была показана роль АМПК, локализованной на внешней мембране митохондрий, в активации митофагии, вызываемой снижением уровня соотношения АДФ к АТФ – однако роль этого процесса в условиях функциональной разгрузки неясна [71]. К сожалению, измерение уровня митофагии, как и параметров митохондриальной динамики, проводится лишь косвенными методами, путем измерения уровней содержания различных белковых участников процесса митофагии, слияния или расщепления митохондриальной сети, при этом относительная роль различных компонентов в данном процессе, как и уровень их активности, остаются неизвестными.

В большинстве случаев при различных вариантах функциональной разгрузки в скелетных мышцах млекопитающих снижается экспрессия как компонентов слияния митохондрий, так и компонентов расщепления митохондриальной сети [1]. В нашей лаборатории была исследована экспрессия мРНК показателей митохондриальной динамики в камбаловидной мышце крыс после 7-суточного вывешивания: мы обнаружили снижение как параметров слияния митохондрий (Mfn1, Mfn2, OPA1), так и показателей расщепления сети митохондрий (Drp1, Fis1) [42]. После 28-суточного вывешивания крыс в их *m. gastrocnemius* не было обнаружено снижения OPA1, Mfn1 и Mfn2, в то время как экспрессия Fis1 и Drp1 была снижена [54]. При иммобилизации в *m. tibialis anterior* мышцей было обнаружено снижение Mfn2 после 2- и 3-недельного воздействия, в случае 3 нед сопровождавшееся повышением экспрессии Fis1, при этом Drp1 и OPA1 не менялись на протяжении эксперимента [72]. Снижение содержания Mfn-2 наблюдалось и после 4-суточной постельной гипокинезии у человека в *m. vastus lateralis* [18], однако после 10-дневной постельной гипокинезии в *medialis vastus lateralis* человека не наблюдалось каких-либо изменений в показателях митохондриальной динамики [73]. С учетом того факта, что гены, кодирующие белки Mfn-2, как и Mfn-1 являются генами-мишенями

PGC-1 α [74], можно предположить, что снижение этих показателей слияния митохондрий обусловлено инактивацией PGC-1 α ; тем не менее, полная картина изменений митохондриальной динамики в условиях функциональной разгрузки мышц до сих пор не составлена.

ЧАСТЬ II. ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов представляет собой огромную и быстро развивающуюся область знаний, причем часто открытие каких-либо посттрансляционных модификаций гистонов или модификаций ДНК происходит значительно раньше, чем выявляются физиологическое значение и механизмы регуляции этих модификаций. Более того, большое количество данных, описывающих те или иные эпигенетические механизмы, получены на клеточных культурах, соответственно их роль в различных тканях и при различных физиологических воздействиях все еще остается неизвестной. В данном разделе мы кратко опишем основные эпигенетические механизмы, для которых выявлена взаимосвязь с теми или иными параметрами окислительного метаболизма как в скелетных мышцах, так и в других тканях, и рассмотрим молекулярные механизмы этих взаимосвязей. В первую очередь к этим механизмам относятся ацетилирование гистонов и метилирование CpG-островков ДНК. Мы не будем рассматривать метилирование гистонов, так как в отличие от метилирования CpG-островков, которое однозначно является репрессорной модификацией, и ацетилирования гистонов, которое однозначно является активирующей модификацией, эффект метилирования гистонов зависит от конкретного аминокислотного остатка, который был метилирован, а также от состояния соседних аминокислотных остатков; помимо этого, мы не обнаружили в литературе четкой взаимосвязи между метилированием гистонов и уровнем окислительного метаболизма в клетках млекопитающих.

Метилирование CpG-островков: регуляция, взаимосвязь с окислительным метаболизмом, состояние при функциональной разгрузке

В геноме млекопитающих метилирование ДНК происходит путем переноса метильной группы с S-аденозилметионина на пятый атом углерода в молекуле цитозина, что приводит к образованию 5'-метилцитозина. Этот процесс осуществляется классом ферментов ДНК-метилтрансфераз (Dnmt).

У млекопитающих экспрессируются четыре фермента Dnmt: Dnmt1, Dnmt3A, Dnmt3B и Dnmt3L, причем последняя не обладает метилтрансферазной активностью и регулирует работу двух других Dnmt3 [75]. Считается, что Dnmt1 осуществляет метилирование второй цепи ДНК при воспроизведении паттерна метилирования во время клеточного деления, в то время как Dnmt3 метилирует ДНК *de novo* в ответ на различные физиологические стимулы [75]. Деметилирование ДНК может происходить двумя путями. Один из них — это замена аминокислотной группы цитозина на карбонильную группу ферментом AID/APOBEC, что приводит к образованию тимина и последующей эксцизионной репарации непарного G/T дуплекса тимин-ДНК-гликозилазой. Второй путь осуществляется транслоказами *ten-eleven* (TET) путем окисления метильной группы метилцитозина и его превращения в 5'-гидроксиметилцитозин, а затем в 5'-формилцитозин или в 5'-карбонилцитозин [76, 77]. Окисленный нуклеотид затем также удаляет и заменяет на цитозин фермент тимин-ДНК-гликозилаза (TGA) [78]. В клетках млекопитающих обнаружено три транслоказы TET — TET1, TET2 и TET3. Равновесие между активностью TET и Dnmt необходимо для поддержания стабильного уровня метилирования цитозинов в геноме.

В среднем в геноме человека метилировано не более одного процента цитозиновых нуклеотидов. Большинство метилированных цитозинов находится перед гуанидиновыми нуклеотидами, в так называемых CpG-островках — участках ДНК длиной около 1000 н.п., обогащенных GC-повторами [79]. Около 70% промоторов генов млекопитающих содержат CpG-островки [80]. Метилирование цитозинов на CpG-островках приводит к ухудшению связывания промоторных участков с транскрипционными факторами, что ведет к блокированию экспрессии генов [81]. Также есть данные о том, что Dnmt взаимодействуют с гистондеацетилазами, что приводит к деацетилированию гистонов на промоторах генов с повышенной активностью Dnmt на них и к еще большему снижению уровня экспрессии данных генов [82]. Помимо метилирования CpG-островков на промоторах генов, существуют данные о метилировании не CpG-нуклеотидов, метилировании в не-промоторных областях генов, а также о метилировании цитозинов митохондриального генома, однако функции этих модификаций пока неясны и, по-видимому, имеют разный эффект в зависимости от локализации метилированного нуклеотида, конкретного гена и конкретной ткани [81, 83–85]. Необходимо отметить, что различные Dnmt, по-видимому, специфичны к различному набору генов и по-разному регулируются в ответ на различные физиологические стимулы, что позволяет настраивать паттерн экспрессии генов в соответствии текущим потребностям клетки: таким образом, изучение общего

направления уровней метилирования всех генов в тех или иных физиологических условиях не дает никакой информации ни о причинах, ни о последствиях таких изменений с точки зрения молекулярных механизмов [78].

Регуляция метилирования CpG-островков происходит за счет координации работы Dnmt и TET. Их регуляция может осуществляться как путем посттрансляционных модификаций данных ферментов, так и путем изменения содержания кофакторов, необходимых для их работы. Ключевым кофактором TET1–3 является альфа-кетоглутарат, один из интермедиатов цикла Кребса, тогда как сукцинат ингибирует работу данных ферментов [86]. В частности, было показано, что активация АМФ-зависимой протеинкиназы способствует накоплению альфа-кетоглутарата в жировой ткани за счет активации изоцитратдегидрогеназы 2, что ведет к деметилированию промотора гена *Prdm16*, фактора образования бурого жира [87]. АМПК также способна напрямую фосфорилировать остаток серина 99 TET2, стабилизируя его [88]. В культуре миобластов C2C12 АМПК-зависимое фосфорилирование TET2 необходимо для экспрессии регулятора пролиферации миобластов *Rax7* [89]. АФК также могут оказывать влияние на функционирование TET, окисляя его второй кофактор, двухвалентные ионы железа [90].

Регуляция Dnmt также может осуществляться как за счет регуляции содержания кофакторов, так и за счет посттрансляционных модификаций. Для работы Dnmt необходимо высокое соотношение уровня S-аденозилметионина к S-аденозилгомоцистеину (SAM: SAH). SAM необходим для работы Dnmt, в то время как SAH ингибирует их активность. АМПК способна активировать работу гидроксиметилтрансферазы 2, синтезирующей SAM, и ингибировать S-аденозилгомоцистеин-гидролазу путем активации экспрессии ингибиторной микро-РНК *let-7* [91]. Тем не менее также показано, что АМПК фосфорилирует остаток серина 730 молекулы Dnmt1, что инактивирует этот фермент и способствует деметилированию промоторов генов-регуляторов окислительного метаболизма *PGC-1 α* , *Tfam*, *NRF1*, *NRF2*, *UCP2* и *UCP3* [92], хотя в гепатоцитах активация АМПК способствует транслокации Dnmt1 в митохондрии и гиперметилированию митохондриального гена *ND6* [93]. Таким образом, мы видим, что АМПК может активировать как деметилирование, так и метилирование ДНК в зависимости от конкретного гена и ткани.

Исследования метилирования ДНК в скелетных мышцах в условиях функциональной нагрузки немногочисленны. Было показано, что при микрогравитации повышается метилирование промоторов генов, необходимых для дифференциации миобластов [94]. При иммобилизации камбаловидной мышцы мышцей в течение 7 сут по-

вышался уровень метилирования на промоторе *nNOS*, что сопровождалось снижением экспрессии этого гена [95]. После 10 дней постельной гипокинезии в *m. vastus lateralis* в промоторе *PGC-α* было обнаружено увеличение уровня метилирования одного из исследованных CpG-островков, но не двух других [96]. После 7-суточного вывешивания в камбаловидной мышце крыс было обнаружено увеличение уровня метилирования CpG-островков на промоторе *PGC-α* [42]. Стоит отметить, что в скелетных мышцах человека были обнаружены отличия в уровне метилирования ДНК как промоторов, так и интронов генов между быстрыми и медленными волокнами: в быстрых волокнах ДНК генов, экспрессирующихся преимущественно в медленных волокнах, была гиперметилирована; зеркальная ситуация наблюдалась в случае медленных волокон и генов, экспрессия которых характерна для быстрых волокон [97]. С учетом того факта, что при функциональной разгрузке происходит трансформация волокон скелетных мышц из “медленного” типа в “быстрый”, не исключено, что эта трансформация сопровождается соответствующими изменениями паттерна метилирования ДНК. Какими же причинами может объясняться повышение уровня метилирования CpG-островков на промоторах ряда генов в условиях функциональной разгрузки?

Одной из таких причин может являться изменение содержания альфа-кетоглутарата в тканях мышц при функциональной разгрузке. В единственном исследовании, описывающем содержание альфа-кетоглутарата при 7-суточном вывешивании, в камбаловидной мышце мыши было детектировано его значительное снижение относительно контрольных значений [11]. В нашей лаборатории на этом же сроке вывешивания в камбаловидной мышце крыс был детектирован повышенный уровень метилирования CpG-островков на промоторе *PGC-1α*, при этом механическая стимуляция опорных зон стопы частично предотвращала этот эффект [42]. Следует также отметить, что метилирование промотора *PGC-1α* напрямую зависит от активности АМПК [92]. В описываемом эксперименте фосфорилирование АМПК не различалось между контрольными группами, однако известно, что на более ранних сроках вывешивания опорная механическая стимуляция предотвращает снижение уровня фосфорилирования АМПК, и таким образом, наблюдаемый эффект опорной стимуляции на уровень CpG метилирования на 7-е сутки может быть опосредован воздействием опорной стимуляции ранее, на 1-е–3-и сутки эксперимента [53].

Таким образом, на основании этих данных можно сформулировать следующую гипотезу: нарушение функционирования митохондрий на раннем сроке функциональной разгрузки приводит к несогласованию работы электрон-транспортной це-

пи и ферментов цикла Кребса (о чем мы упоминали в первой части обзора). Это ведет, помимо других эффектов, к снижению содержания альфа-кетоглутарата в мышечных волокнах; недостаток альфа-кетоглутарата, основного субстрата для работы транслоказ ТЕТ, приводит к гиперметилированию промоторов ряда генов, экспрессия которых характерна для активной мышцы. В частности, такая регуляция может работать для ряда генов, которые регулируются промоторным CpG-метилированием (таких как гены, кодирующие белки *PGC-1α*, *Tfam*, *NRF1*, *MyHC I*, *nNOS*) [92, 95]. Одновременно с этим за счет накопления макроэргических фосфатов в разгруженной мышце происходит инактивация АМПК, АМПК перестает ингибировать *Dnmt1*, и это ведет к гиперметилированию CpG-островков промоторов ряда генов, способствующих реализации окислительного метаболизма, в частности, *PGC-1α*, к снижению уровня биогенеза митохондрий и к дальнейшему снижению содержания альфа-кетоглутарата, что приводит к стабилизации гиперметилирования.

Ацетилирование гистонов: регуляция, взаимосвязь с окислительным метаболизмом, состояние при функциональной разгрузке

Ацетилирование гистонов происходит путем переноса ацетильной группы с молекулы ацetyl-CoA на остаток лизина гистонов [98]. Ацетильная группа несет отрицательный заряд и таким образом ослабляет взаимодействие между положительно заряженным гистоном и отрицательно заряженной ДНК: это повышает доступность ДНК для транскрипционных факторов и РНК-полимеразы. Таким образом, ацетилирование гистонов представляет собой активирующую эпигенетическую модификацию [99]. Ацетилирование гистонов у млекопитающих осуществляют три класса гистон-ацетилтрансфераз – GNAT, MYST и p300/CBP [100]. Деацетилюют гистоны гистондеацетилазы (HDAC), они делятся на четыре класса: HDAC I, HDAC II, сиртуины (NAD^+ -зависимые гистондеацетилазы, SIRT) и HDAC III. В скелетной мышце ряд сиртуинов принимает участие в активации окислительного метаболизма, тогда как HDAC II подавляют экспрессию *PGC-1α* и медленной изоформы тяжелых цепей миозина [101].

В скелетной мышце наиболее хорошо изученной является регуляция HDAC IIa, в частности, HDAC4 и 5. Активность гистондеацетилаз класса IIa регулируется за счет нуклео-цитоплазматического траффика, в частности, экспорту HDAC4 из мышечных ядер способствует ее фосфорилирование СаМК II, АМПК и PDK1 [102, 103]. Одновременно с этим активность АМПК может способствовать накоплению эндогенного ингибитора HDAC I и HDAC II 2-гидроксибутирата [104]. Тем не менее АМПК способствует активации ряда деацетилаз

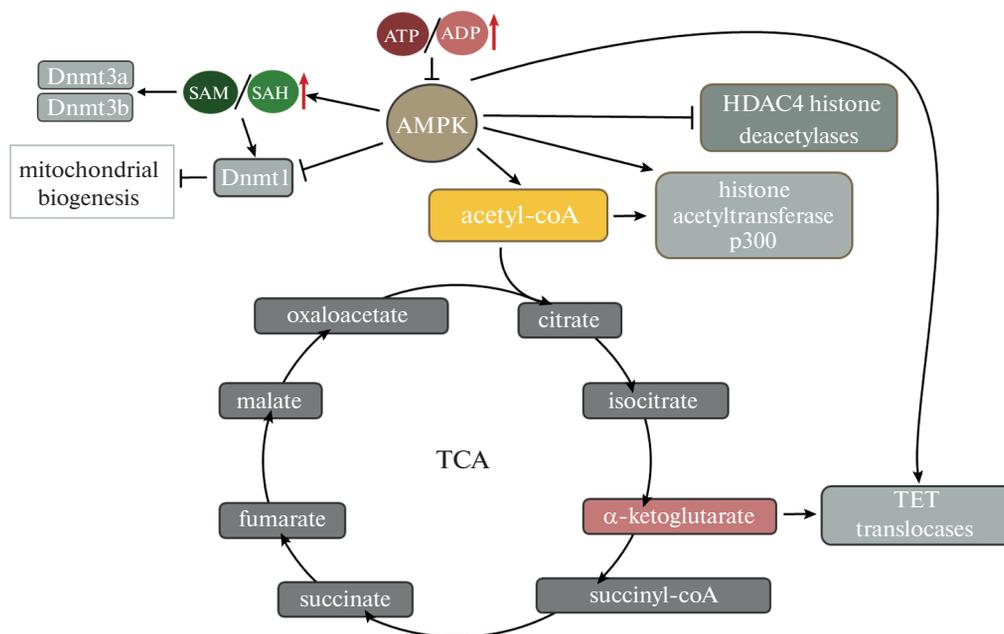


Рис. 2. Взаимосвязи метилирования ДНК и ацетилирования гистонов с ферментами окислительного метаболизма в скелетной мышце. SAM – S-аденозилметионин, SAH – S-аденозилгомоцистеин, АМПК – АМФ-зависимая протеинкиназа, Dnmt – ДНК-метилтрансферазы.

SIRT [105]. Очевидно, что, как и в случае с эпигенетическими модификациями ДНК, эффект АМПК на уровень ацетилирования гистонов зависит от конкретного гена и ткани организма.

Активация p300/СВР в мышечных клетках может происходить за счет фосфорилирования и стабилизации молекулы p300 со стороны Akt [106], фосфорилирование со стороны МАП-киназы p38, напротив, способствует протеолизу молекулы p300 [107]. Отдельно следует отметить, что АМПК, инактивирующая ядерный импорт HDAC класса Pa, также фосфорилирует и ингибирует фермент ацетил-коА-карбоксилазу, способствуя тем самым накоплению ацетил-КоА, кофермента, необходимого для работы гистонацетилтрансфераз. На ряде культур раковых клеток было показано, что активация АМПК приводит к повышению уровня ацетилирования как гистонов, так и ряда других белков [108]. АМПК также способна активировать ацетилтрансферазу НАТ-1, что приводит к увеличению уровня ацетилирования гистонов на промоторах генов-регуляторов окислительного метаболизма *PGC-1 α* , *Tfam*, *NRF1*, *NRF2*, *UCP2* и *UCP3* [92].

В условиях функциональной разгрузки уже после первых суток вывешивания в камбаловидной мышце крыс происходит значительное накопление HDAC4 в ядерной фракции, одновременно со снижением активности АМПК и инактивацией экспрессии медленной изоформы ТЦМ, при этом фармакологическая активация АМПК или фармакологическое ингибирование HDAC4 приводят к предотвращению снижения экспрессии мРНК

медленной изоформы ТЦМ [30, 109]. Таким образом, снижение фосфорилирования АМПК на первых сутках вывешивания приводит к накоплению в миоцарах HDAC4, что вносит вклад в снижение уровня экспрессии мРНК медленной изоформы ТЦМ.

Накопление HDAC4 в мышечных ядрах наблюдалось и после 10-суточной иммобилизации в *m. gastrocnemius* крыс [110]. После трех суток вывешивания в камбаловидной мышце крыс также были обнаружены накопление в миоцарах HDAC1 и снижение содержания p300. Ингибирование HDAC1 предотвращало увеличение экспрессии мРНК Atrogin-1 и снижение содержания p300 [111]. После 7 сут вывешивания крыс в миоцарах камбаловидных мышц наблюдаются снижение содержания p300 и увеличение содержания HDAC4, причем восстановление опорной афферентации предотвращает оба эти эффекта, как и снижение экспрессии медленной изоформы ТЦМ [112]. После 10 дней вывешивания в камбаловидной мышце крыс наблюдаются деацетилирование гистонов H3 на промоторе медленной изоформы ТЦМ и повышенное ацетилирование гистонов на промоторах изоформ ТЦМ Pd/x и ПВ [113]. Соответственно HDAC классов Pa и I активируются как минимум на некоторых этапах функциональной разгрузки скелетных мышц, что сопровождается соответствующими эпигенетическими изменениями на промоторах ряда генов. Схема взаимосвязей между функционированием митохондрий и эпигенетической регуляцией представлена на рис. 2.

Рост соотношения АТФ к АДФ в скелетной мышце ведет к инактивации АМПК, что, с одной стороны, может вести к увеличению соотношения SAM: SAH и активации Dnmt3a и 3b, а с другой стороны, блокирует активность Dnmt1, что может способствовать инактивации биогенеза митохондрий. Инактивация АМПК также способствует блокированию транслоказ ТЕТ. Инактивации ТЕТ способствует и снижение уровня альфа-кетоглутарата, интермедиата цикла Кребса. Параллельно с этим инактивация АМПК способствует снижению содержания ацетил-КоА, субстрата для работы гистонацетилтрансфераз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Потенциальная связь снижения уровня окислительного метаболизма и изменения паттерна эпигенетических модификаций при функциональной разгрузке скелетных мышц

Известно, что уже после первых суток функциональной разгрузки скелетных мышц в миоплазме происходит накопление макроэргических фосфатов, которое сопровождается инактивацией АМПК. АМПК способна контролировать ряд эпигенетических модификаций, включая метилирование CpG-островков и ацетилирование гистонов на промоторах генов, принимающих непосредственное участие в регуляции фенотипа мышечных волокон и их метаболизма. Одновременно с инактивацией АМПК развивается и нарушение функций митохондрий, которое, помимо прочих эффектов, приводит к рассогласованию активности ферментов цикла Кребса и снижению содержания в мышечных волокнах основного субстрата транслоказ ТЕТ альфа-кетоглутарата. Таким образом, не исключено, что наблюдаемое на некоторых этапах функциональной разгрузки мышц эпигенетическое блокирование экспрессии генов (таких как *NOS1*, *PPARG1α*, *myh7*) вызвано инактивацией АМПК и снижением содержания альфа-кетоглутарата. Относительный вклад этих двух явлений в эпигенетическое блокирование экспрессии конкретных генов, как и регуляторные взаимосвязи между инактивацией АМПК и нарушением функций митохондрий, еще предстоит исследовать.

ВЫВОД

В данном обзоре было рассмотрено состояние митохондрий при различных моделях функциональной разгрузки скелетных мышц и проанализированы исследования, посвященные особенностям эпигенетического состояния ряда генов, экспрессия которых необходима для поддержания окислительного, устойчивого к утомлению фенотипа мышечных волокон. По итогам изложенного можно заключить, что нарушение функций митохондрий на ранних этапах функциональной раз-

грузки мышц приводит к рассогласованию работы ферментов дыхательной цепи и цикла Кребса, что сопровождается изменениями относительного содержания интермедиатов цикла Кребса и накоплением АФК. Одновременно с этим происходит накопление макроэргических фосфатов, вызванное инактивацией мышц, и инактивация АМПК. Эти изменения должны неизбежно вести к изменениям в уровне CpG-метилирования ДНК и ацетилирования гистонов, поскольку интермедиаты цикла Кребса и АМПК регулируют работу ферментов, реализующих эти модификации. Ряд работ, посвященных анализу эпигенетического статуса некоторых генов в условиях функциональной разгрузки, показывает, что репрессорные модификации ДНК и гистонов характерны для генов медленной изоформы тяжелых цепей миозина, нейрональной NO-синтазы и PGC1-α. Таким образом, не исключено, что именно нарушения функционирования митохондрий ведут к эпигенетическим изменениям и снижению уровней экспрессии этих генов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 21-75-00063.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Memme JM, Slavin M, Moradi N, Hood DA (2021) Mitochondrial Bioenergetics and Turnover during Chronic Muscle Disuse. *Int J Mol Sci* 22 (10): 5179. <https://doi.org/10.3390/ijms22105179>
2. Romanello V, Sandri M (2021) The connection between the dynamic remodeling of the mitochondrial network and the regulation of muscle mass. *Cell Mol Life Sci* 78 (4): 1305–1328. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03662-0>
3. Ohira Y, Yasui W, Kariya F, Wakatsuki T, Nakamura K, Asakura T, Edgerton VR (1994) Metabolic adaptation of skeletal muscles to gravitational unloading. *Acta Astronaut* 33: 113–117.
4. Desplanches D, Mayet MH, Sempore B, Flandrois R (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol* (1985) 63 (2): 558–563. <https://doi.org/10.1152/jappl.1987.63.2.558>
5. Hirayama Y, Nakanishi R, Maeshige N, Fujino H (2017) Preventive effects of nucleoprotein supplementation combined with intermittent loading on capillary regres-

- sion induced by hindlimb unloading in rat soleus muscle. *Physiol Rep* 5 (4).
<https://doi.org/10.14814/phy2.13134>
6. *Fell RD, Steffen JM, Musacchia XJ* (1985) Effect of hypokinesia-hypodynamia on rat muscle oxidative capacity and glucose uptake. *Am J Physiol* 249 (3 Pt 2): R308–R312.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1985.249.3.R308>
 7. *Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Suzuki H, Kouzaki M, Takeda I, Ishihara A* (2011) PGC-1 α and FOXO1 mRNA levels and fiber characteristics of the soleus and plantaris muscles in rats after hindlimb unloading. *Histol Histopathol* 26 (12): 1545–1553.
<https://doi.org/10.14670/HH-26.1545>
 8. *Fitts RH, Brimmer CJ, Heywood-Cooksey A, Timmerman RJ* (1989) Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *Am J Physiol* 256 (5 Pt 1): C1082–C1091.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.256.5.C1082>
 9. *Ohira T, Kawano F, Ohira T, Goto K, Ohira Y* (2015) Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading. *J Physiol Sci* 65 (4): 293–310.
<https://doi.org/10.1007/s12576-015-0375-6>
 10. *Yajid F, Mercier JG, Mercier BM, Dubouchaud H, Prefaut C* (1998) Effects of 4 wk of hindlimb suspension on skeletal muscle mitochondrial respiration in rats. *J Appl Physiol* (1985) 84 (2): 479–485.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.479>
 11. *Zhang X, Trevino MB, Wang M, Gardell SJ, Ayala JE, Han X, Kelly DP, Goodpaster BH, Vega RB, Coen PM* (2018) Impaired Mitochondrial Energetics Characterize Poor Early Recovery of Muscle Mass Following Hind Limb Unloading in Old Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 73 (10): 1313–1322.
<https://doi.org/10.1093/gerona/gly051>
 12. *Шенкман БС, Матвеева ОА, Мазин МГ, Немировская ТЛ, Киселева ЕВ, Козловская ИБ* (2003) Пластичность клеточных и тканевых структур *m. soleus* человека в условиях длительной гипокинезии. *Биол мембр* 20 (1): 77–86. [Shenkman BS, Matveyeva OA, Mazin MG, Nemirovskaya TL, Kiseleva YE, Kozlovskaya IB (2003) Plasticity of cellular and tissue structures *m. human soleus* under conditions of prolonged hypokinesia. *Biol membr* 20 (1): 77–86. (In Russ)].
 13. *Шенкман Б, Виноградова О, Мазин М, Киселева Е, Белозерова И, Немировская Т, Трушева Т, Тихомиров Е* (2003) Физиологическая стоимость физической нагрузки и объем митохондрий рабочих мышц у людей в условиях длительной гипокинезии. Эффекты резистивных локальных нагрузок. *Физиология человека* 29 (2): 75–80. [Shenkman B, Vinogradova O, Mazin M, Kiseleva Ye, Belozerova I, Nemirovskaya T, Trushcheva T, Tikhomirov Ye (2003) Physiological cost of physical activity and mitochondrial volume of working muscles in humans under conditions of prolonged hypokinesia. Effects of resistive local load. *Human Physiol* 29 (2): 75–80. (In Russ)].
 14. *Trevino MB, Zhang X, Standley RA, Wang M, Han X, Reis FCG, Periasamy M, Yu G, Kelly DP, Goodpaster BH, Vega RB, Coen PM* (2019) Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317 (5): E899–E910.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00161.2019>
 15. *Lechado ITA, Vitadello M, Traini L, Namuduri AV, Gastaldello S, Gorza L* (2018) Sarcolemmal loss of active nNOS (Nos1) is an oxidative stress-dependent, early event driving disuse atrophy. *J Pathol* 246 (4): 433–446.
<https://doi.org/10.1002/path.5149>
 16. *Gomez-Cabrera MC, Arc-Chagnaud C, Salvador-Pascual A, Brioché T, Chopard A, Olaso-Gonzalez G, Vina J* (2020) Redox modulation of muscle mass and function. *Redox Biol* 35: 101531.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101531>
 17. *Max SR* (1972) Disuse atrophy of skeletal muscle: loss of functional activity of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 46 (3): 1394–1398.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(72\)80130-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(72)80130-x)
 18. *Larsen S, Lundby AM, Dandanell S, Oberholzer L, Keiser S, Andersen AB, Haider T, Lundby C* (2018) Four days of bed rest increases intrinsic mitochondrial respiratory capacity in young healthy males. *Physiol Rep* 6 (18): e13793.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13793>
 19. *Theeuwes WF, Gosker HR, Langen RCJ, Verhees KJP, Pansters NAM, Schols A, Remels AHV* (2017) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) enhances skeletal muscle oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863 (12): 3075–3086.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.018>
 20. *Liu J, Peng Y, Cui Z, Wu Z, Qian A, Shang P, Qu L, Li Y, Liu J, Long J* (2012) Depressed mitochondrial biogenesis and dynamic remodeling in mouse tibialis anterior and gastrocnemius induced by 4-week hindlimb unloading. *IUBMB Life* 64 (11): 901–910.
<https://doi.org/10.1002/iub.1087>
 21. *Standley RA, Distefano G, Trevino MB, Chen E, Nairn NR, Greenwood B, Kondakci G, Tolstikov VV, Kiebish MA, Yu G, Qi F, Kelly DP, Vega RB, Coen PM, Goodpaster BH* (2020) Skeletal Muscle Energetics and Mitochondrial Function Are Impaired Following 10 Days of Bed Rest in Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 75 (9): 1744–1753.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glaa001>
 22. *Bilet L, Phielix E, van de Weijer T, Gemmink A, Bosma M, Moonen-Kornips E, Jorgensen JA, Schaart G, Zhang D, Meijer K, Hopman M, Hesselink MKC, Ouwens DM, Shulman GI, Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P* (2020) One-leg inactivity induces a reduction in mitochondrial oxidative capacity, intramyocellular lipid accumulation and reduced insulin signalling upon lipid infusion: a human study with unilateral limb suspension. *Diabetologia* 63 (6): 1211–1222.
<https://doi.org/10.1007/s00125-020-05128-1>
 23. *Connor MK, Hood DA* (1998) Effect of microgravity on the expression of mitochondrial enzymes in rat cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* (1985) 84 (2): 593–598.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.2.593>
 24. *Tascher G, Brioché T, Maes P, Chopard A, O’Gorman D, Gauquelin-Koch G, Blanc S, Bertile F* (2017) Proteome-wide Adaptations of Mouse Skeletal Muscles during a

- Full Month in Space. *J Proteome Res* 16 (7): 2623–2638. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00201>
25. *Mazin MG, Kiselyova EV, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2000) Ultrastructure of skeletal muscles of rhesus monkeys after spaceflight. *J Gravit Physiol* 7 (1): S59–S62.
 26. *Shenkman BS, Nemirovskaya TL, Belozherova IN, Mazin MG, Matveeva OA* (2002) Mitochondrial adaptations in skeletal muscle cells in mammals exposed to gravitational unloading. *J Gravit Physiol* 9 (1): 159–162.
 27. *Desplanches D, Kayar SR, Sempore B, Flandrois R, Hoppele H* (1990) Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* (1985) 69 (2): 504–508. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.69.2.504>
 28. *Shenkman BS* (2020) How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals. *Int J Mol Sci* 21 (14). <https://doi.org/10.3390/ijms21145037>
 29. *Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB* (1999) Intracellular Ca²⁺ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* (1985) 87 (1): 386–390. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>
 30. *Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Nemirovskaya TL, Mirzoev TM, Turtikova OV, Shenkman BS* (2017) Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol* 595 (23): 7123–7134. <https://doi.org/10.1113/JP275184>
 31. *Kravtsova VV, Matchkov VV, Bouzinova EV, Vasiliev AN, Razgovorova IA, Heiny JA, Krivoi, II* (2015) Isoform-specific Na,K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle. *Biomed Res Int* 2015 (720172). <https://doi.org/10.1155/2015/720172>
 32. *Krivoi II, Kravtsova VV, Altaeva EG, Kubasov IV, Prokofev AV, Drabkina TM, Nikol'skii EE, Shenkman BS* (2008) [Decrease in the electrogenic contribution of Na,K-ATPase and resting membrane potential as a possible mechanism of calcium ion accumulation in filaments of the rat musculus soleus subjected to the short-term gravity unloading]. *Biofizika* 53 (6): 1051–1057.
 33. *Henriksen EJ, Tischler ME* (1988) Time course of the response of carbohydrate metabolism to unloading of the soleus. *Metabolism* 37 (3): 201–208.
 34. *Vilchinskaya NA, Mirzoev TM, Lomonosova YN, Kozlovskaya IB, Shenkman BS* (2015) Human muscle signaling responses to 3-day head-out dry immersion. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 15 (3): 286–293.
 35. *Zaripova KA, Kalashnikova EP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2021) Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 22 (19): 10444. <https://doi.org/10.3390/ijms221910444>
 36. *Ingalls CP, Wenke JC, Armstrong RB* (2001) Time course changes in [Ca²⁺]_i, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat Space Environ Med* 72 (5): 471–476.
 37. *Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2008) Calcium-dependent signaling mechanisms and soleus fiber remodeling under gravitational unloading. *J Muscle Res Cell Motil* 29 (6–8): 221–230. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9164-7>
 38. *Li A, Yi J, Li X, Zhou J* (2020) Physiological Ca(2+) Transients Versus Pathological Steady-State Ca(2+) Elevation, Who Flips the ROS Coin in Skeletal Muscle Mitochondria. *Front Physiol* 11 595800. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595800>
 39. *Karam C, Yi J, Xiao Y, Dhakal K, Zhang L, Li X, Manano C, Xu J, Li K, Cheng H, Ma J, Zhou J* (2017) Absence of physiological Ca(2+) transients is an initial trigger for mitochondrial dysfunction in skeletal muscle following denervation. *Skelet Muscle* 7 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0123-0>
 40. *Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, Shiomu T, Zalk R, Lacampagne A, Marks AR* (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 14 (2): 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.014>
 41. *Matecki S, Dridi H, Jung B, Saint N, Reiken SR, Scheuermann V, Mrozek S, Santulli G, Umanskaya A, Petrof BJ, Jaber S, Marks AR, Lacampagne A* (2016) Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (32): 9069–9074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609707113>
 42. *Sharlo K, Lvova I, Turtikova O, Tyganov S, Kalashnikov V, Shenkman B* (2022) Plantar stimulation prevents the decreases in fatigue resistance and mitochondrial biogenesis in rat m soleus under 7 days of hindlimb suspension. *Arch Biochem Biophys* 718 (142): 109–150. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109150>
 43. *Lomonosova YN, Kalamkarov GR, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kartashkina NL, Lysenko EA, Shvets VI, Nemirovskaya TL* (2011) Protective effect of L-Arginine administration on proteins of unloaded m. soleus. *Biochemistry (Mosc)* 76 (5): 571–580. <https://doi.org/10.1134/S0006297911050075>
 44. *Agnetti G, Herrmann H, Cohen S* (2022) New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *FEBS J*. <https://doi.org/10.1111/febs.15864>
 45. *Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y* (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 150 (6): 1283–1298. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1283>
 46. *Petrova IO, Tyganov SA, Mirzoev TM, Tsaturyan AK, Kozlovskaya IB, Shenkman BS* (2018) Early Desmalle, Cyrillicline in Rat Soleus Passive Tension with Hindlimb Unloading: Inactivation of Cross-bridges or Activation of Calpains? *Dokl Biochem Biophys* 481 (1): 205–207. <https://doi.org/10.1134/S1607672918040075>
 47. *Мирзоев ТМ, Веселова ОМ, Ларина ИМ, Шенкман БС, Огнева ИВ* (2012) Параметры клеточного дыхания волокон и содержание десмина в камбаловидной мышце крысы на ранних этапах гравитационной разгрузки. *Биофизика* 57 (3): 509–514. [*Mirzoyev TM, Vecelova OM, Larina IM, Shenkman BS, Ogneva IV* (2012) Parameters of cellular respiration of fibers and the content of desmin in the rat soleus muscle at the early

- stage of gravitational unloading. *Biofizika* 57 (3): 509–514. (In Russ)].
48. Hyatt HW, Ozdemir M, Yoshihara T, Nguyen BL, Deminice R, Powers SK (2021) Calpains play an essential role in mechanical ventilation-induced diaphragmatic weakness and mitochondrial dysfunction. *Redox Biol* 38 101802. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101802>
 49. Herzig S, Shaw RJ (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19 (2): 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
 50. Adams GR, Haddad F, Baldwin KM (1994) Interaction of chronic creatine depletion and muscle unloading: effects on postural locomotor muscles. *J Appl Physiol* (1985) 77 (3): 1198–1205. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.3.1198>
 51. Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B (2016) Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading. *Cell Physiol Biochem* 39 (3): 1011–1020. <https://doi.org/10.1159/000447808>
 52. Gupta RC, Misulis KE, Dettbarn WD (1989) Activity dependent characteristics of fast and slow muscle: biochemical and histochemical considerations. *Neurochem Res* 14 (7): 647–655. <https://doi.org/10.1007/BF00964874>
 53. Tyganov SA, Mochalova EP, Belova SP, Sharlo KA, Rozhkov SV, Vilchinskaya NA, Paramonova II, Mirzoev TM, Shenkman BS (2019) Effects of Plantar Mechanical Stimulation on Anabolic and Catabolic Signaling in Rat Postural Muscle Under Short-Term Simulated Gravitational Unloading. *Front Physiol* 10: 1252. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01252>
 54. Rosa-Caldwell ME, Brown JL, Perry RA Jr, Shimkus KL, Shirazi-Fard Y, Brown LA, Hogan HA, Fluckey JD, Washington TA, Wiggs MP, Greene NP (2020) Regulation of mitochondrial quality following repeated bouts of hindlimb unloading. *Appl Physiol Nutr Metab* 45 (3): 264–274. <https://doi.org/10.1139/apnm-2019-0218>
 55. Sharlo KA, Paramonova, II, Lvova ID, Vilchinskaya NA, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS (2020) NO-Dependent Mechanisms of Myosin Heavy Chain Transcription Regulation in Rat Soleus Muscle After 7-Days Hindlimb Unloading. *Front Physiol* 11: 814. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00814>
 56. Theilen NT, Jeremic N, Weber GJ, Tyagi SC (2018) Exercise preconditioning diminishes skeletal muscle atrophy after hindlimb suspension in mice. *J Appl Physiol* (1985) 125 (4): 999–1010. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00137.2018>
 57. Qi Z, Zhang Y, Guo W, Ji L, Ding S (2012) Increased insulin sensitivity and distorted mitochondrial adaptations during muscle unloading. *Int J Mol Sci* 13 (12): 16971–16985. <https://doi.org/10.3390/ijms131216971>
 58. Kang C, Ji LL (2013) Muscle immobilization and remobilization downregulates PGC-1 α signaling and the mitochondrial biogenesis pathway. *J Appl Physiol* (1985) 115 (11): 1618–1625. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01354.2012>
 59. Gambará G, Salanova M, Ciciliot S, Furlan S, Gutsmann M, Schiffli G, Ungethuem U, Volpe P, Gunga HC, Blottnner D (2017) Gene Expression Profiling in Slow-Type Calf Soleus Muscle of 30 Days Space-Flown Mice. *PLoS One* 12 (1): e0169314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169314>
 60. Buso A, Comelli M, Picco R, Isola M, Magnesa B, Pisot R, Rittweger J, Salvadeo D, Simunic B, Grassi B, Mavelli I (2019) Mitochondrial Adaptations in Elderly and Young Men Skeletal Muscle Following 2 Weeks of Bed Rest and Rehabilitation. *Front Physiol* 10: 474. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00474>
 61. Fernandez-Gonzalo R, Irimia JM, Cusso R, Gustafsson T, Linne A, Tesch PA (2014) Flywheel resistance exercise to maintain muscle oxidative potential during unloading. *Aviat Space Environ Med* 85 (7): 694–699. <https://doi.org/10.3357/asem.3856.2014>
 62. Rittweger J, Albracht K, Fluck M, Ruoss S, Brocca L, Longa E, Moriggi M, Seynnes O, Di Giulio I, Tenori L, Vignoli A, Capri M, Gelfi C, Luchinat C, Francheschi C, Bottinelli R, Cerretelli P, Narici M (2018) Sarcolab pilot study into skeletal muscle's adaptation to long-term spaceflight. *NPJ Microgravity* 4: 18. <https://doi.org/10.1038/s41526-018-0052-1>
 63. Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, Matsuda R (2011) Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol Cell Biochem* 350 (1–2): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0677-1>
 64. Kenny HC, Tascher G, Ziemianin A, Rudwill F, Zahariev A, Chery I, Gauquelin-Koch G, Barielle MP, Heer M, Blanc S, O'Gorman DJ, Bertile F (2020) Effectiveness of Resistive Vibration Exercise and Whey Protein Supplementation Plus Alkaline Salt on the Skeletal Muscle Proteome Following 21 Days of Bed Rest in Healthy Males. *J Proteome Res* 19 (8): 3438–3451. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00256>
 65. Cho Y, Hazen BC, Gandra PG, Ward SR, Schenk S, Russell AP, Kralli A (2016) Per1 enhances mitochondrial biogenesis, oxidative capacity, and fatigue resistance in adult skeletal muscle. *FASEB J* 30 (2): 674–687. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276360>
 66. Lvova ID, Sharlo KA, Rozhkov SV, Mirzoev TM, Shenkman BS (2021) The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 Activity in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis in Rat Postural Muscle under Hindlimb Unloading. *Biochemistry (Moscow) Suppl SerA: Membr Cell Biol* 16: 372–377. <https://doi.org/10.31857/S0233475521060074>
 67. Lomonosova YN, Turtikova OV, Shenkman BS (2016) Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motil* 37 (1–2): 7–16. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9428-y>
 68. Leermakers PA, Kneppers AEM, Schols A, Kelders M, de Theije CC, Verdijk LB, van Loon LJC, Langen RCJ, Gosker HR (2019) Skeletal muscle unloading results in in-

- creased mitophagy and decreased mitochondrial biogenesis regulation. *Muscle Nerve* 60 (6): 769–778.
<https://doi.org/10.1002/mus.26702>
69. *Rosa-Caldwell ME, Lim S, Haynie WS, Brown JL, Lee DE, Dunlap KR, Jansen LT, Washington TA, Wiggs MP, Greene NP* (2021) Mitochondrial aberrations during the progression of disuse atrophy differentially affect male and female mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 12 (6): 2056–2068.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12809>
 70. *Kang C, Ji LL* (2016) PGC-1 α overexpression via local transfection attenuates mitophagy pathway in muscle disuse atrophy. *Free Radic Biol Med* 93: 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.032>
 71. *Drake JC, Wilson RJ, Laker RC, Guan Y, Spaulding HR, Nichenko AS, Shen W, Shang H, Dorn MV, Huang K, Zhang M, Bandara AB, Brisendine MH, Kashatus JA, Sharma PR, Young A, Gautam J, Cao R, Wallrabe H, Chang PA, Wong M, Desjardins EM, Hawley SA, Christ GJ, Kashatus DF, Miller CL, Wolf MJ, Periasamy A, Steinberg GR, Hardie DG, Yan Z* (2021) Mitochondria-localized AMPK responds to local energetics and contributes to exercise and energetic stress-induced mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118 (37): e2025932118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2025932118>
 72. *Kang C, Yeo D, Ji LL* (2016) Muscle immobilization activates mitophagy and disrupts mitochondrial dynamics in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 218 (3): 188–197.
<https://doi.org/10.1111/apha.12690>
 73. *Standley RA, Distefano G, Pereira SL, Tian M, Kelly OJ, Coen PM, Deutz NEP, Wolfe RR, Goodpaster BH* (2017) Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on skeletal muscle mitochondrial content and dynamics, and lipids after 10 days of bed rest in older adults. *J Appl Physiol* (1985) 123 (5): 1092–1100.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00192.2017>
 74. *Zorzano A* (2009) Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 34 (3): 433–439.
<https://doi.org/10.1139/H09-049>
 75. *Gowher H, Jeltsch A* (2018) Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. *Biochem Soc Trans* 46 (5): 1191–1202.
<https://doi.org/10.1042/BST20170574>
 76. *Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A* (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324 (5929): 930–935.
<https://doi.org/10.1126/science.1170116>
 77. *Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y* (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333 (6047): 1300–1303.
<https://doi.org/10.1126/science.1210597>
 78. *An J, Rao A, Ko M* (2017) TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Exp Mol Med* 49 (4): e323.
<https://doi.org/10.1038/emm.2017.5>
 79. *Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D* (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40 (1): 91–99.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90312-5)
 80. *Saxonov S, Berg P, Brutlag DL* (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (5): 1412–1417.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
 81. *Moore LD, Le T, Fan G* (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23–38.
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
 82. *Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T* (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24 (1): 88–91.
<https://doi.org/10.1038/71750>
 83. *Titcombe P, Murray R, Hewitt M, Antoun E, Cooper C, Inskip HM, Holbrook JD, Godfrey KM, Lillycrop K, Hanson M, Barton SJ* (2021) Human non-CpG methylation patterns display both tissue-specific and inter-individual differences suggestive of underlying function. *Epigenetics* 1–12.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1950990>
 84. *Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, Li E, Zhang Y, Sun YE* (2010) Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 329 (5990): 444–448.
<https://doi.org/10.1126/science.1190485>
 85. A FCL (2020) Mitochondrial metabolism and DNA methylation: a review of the interaction between two genomes. *Clin Epigenetics* 12 (1): 182.
<https://doi.org/10.1186/s13148-020-00976-5>
 86. *Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K* (2014) Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: epigenetic impact on the aging process. *Ageing Res Rev* 16: 45–65.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.05.004>
 87. *Yang Q, Liang X, Sun X, Zhang L, Fu X, Rogers CJ, Berim A, Zhang S, Wang S, Wang B, Foretz M, Viollet B, Gang DR, Rodgers BD, Zhu MJ, Du M* (2016) AMPK/ α -Ketoglutarate Axis Dynamically Mediates DNA Demethylation in the Prdm16 Promoter and Brown Adipogenesis. *Cell Metab* 24 (4): 542–554.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.010>
 88. *Wu D, Hu D, Chen H, Shi G, Fetahu IS, Wu F, Rabidou K, Fang R, Tan L, Xu S, Liu H, Argueta C, Zhang L, Mao F, Yan G, Chen J, Dong Z, Lv R, Xu Y, Wang M, Ye Y, Zhang S, Duquette D, Geng S, Yin C, Lian CG, Murphy GF, Adler GK, Garg R, Lynch L, Yang P, Li Y, Lan F, Fan J, Shi Y, Shi YG* (2018) Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature* 559 (7715): 637–641.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0350-5>
 89. *Zhang T, Guan X, Choi UL, Dong Q, Lam MMT, Zeng J, Xiong J, Wang X, Poon TCW, Zhang H, Zhang X, Wang H, Xie R, Zhu B, Li G* (2019) Phosphorylation of TET2 by AMPK is indispensable in myogenic differentiation. *Epigen Chromatin* 12 (1): 32.
<https://doi.org/10.1186/s13072-019-0281-x>

90. *Matuleviciute R, Cunha PP, Johnson RS, Foskolou IP* (2021) Oxygen regulation of TET enzymes. *FEBS J* 288 (24): 7143–7161. <https://doi.org/10.1111/febs.15695>
91. *Zhong T, Men Y, Lu L, Geng T, Zhou J, Mitsuhashi A, Shozu M, Maihle NJ, Carmichael GG, Taylor HS, Huang Y* (2017) Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene* 36 (17): 2345–2354. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.391>
92. *Marin TL, Gongol B, Zhang F, Martin M, Johnson DA, Xiao H, Wang Y, Subramaniam S, Chien S, Shyy JY* (2017) AMPK promotes mitochondrial biogenesis and function by phosphorylating the epigenetic factors DNMT1, RBBP7, and HAT1. *Sci Signal* 10 (464): eaaf 7478. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf7478>
93. *Cao K, Lv W, Wang X, Dong S, Liu X, Yang T, Xu J, Zeng M, Zou X, Zhao D, Ma Q, Lin M, Long J, Zang W, Gao F, Feng Z, Liu J* (2021) Hypermethylation of Hepatic Mitochondrial ND6 Provokes Systemic Insulin Resistance. *Adv Sci (Weinh)* 8 (11): 2004507. <https://doi.org/10.1002/advs.202004507>
94. *Furukawa T, Tanimoto K, Fukazawa T, Imura T, Kawahara Y, Yuge L* (2018) Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations. *NPJ Microgravity* 4: 11. <https://doi.org/10.1038/s41526-018-0045-0>
95. *Tomiga Y, Ito A, Sudo M, Ando S, Eshima H, Sakai K, Nakashima S, Uehara Y, Tanaka H, Soejima H, Higaki Y* (2019) One week, but not 12 hours, of cast immobilization alters promoter DNA methylation patterns in the nNOS gene in mouse skeletal muscle. *J Physiol* 597 (21): 5145–5159. <https://doi.org/10.1113/JP277019>
96. *Alibegovic AC, Sonne MP, Hojbjerg L, Bork-Jensen J, Jacobsen S, Nilsson E, Faerch K, Hiscock N, Mortensen B, Friedrichsen M, Stallknecht B, Dela F, Vaag A* (2010) Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299 (5): E752–E763. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00590.2009>
97. *Begue G, Raue U, Jemiolo B, Trappe S* (2017) DNA methylation assessment from human slow- and fast-twitch skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985) 122 (4): 952–967. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00867.2016>
98. *Rye PT, Frick LE, Ozbal CC, Lamarr WA* (2011) Advances in label-free screening approaches for studying histone acetyltransferases. *J Biomol Screen* 16 (10): 1186–1195. <https://doi.org/10.1177/1087057111418653>
99. *Graff J, Tsai LH* (2013) Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci* 14 (2): 97–111. <https://doi.org/10.1038/nrn3427>
100. *Sun XJ, Man N, Tan Y, Nimer SD, Wang L* (2015) The Role of Histone Acetyltransferases in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Front Oncol* 5: 108. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00108>
101. *Tian H, Liu S, Ren J, Lee JKW, Wang R, Chen P* (2020) Role of Histone Deacetylases in Skeletal Muscle Physiology and Systemic Energy Homeostasis: Implications for Metabolic Diseases and Therapy. *Front Physiol* 11: 949. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00949>
102. *Liu Y, Randall WR, Schneider MF* (2005) Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 168 (6): 887–897. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408128>
103. *McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN* (2001) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21 (18): 6312–6321.
104. *Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV, Jr., de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E* (2013) Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339 (6116): 211–214. <https://doi.org/10.1126/science.1227166>
105. *Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y* (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298 (4): E751–E760. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00745.2009>
106. *Chen J, Wang Y, Hamed M, Lacroix N, Li Q* (2015) Molecular Basis for the Regulation of Transcriptional Coactivator p300 in Myogenic Differentiation. *Sci Rep* 5: 13727. <https://doi.org/10.1038/srep13727>
107. *Poizat C, Puri PL, Bai Y, Kedes L* (2005) Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 25 (7): 2673–2687. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2673-2687.2005>
108. *Galdieri L, Gatla H, Vancurova I, Vancura A* (2016) Activation of AMP-activated Protein Kinase by Metformin Induces Protein Acetylation in Prostate and Ovarian Cancer Cells. *J Biol Chem* 291 (48): 25154–25166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.742247>
109. *Paramonova II, Vilchinskaya NA, Shenkman BS* (2021) HDAC4 Is Indispensable for Reduced Slow Myosin Expression at the Early Stage of Hindlimb Unloading in Rat Soleus Muscle. *Pharmaceuticals (Basel)* 14 (11): 1167. <https://doi.org/10.3390/ph14111167>
110. *Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Sugiura T, Naito H* (2016) Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci* 66 (4): 337–343. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0432-1>

111. Mochalova EP, Belova SP, Mirzoev TM, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2019) Atrogin-1/MAFbx mRNA expression is regulated by histone deacetylase 1 in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *Sci Rep* 9 (1): 10263. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46753-0>
112. Sharlo KA, Paramonova II, Lvova ID, Mochalova EP, Kalashnikov VE, Vilchinskaya NA, Tyganov SA, Konstantinova TS, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS (2021) Plantar Mechanical Stimulation Maintains Slow Myosin Expression in Disused Rat Soleus Muscle via NO-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 22. (3): 1372. <https://doi.org/10.3390/ijms22031372>
113. Pandorf CE, Haddad F, Wright C, Bodell PW, Baldwin KM (2009) Differential epigenetic modifications of histones at the myosin heavy chain genes in fast and slow skeletal muscle fibers and in response to muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 297 (1): C6–C16. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00075.2009>

INTERACTION OF OXIDATIVE METABOLISM AND EPIGENETIC REGULATION OF GENE EXPRESSION UNDER MUSCLE FUNCTIONAL UNLOADING

K. A. Sharlo^{a,#}, I. D. Lvova^a, and B. S. Shenkman^a

^a Institute of Biomedical Problems GRC RF RAS, Moscow, Russia

[#]e-mail: sharlokris@gmail.com

It is widely known that under both real and simulated microgravity conditions, there is a decrease in the level of oxidative metabolism in the skeletal muscles of humans and animals. In recent years, it has become known that one of the consequences of decreased oxidative metabolism may be a change in the epigenetic status of certain genes. There are also data suggesting an important role of epigenetic control of gene expression in the development of negative changes in muscles under real or simulated microgravity. The review is devoted to the analysis and systematization of data on the state of oxidative metabolism and epigenetic control of gene expression in skeletal muscles under conditions of functional unloading. It addresses molecular interactions between the key regulators of oxidative metabolism and epigenetic modifications. Here, we also formulate a hypothesis about the role of oxidative metabolism in the epigenetic blocking of the expression of certain genes that determine a slow-twitch fatigue-resistant phenotype of muscle fibers.

Keywords: oxidative metabolism, epigenetics, functional unloading, skeletal muscle, mitochondria

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ЦЕСТОД, ОБИТАЮЩИХ В КИШЕЧНИКАХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РЫБ, НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

© 2022 г. Т. В. Фролова^{1,*}, Г. И. Извекова¹

¹ Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Ярославская область, Некоузский район, п. Борок, Россия

*e-mail: bianka28061981@gmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.

После доработки 16.02.2022 г.

Принята к публикации 18.02.2022 г.

Установлено, что шесть исследованных видов цестод (*Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786), *P. sagittus* (Grimm, 1872), *P. cernuae* (Gmelin, 1790), *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786), *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781), *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781)), обитающих в кишечниках рыб (елец *Leuciscus leuciscus* L., голец *Barbatula barbatula* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L., синец *Ballerus ballerus* L., налим *Lota lota* L., щука *Esox lucius* Linnaeus, лещ *Abramis brama* L.), изменяют активность протеолитических ферментов слизистой оболочки кишечника хозяина. Независимо от направленности влияния цестод на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника их хозяев (снижение или повышение этой активности при заражении) важная составляющая влияния — способность всех исследованных цестод ингибировать протеолитическую активность хозяев и активность коммерческого препарата трипсина. Для некоторых видов цестод эффект ингибирующей способности сопоставим с аналогичным влиянием синтетического ингибитора сериновых протеиназ — PMSF.

Ключевые слова: рыбы, цестоды, протеолитическая активность, ингибиторы протеиназ

DOI: 10.31857/S0044452922030032

Известно, что на активность ферментов, функционирующих в пищеварительном тракте позвоночных животных, в том числе рыб, влияет большое количество абиотических и биотических факторов [1, 2]. Одним из этих факторов может быть заражение паразитами, и в частности цестодами [3]. Для понимания природы паразитизма большое значение имеет знание механизмов, с помощью которых паразиты влияют на утилизацию питательных веществ хозяевами. Паразитирующие в кишечнике гельминты менее подвержены влиянию иммунных систем хозяина, но постоянно должны противостоять действию его пищеварительных ферментов. Для выживания в кишечнике хозяина паразитическим червям необходимо наличие специфических ингибиторов протеиназ, которые способны эффективно инактивировать протеиназы хозяина в их среде обитания, полости кишечника [4]. У гельминтов есть несколько механизмов защиты от протеиназ хозяина, один из которых связан с ингибированием его протеолитических ферментов [3, 4]. Существует большое количество белковых ингибиторов протеиназ паразитарного происхождения [5]. Большинство этих веществ — ингибиторы сериновых протеиназ [6],

регулирующие их активность и контролирующие разнообразные процессы, связанные с этой активностью, в том числе защиту паразита от пищеварительных ферментов хозяина и, возможно, специфичность паразитирования [7–9].

Известно, что гельминты экскретируют или секретируют различные вещества в окружающую их среду обитания — кишечник хозяев. Взаимодействие между паразитом и его хозяином в основном осуществляется посредством секретируемых белков, в совокупности называемых “секретомом”. Белки, секретируемые паразитом, способны модифицировать окружающую среду хозяина и модулировать его иммунные реакции. Состав и функция этих белков варьируют в зависимости от экологии, образа жизни хозяина и окружающей среды [10]. Ингибиторы сериновых протеаз — важный компонент секреторных продуктов паразитов [9]. Кроме контроля за активностью протеиназ, экскреторно-секреторные продукты червей играют существенную роль в уклонении от иммунного ответа хозяина [11, 12]. Они также влияют на секрецию слизи в кишечнике [13] и продукцию антимикробных пептидов, что, в свою очередь, может сказываться на выживаемости бактерий и их пространственной

Таблица 1. Характеристики объектов исследования

Хозяин	Паразит	Количество зараженных рыб, экз.	Стандартная длина (SL), см	Навеска червей, г
Елец <i>Leuciscus leuciscus</i> L.	<i>Proteocephalus torulosus</i> (Batsch, 1786)	6	15.9 ± 0.8	0.33 ± 0.12
Голец <i>Barbatula barbatula</i> L.	<i>P. sagittus</i> (Grimm, 1872)	28	8.0 ± 0.1	0.27 ± 0.03
Ерш <i>Gymnocephalus cernuus</i> L.	<i>P. cernuae</i> (Gmelin, 1790)	24	7.5 ± 0.4	0.12 ± 0.01
Синец <i>Ballerus ballerus</i> L.	<i>P. torulosus</i>	8	27.4 ± 0.7	0.74 ± 0.02
Налим <i>Lota lota</i> L.	<i>Eubothrium rugosum</i> (Batsch, 1786)	14	42.2 ± 1.1	0.71 ± 0.06
Щука <i>Esox lucius</i> Linnaeus	<i>Triaenophorus nodulosus</i> (Pallas, 1781)	22	42.8 ± 1.9	0.51 ± 0.06
Лещ <i>Abramis brama</i> L.	<i>Caryophyllaeus laticeps</i> (Pallas, 1781)	15	34.4 ± 0.8	1.41 ± 0.1

организации [14]. Ингибиторы протеиназ, так же, как и сами протеиназы, играют важную роль в жизненном цикле паразитов, их вирулентности и патогенезе [15].

В настоящее время достигнуты значительные успехи в изучении генома, протеома и транскриптома гельминтов [16, 17], однако многие аспекты взаимодействия хозяин – паразит остаются неясными. По мнению некоторых авторов, для лучшего понимания эволюции ленточных червей и их влияния на организм хозяина необходимы обширные исследования, посвященные этой “низко патогенной и остающейся без внимания стадии развития” [18]. Представляется важным накопление фактического материала о продуцировании ингибиторов протеиназ разными видами цестод на различных стадиях жизненного цикла из хозяев, различающихся по типу питания и уровню обмена веществ. Эти данные необходимы для поиска общих закономерностей и отличительных особенностей взаимоотношений в системе паразит–хозяин на физиолого-биохимическом уровне.

В связи с этим цель работы – сравнить влияние различных видов цестод, обитающих в кишечниках семи пресноводных видов рыб, на активность протеолитических ферментов, функционирующих в кишечнике хозяев, и активность коммерческого препарата трипсина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Объектами исследований служили цестоды из кишечников различных видов рыб Рыбинского водохранилища и слизистые оболочки кишечников их хозяев. Для исследований каждого вида рыб брали особей одной и той же размерно-возрастной группы (табл. 1).

Приготовление экстрактов червей

Вскрытие извлеченных из рыб кишечников и дальнейшее приготовление препаратов осуществля-

ли на ледяной бане. Извлеченных из кишечника хозяина цестод 3 раза тщательно промывали в растворе Рингера для холоднокровных животных, pH 7.5 (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10% CaCl₂; 0.54 г Na₂HPO₄; 0.02 г KH₂PO₄; 0.16 г MgSO₄-ного раствора в 1 л дистиллированной воды) с целью удаления ферментов хозяина, адсорбированных на их поверхности. Затем червей гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора фирмы Sartorius AG (Göttingen, Germany), и гомогенат разводили раствором Рингера в соотношении масса:объем 1:9. Гомогенаты червей центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин при 4°C, для дальнейших исследований использовали супернатант (экстракт червей). Экстракты замораживали и хранили при –20°C для последующего определения ингибирующей способности.

В экстрактах червей определяли содержание белка методом Лоури [19].

Приготовление гомогенатов из слизистых оболочек кишечников рыб

Для определения протеолитической активности готовили гомогенаты слизистой оболочки кишечника рыб-хозяев. После извлечения червей и удаления химуса слизистую оболочку кишечника снимали скребком, гомогенизировали ее и разводили раствором Рингера, pH 7.5 для холоднокровных животных в соотношении масса:объем 1:49. Гомогенаты слизистой оболочки кишечника исследуемых видов рыб замораживали до дальнейшего использования.

Определение протеолитической активности

Суммарную активность протеиназ в гомогенате слизистой оболочки кишечника рыб и активность коммерческого препарата трипсина (MP Biomedicals, USA) определяли с использованием в качестве субстрата 0.3%-ного раствора азо-казеина в трибуфере, pH 7.5 [20]. Результаты представлены в процентах от контроля. При оценке влияния зара-

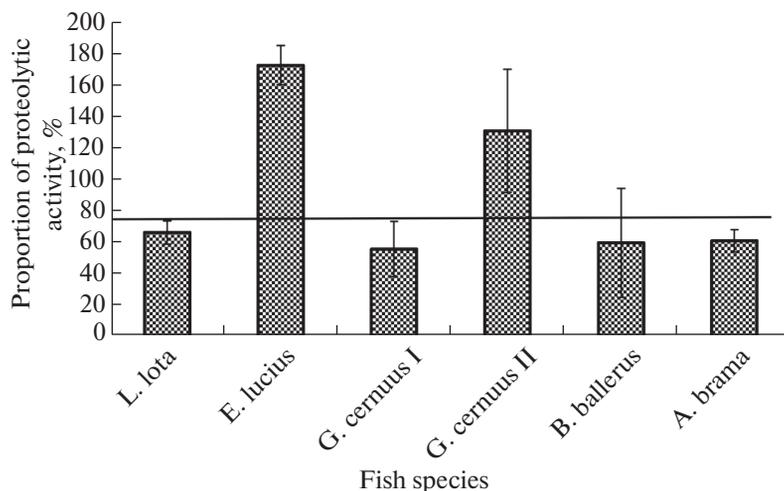


Рис. 1. Влияние заражения цестодами на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяев-рыб (%). 100% – протеолитическая активность незараженных рыб; G. cernuus I – ерши, зараженные цестодами с малой суммарной длиной, G. cernuus II – ерши, зараженные цестодами с большой суммарной длиной.

жения на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника рыб контролем служила активность, определенная в слизистых оболочках кишечника незараженных рыб.

Определение ингибирующей способности червей по отношению к протеиназам

Для исследования ингибирующей способности червей использовали их экстракт. Источником протеолитической активности служили гомогенат слизистой оболочки кишечника рыб и коммерческий препарат трипсина (T4799, Sigma) в концентрации 0.01 мг/мл в трис-буфере (pH 7.5). Ингибирующую способность червей определяли как описано ранее [21] и сравнивали ее с действием синтетического специфического ингибитора сериновых протеиназ PMSF (фенил-метил-сульфонил-флуорид) – в концентрации 100 мМ в DMSO (диметилсульфоксид). Результаты представлены в процентах от контроля. Контролем служила протеолитическая активность, определенная в слизистых оболочках кишечника незараженных рыб, и активность коммерческого трипсина.

Все биохимические измерения проводили в трех повторностях.

Статистическая обработка

Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Обработка результатов выполнена с помощью статистических пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Проверка нормальности распределения данных и однородности дисперсии проводилась с использованием критериев Шапиро–Уилка и Левена соответственно. Ингибиторный эффект

оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки для множественного сравнения средних значений при $p < 0.05$. Для оценки связи между содержанием белка в пробах и их способностью подавлять активность протеиназ использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена (r).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (Протокол № 4 от 02.04.2021 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение влияния различных видов цестод на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника их хозяев показало, что у налима, синца, леща и ерша, зараженных мелкими червями, эта активность снижается на 34–61%, а у щуки и ерша, зараженных крупными цестодами, – повышается на 31–73% (рис. 1).

На рис. 2 приведены данные о процентном ингибировании экстрактами цестод протеолитической активности слизистых оболочек кишечника хозяев – рыб, и доле сериновых протеиназ в этой активности. Доля последних колеблется в зависимости от вида рыб от 36.9 ± 3.7 до $64.1 \pm 6.8\%$. Экстракты всех исследованных цестод ингибируют активность протеолитических ферментов слизистой оболочки кишечника их хозяев. Степень ингибирования варьирует от 14.3 ± 1.9 до $51.2 \pm 1.2\%$

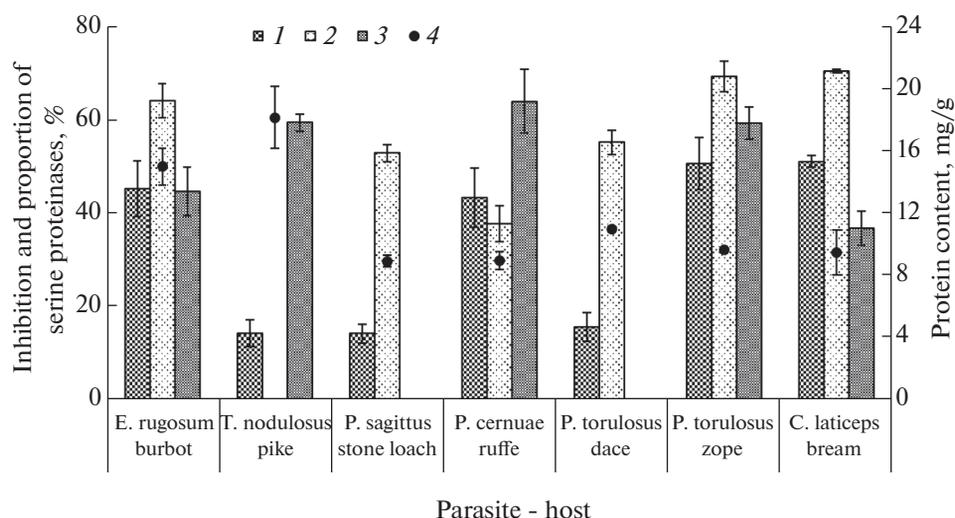


Рис. 2. Доля ингибирования экстрактами цестод протеолитической активности слизистых оболочек хозяев—рыб, доля сериновых протеиназ в протеолитической активности слизистых оболочек кишечника хозяев—рыб и содержание белка в экстрактах червей. 1 — слизистая оболочка; 2 — PMSF; 3 — доля сериновых протеиназ в кишечнике рыб; 4 — содержание белка.

в зависимости от пары паразит—хозяин. Для сравнения приведены показатели ингибирования протеолитической активности слизистых оболочек ингибитором сериновых протеиназ — PMSF. Эти значения изменяются на величину от 37.8 ± 3.8 до $70.6 \pm 0.4\%$ в зависимости от вида рыб, свидетельствуя о существенной роли сериновых протеиназ в пищеварении последних. Установлены слабые отрицательные корреляции между долей сериновых протеиназ в слизистой оболочке кишечника рыб и долей ингибирования этой активности экстрактами цестод, а также долей ингибирования протеолитической активности слизистой оболочки экстрактами цестод и содержанием в этих экстрактах белка ($r = -0.4$ для первого и $r = -0.3$ для второго).

Экстракты всех исследованных видов цестод достоверно ингибировали активность коммерческого трипсина ($p < 0.05$), причем степень ингибирования этой активности у разных видов червей различается и колеблется от 19.6 ± 7.5 до $86.5 \pm 4.5\%$ (рис. 3). При этом доля ингибирования активности трипсина у большинства экстрактов исследованных цестод выше, чем таковая для слизистых оболочек кишечника их хозяев. Установлена достаточно сильная ($r = 0.68$) положительная корреляция между способностью экстрактов цестод ингибировать активность трипсина и содержанием в них белка. Для цестод *Eubothrium rugosum* и *Triacanthophorus nodulosus* доля ингибирования активности трипсина сопоставима с таковой для специфического ингибитора сериновых протеиназ — PMSF (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

За последнее время нами накоплен довольно большой фактический материал о влиянии цестод на протеолитическую активность их окончательных хозяев — рыб, в том числе о способности гельминтов ингибировать эту активность [3, 21, 22]. При этом сравнение между собой абсолютных значений ингибирования протеиназ различными видами гельминтов в силу разных причин оказалось затруднительным. Так, хозяева изученных цестод различаются по своим физиологическим характеристикам, в частности по размеру и спектрам питания. Кроме того, в зависимости от цикла развития цестод различались сезоны отлова рыб. Например, налима и ерша отлавливали зимой, щуку — весной, остальных рыб — летом. Все эти факторы в значительной степени сказываются на активности пищеварительных ферментов, в том числе протеиназ [1, 2]. Исследованные цестоды также существенно различаются по своей морфологии и физиологии. Однако, учитывая, что ингибиторы протеиназ имеют белковое происхождение [5], в физиологических исследованиях можно до некоторой степени “уравновесить” эти различия, определяя содержание белка в экстрактах червей.

Мы попытались сравнить относительные эффекты влияния заражения червями, выраженные в процентах от контрольных значений протеолитической активности слизистой оболочки кишечника хозяев. Полученные данные свидетельствуют о том, что заражение цестодами влияет на протеолитическую активность слизистых оболочек кишечника окончательных хозяев — рыб. Однако это влияние у одних хозяев вызывает снижение протеолитической активности, а у других — ее повы-

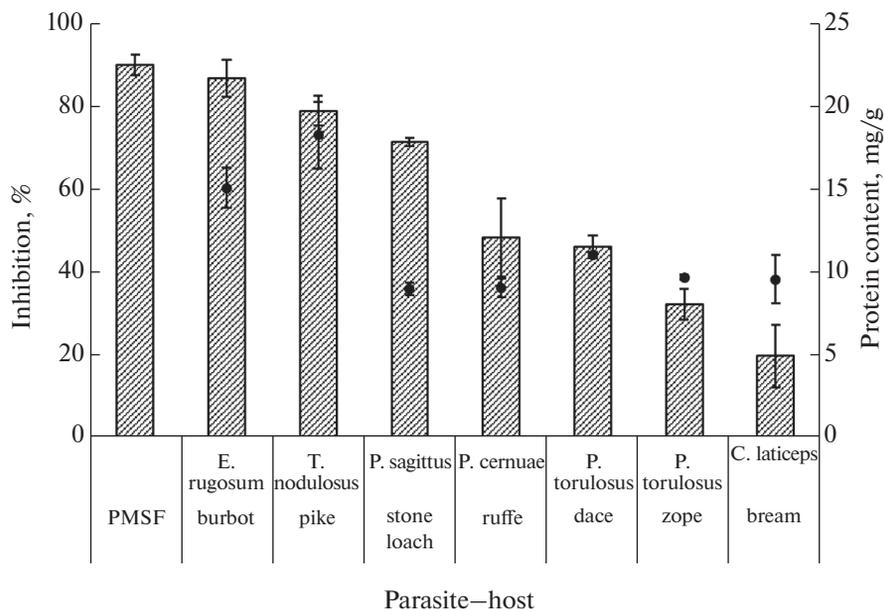


Рис. 3. Доля ингибирования экстрактами цестод активности коммерческого препарата трипсина и содержание белка в экстрактах червей. Первый столбец – доля ингибирования трипсина синтетическим ингибитором PMSF; черные точки – содержание белка.

шение. Направление изменений зависит от различных факторов. Следует отметить, что значительная доля в протеолитической активности слизистых оболочек кишечника всех исследованных видов рыб приходится на сериновые протеиназы. Кроме того, ранее было установлено, что при заражении рыб цестодами изменяется спектр протеиназ, функционирующих в слизистой оболочке кишечника хозяина. В частности, уменьшается доля сериновых протеиназ [3, 22].

Снижение активности исследованных ферментов у зараженных цестодами рыб (налима, синца, леща и ерша, зараженного мелкими червями) может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, снижение активности может происходить вследствие адсорбции части ферментов на тегументе цестод. Во-вторых, уменьшение активности протеолитических ферментов у зараженных рыб может быть связано с частичным их ингибированием на поверхности цестод, что рассматривается как один из механизмов защиты гельминтов от воздействия протеиназ хозяев [3].

Повышение активности протеолитических ферментов слизистой оболочки кишечника рыб при заражении цестодами в случае шуки и *T. nodulosus*, по всей видимости, связано с особенностями строения прикрепительного аппарата цестод [23]. Известно, что от строения прикрепительных образований червей зависит уровень патологических изменений в тканях кишечника [24]. В отличие от других исследованных нами видов гельминтов, цестоды *T. nodulosus* вооружены различными по раз-

меру и количеству крючьями, которые могут вызывать повреждения слизистой оболочки кишечника и выход внутриклеточных протеиназ в просвет кишечника. Неслучайно при хронической инфекции *T. nodulosus* в слизистой оболочке кишечника шуки наблюдаются существенные структурные перестройки [25].

Как установлено ранее [22], в зависимости от своего размера цестоды *Proteocephalus cernuae* из кишечника ерша по-разному влияют на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяина. В частности, при паразитировании крупных *P. cernuae* в кишечнике такой мелкой рыбы, как ерш, активность протеиназ хозяев повышается, что, вероятно, происходит в ответ на высокую паразитарную нагрузку, при которой включаются адаптационные механизмы хозяина и повышается активность его пищеварительных ферментов [22]. Это согласуется с высказанным ранее предположением о том, что зараженные хозяева компенсируют негативное воздействие кишечных паразитов увеличением пищевой активности [26], что, в свою очередь, сказывается на активности пищеварительных ферментов.

Тот факт, что экстракты цестод значительно эффективнее ингибируют активность трипсина, чем активность протеиназ, функционирующих в слизистых оболочках кишечника хозяина, свидетельствует о большей специфичности ингибиторов червей по отношению к трипсину. Довольно сильная положительная корреляция между способностью экстрактов цестод ингибировать активность

трипсина и содержанием в этих экстрактах белка вполне объяснима, поскольку известно, что большинство ингибиторов протеиназ имеют белковую природу [5]. В то же время известно, что ингибиторы сериновых протеаз – один из ключевых компонентов секреторных продуктов паразитов. Они играют важную роль в выживании паразита за счет своей способности ингибировать ферменты хозяина и в норме присутствуют в микроокружении и/или секретируются иммунными эффекторными клетками [8]. Эти ингибиторы регулируют активность протеаз и контролируют разнообразные процессы, связанные с их активностью, а также играют существенную роль в защите паразита от пищеварительных ферментов хозяина и вносят вклад в специфичность паразитирования [7, 27]. Ингибиторы протеиназ – важный природный инструмент регуляции протеолитической активности, предотвращающий нежелательный гидролиз белков. Кроме того, большинство известных и охарактеризованных белковых ингибиторов относятся к группе ингибиторов сериновых протеиназ, к которым принадлежит трипсин [6].

В связи с вышесказанным мы предположили, что чем выше доля сериновых протеиназ в протеолитической активности слизистых оболочек кишечника, тем выше должна быть и доля ингибирования этой активности экстрактами цестод. Однако данное предположение не нашло подтверждения, что свидетельствует об отсутствии существенной связи между этими показателями и их влияния на взаимоотношения между паразитами и хозяевами – рыбами. Протеолитическая активность представлена в кишечнике активностью не только сериновых протеиназ, но и других протеиназ (цистеиновых, металлопротеиназ и прочих) [3]. Возможно, поэтому не удалось установить существенной связи между долей ингибирования активности коммерческого трипсина и долей ингибирования протеолитической активности слизистой оболочки кишечника хозяев.

Несмотря на существующие значительные различия в физиологических особенностях хозяев – рыб и паразитирующих в их кишечниках цестод найдено объединяющее этих червей свойство – присутствие в их экстрактах компонента, способного в значительной степени ингибировать активность протеолитических ферментов в кишечнике их хозяев. Это подтверждает высказанные ранее предположения о том, что эту способность можно рассматривать как один из механизмов защиты гельминтов от воздействия протеиназ хозяина [3]. В дальнейшем необходимо направить усилия на выделение и идентификацию компонентов, ответственных за ингибирующую способность цестод. Некоторые шаги в этом направлении уже предприняты [28].

Таким образом, паразитирование цестод в пищеварительном тракте рыб изменяет активность протеолитических ферментов слизистой оболочки кишечника. Независимо от направленности влияния цестод на протеолитическую активность слизистой оболочки (снижение или повышение этой активности при заражении) важную составляющую этого влияния представляет способность всех исследованных цестод ингибировать протеолитическую активность хозяев и активность коммерческого препарата трипсина. При этом эффект ингибирующей способности для некоторых видов цестод сопоставим по своей эффективности с синтетическим ингибитором сериновых протеиназ – PMSF, свидетельствуя о важности этого защитного механизма в жизнедеятельности червей.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00248).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна работы (Т.В.Ф., Г.И.И.). Получение, анализ и интерпретация данных (Т.В.Ф., Г.И.И.). Участие в написании и редактировании статьи (Т.В.Ф., Г.И.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уголев АМ, Кузьмина ВВ (1993) Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. С-П.: Гидрометеоиздат. 238 с. [Ugolev AM, Kuz'mina VV (1993) Digestive processes and adaptations in fish. S-P: Hydrometeorological. 238 p. (In Russ)].
2. Solovyev MM, Kashinskaya EN, Rogozhin EA, Moyano FJ (2021) Seasonal changes in kinetic parameters of trypsin in gastric and agastric fish. *Fish Physiol Biochem* 47: 381–391. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00919-0>
3. Izvekova GI, Solovyev MM (2016) Characteristics of the Effect of Cestodes Parasitizing the Fish Intestine on the Activity of the Host Proteinases. *Biol Bulletin* 43 (2): 146–151. <https://doi.org/10.1134/S1062359016010076>
4. Hawley JH, Peanasky AJ (1992) Ascaris suum: are trypsin inhibitors involved in species specificity of ascarid nematodes? *Exp Parasitol* 75 (1): 112–118. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90126-U](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90126-U)
5. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378:705–716. <https://doi.org/10.1042/BJ20031825>

6. *Molehin AJ, Gobert GN, McManus DP* (2012) Serine protease inhibitors of parasitic helminthes. *Parasitology* 139 (6): 681–695.
<https://doi.org/10.1017/S0031182011002435>
7. *Morris SR, Sakanari JA* (1994) Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J Biologic Chem* 269 (44): 27650–27656.
8. *Zang X, Maizels RM* (2001) Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *TRENDS Biochem Sci* 26 (3): 191–197.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01761-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01761-8)
9. *Zhang Y, Guo J, He L, Zong H-Y, Cai G-B* (2018) Isolation and characterization of a novel serine protease inhibitor, SjsPI, from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 67: 415–424.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.04.002>
10. *Cuesta-Astroz Y, de Oliveira F, Nahum LA, Oliveira G* (2017) Helminth secretomes reflect different lifestyles and parasitized hosts. *Int J Parasitol* 47: 529–544.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.01.007>
11. *Ranganathan S, Garg G* (2009) Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome Medicine* 1: 113.
<https://doi.org/10.1186/gm113>
12. *Dezfuli BS, Bosi G, DePasquale JA, Manera M, Giari L* (2016) Fish innate immunity against intestinal helminthes. *Fish & Shellfish Immunol* 50: 274–287.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.002>
13. *Bosi G, Shinn AP, Giari L, Dezfuli BS* (2015) Enteric neuromodulators and mucus discharge in a fish infected with the intestinal helminth *Pomphorhynchus laevis*. *Parasites & Vectors* 8: 359.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0970-7>
14. *Dezfuli BS, Lui A, Giari L, Pironi F, Manera M, Lorenzoni M, Noga EJ* (2013) Piscidins in the intestine of European perch, *Perca fluviatilis*, naturally infected with an enteric worm. *Fish & Shellfish Immunol* 35: 1539–1546.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.023>
15. *Rascón Jr, McKerrow JH* (2013) Synthetic and natural protease inhibitors provide insights into parasite development, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem* 20: 3078–3102.
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6169-z>
16. *Kochneva A, Drozdova P, Borvinskaya E* (2020) The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda: Bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish. *Marine Genomics* 51: 100702.
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100702>
17. *Xu J, Wu L, Sun Y, Wei Y, Zheng L, Zhang J, Pang Z, Yang Y, Lu Y* (2020) Proteomics and bioinformatics analysis of *Fasciola hepatica* somatic proteome in different growth phases. *Parasitol Res* 119: 2837–2850.
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06833-x>
18. *Bień J, Sałamatın R, Sulima A, Savijoki K, Conn DB, Näreaho A, Młocicki D* (2016) Mass spectrometry analysis of the excretory-secretory (E-S) products of the model cestode *Hymenolepis diminuta* reveals their immunogenic properties and the presence of new E-S proteins in cestodes. *Acta Parasitol* 61 (2): 429–442.
<https://doi.org/10.1515/ap-2016-0058>
19. *Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
20. *Alarcón FJ, Martínez TF, Barranco P, Cabello T, Díaz M, Moyano FJ* (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 32: 265–274.
[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00087-X)
21. *Izyekova GI, Frolova TV, Izyekov EI* (2017) Inactivation of proteolytic enzymes by *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) (Cestoda) from the gut of burbot *Lota lota* (Linnaeus). *Folia Parasitol* 64: 016.
<https://doi.org/10.14411/fp.2017.016>
22. *Izyekova GI, Frolova TV, Zhokhov AE* (2018) Proteinase Activity in the Intestine of Ruff *Gymnocephalus cernuus* (L.) (Pisces) Depending on the Sum Length of Cestodes *Proteocephalus cernuae* (Gmelin) Parasitizing the Gut. *Inland Water Biology* 11 (1): 87–91.
<https://doi.org/10.1134/S1995082918010066>
23. *Извекова ГИ, Куклина ММ* (2014) Заражение цестодами и активность пищеварительных гидролаз позвоночных хозяев. *Успехи современной биологии* 134(3): 304–315. [*Izyekova GI, Kuklina MM* (2014) Infection with cestodes and the activity of digestive hydrolases of vertebrate hosts. *Successes of modern biology* 134 (3): 304–315. (In Russ)].
24. *Richards KS, Arme C* (1981) The ultrastructure of the scolex-neck syncytium, neck cells and frontal gland cells of *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea: Cestoda). *J Parasitol* 83: 477–487.
25. *Давыдов ВГ* (1986) Сравнительное изучение реакции тканей кишечника рыб при разных способах прикрепления ленточных червей. *Биология и экология водных организмов*. Л. Наука. [*Davydov VG* (1986) Comparative study of the reaction of fish intestinal tissues in various methods of attaching tapeworms. *Biology and ecology of aquatic organisms*. L. Science. (In Russ)].
26. *Bosi G, Shinn AP, Giari L, Simoni E, Pironi F, Dezfuli BS* (2005) Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *J Fish Dis* 28: 703–711.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00674.x>
27. *Huang SY, Yue DM, Hou JL et al.* (2019) Proteomic analysis of *Fasciola gigantica* excretory and secretory products (FgESPs) interacting with buffalo serum of different infection periods by shotgun LC-MS/MS. *Parasitol Res* 118: 453–460.
<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6169-z>
28. *Rogozhin E, Solovyev M, Frolova T, Izyekova G* (2019) Isolation and partial structural characterization of new Kunitz-type trypsin inhibitors from the pike cestode *Triaenophorus nodulosus*. *Molec & Biochem Parasitol* 233 (111217): 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111217>

A COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF INTESTINAL CESTODES IN DIFFERENT FISH SPECIES ON ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES

T. V. Frolova^{a,#} and G. I. Izvekova^a

^a Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Yaroslavl Region, Borok, Russia

[#]e-mail: bianka28061981@gmail.com

It was found that the six cestode species, *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786), *P. sagittus* (Grimm, 1872), *P. cernuae* (Gmelin, 1790), *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786), *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781), and *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781), which parasitize in the intestines of fish, such as the dace *Leuciscus leuciscus* L., stone loach *Barbatula barbatula* L., ruffe *Gymnocephalus cernuus* L., zope *Ballerus ballerus* L., burbot *Lota lota* L., pike *Esox lucius* Linnaeus, and bream *Abramis brama* L., alter the activity of proteolytic enzymes in the host intestinal mucosa. Regardless of the direction of this effect (inhibition or enhancement of proteolytic enzyme activity upon infestation) and fish species affiliation, all the cestodes studied herein share the ability to inhibit the proteolytic activity of the host mucosa, as well as of commercial trypsin. In some cestode species, the inhibitory effect is comparable to that of the synthetic serine proteinase inhibitor PMSE.

Keywords: fish, cestodes, proteolytic activity, proteinase inhibitors

КАЛЬЦИЕВЫЙ КОМПОНЕНТ ФОТООТВЕТОВ СЕТЧАТКИ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*: ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

© 2022 г. В. В. Жуков^{1,*}, М. В. Сафонов¹

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

*e-mail: valerzhukov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

После доработки 05.03.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Данное исследование направлено на анализ роли ионов кальция в механизме преобразования светового сигнала в сетчатке большого прудовика *Lymnaea stagnalis*. С этой целью изучено влияние на электрические реакции изолированного глаза моллюска веществ, влияющих на концентрацию цитоплазматического Ca^{2+} . Применяли: модулятор кальциевого тока 2-аминоэтилдифенил борат, хелатирующий агент двухвалентных катионов EGTA, а также (+)-цис-дилтиазем и Cd^{2+} как блокаторы кальциевых каналов. Все применявшиеся вещества с различной степенью эффективности подавляли медленную волну электроретинограммы и связанную с ней импульсную активность. Делается вывод, что фототрансдукция в микровиллярных рецепторах сетчатки прудовика включает повышение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} . Результаты фармакологических экспериментов, а также особенности ультраструктуры сетчатки моллюска позволяют предполагать, что этот результат достигается не только выбросом Ca^{2+} из внутриклеточных депо апикальных частей фоторецепторов, но и, по крайней мере, частично поступлением из внеклеточной среды.

Ключевые слова: *Lymnaea stagnalis*, сетчатка, фоторецепторы, ультраструктура, фототрансдукция, электроретинограмма, фармакологический анализ, Ca^{2+}

DOI: 10.31857/S004445292203007X

Результаты детальных исследований механизмов преобразования светового сигнала в сетчатке позвоночных и членистоногих животных легли в основу представления об однозначном соответствии цитологического типа фоторецептора polarity его электрической реакции и молекулярному механизму фототрансдукции [1, 2]. Так, в рабдомерных (микровиллярных) фоторецепторах, характерных для глаз беспозвоночных животных, поглощение кванта света молекулами зрительного пигмента активирует инозитолфосфатный сигнальный путь, который приводит к открытию TRP каналов и деполяризации клетки [3]. В цилиарных же фоторецепторах сетчатки позвоночных животных возбуждение и изомеризация молекулы родопсина на свету активируют гуанилатциклазный путь фототрансдукции, который приводит к закрытию катионных каналов, управляемых цГМФ, и гиперполяризации клетки [4]. Активация обоих сигнальных путей происходит посредством специфических для каждого из типов фоторецепторов G-белков, функционально сопрягающих молекулы зрительного пигмента с трансдукционными каскадами. Такой же схеме в целом соответствуют

свойства рабдомерных (микровиллярных) и цилиарных фоторецепторных клеток двойной сетчатки глаз двусторчатых моллюсков родов *Pecten* и *Lima* [5]. Однако ввиду малочисленности исследований механизмов фоторецепции у представителей других таксонов утверждение описанной связи может быть распространено на них пока только в виде предположения, включая брюхоногих моллюсков – представителей наиболее крупного по числу видов класса мягкотелых. Последнее обстоятельство обуславливает интерес к исследованию механизмов световой чувствительности у этих животных с позиции эволюционной и сравнительной физиологии.

К настоящему времени присутствие в организме одного животного фоторецепторных клеток разного цитологического типа и/или реализующих различные пути преобразования светового сигнала уже перестало быть уникальной особенностью двусторчатых моллюсков и установлено для ряда организмов, принадлежащих различным таксонам позвоночных и беспозвоночных животных [6, 7]. Указанное разнообразие достигается, прежде всего, за счет светочувствительных клеток, не входя-

ших в состав сетчатки глаза, включая центральные нейроны [8, 9], которые невозможно отнести к одной из упомянутых цитологических групп. При этом именно для моллюсков, по-видимому, наиболее характерно одновременное наличие у одного животного сразу нескольких видов световой чувствительности [10]. Так, у пресноводного брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* чувствительность к свету помимо сетчатки глаза проявляют также кожные покровы ноги, мантии и головной части туловища [11]. Освещение глаза прудовика приводит к оп-реакции фоторецепторов сетчатки: деполяризации и возникновению в них потенциалов действия [12], которые проводятся по аксонам оптического нерва в центральные ганглии [13]. В отличие от фоторецепторов глаза светочувствительные клетки кожи *L. stagnalis* в целом не имеют четкой локализации. Лишь в коже мантии в области пневмостома выявлено скопление структур, обладающих иммунореактивностью к антигенам опсины осьминога, которые определены как принадлежащие фоторецепторам [14]. Световая стимуляция этой части тела моллюска вызывает фазную off-реакцию в правом париетальном нерве (*n. parietalis dexter*) и появление возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) в интернейроне RPeD11 [15]. Эти события являются частью нейрофизиологического механизма оборонительного поведения, а именно втягивания тела животного в раковину с одновременным закрытием пневмостома в ответ на резкое снижение освещенности кожи. Исходя из того, что импульсная реакция в париетальном нерве отражает активность светочувствительных клеток кожи, можно предполагать, что фоторецепторы сетчатки и кожи имеют отличные друг от друга функциональные свойства, в основе которых могут лежать различные пути преобразования светового сигнала.

Фармакологический анализ электрических реакций RPeD 11, а также проявлений оборонительного теневого рефлекса, дал основания для вывода о том, что off-ответ фоторецепторов кожи обеспечивается работой каналов, управляемых циклическими нуклеотидами, а именно цГМФ [16]. Однако при этом цитологический тип светочувствительных клеток кожи *L. stagnalis* остается пока неизвестным, в то время как в состав сетчатки этого моллюска входят только микровиллярные фоторецепторы [17, 18]. Следуя описанной выше коррелятивной связи, можно было бы предполагать, что в фоторецепторах сетчатки прудовика фототрансдукция проходит по инозитолфосфатному пути, включающему модуляцию внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Однако ввиду необходимости экспериментальной проверки такого предположения, а также с целью сравнения процессов преобразования светового сигнала в различных фоторецепторах *L. stagnalis*, мы предприняли фармакологический анализ вовлеченности Ca^{2+} в генерацию элек-

трических реакций сетчатки этого моллюска на световую стимуляцию. Для сопоставимости результатов набор примененных нами веществ включал и те, что были использованы в исследованиях фоторецепторов кожи [16]. Предварительные результаты исследования были опубликованы ранее [19].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Объектом исследования были взрослые особи прудовика *Lymnaea stagnalis* с размером раковины около 3 см, собранные в водоемах города Светлый, Калининградская область, и содержавшиеся в лабораторных условиях.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии БФУ им. И. Канта.

Электронная микроскопия

Для приготовления срезов использовали препарат глаза с участками прилегающей ткани. Образец ткани предварительно фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида, приготовленном на 0.1%-ном какодилатном буфере (pH = 7.5), а затем обезжизивали в серии этилового спирта возрастающей концентрации от 50 до 100% и пропиленоксидом. Обезвоженный образец заливали в "Аралдид" или "Эпон 812". С полученных блоков делали срезы на ультрамикротоме Reichert-Jung Ultracut E толщиной около 50 нм. Полученные срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и уранилацетатом свинца. Для просмотра срезы помещали на медные сеточки.

Просмотр и фотографирование срезов проводили на электронном микроскопе Philips EM 300 (Медицинский факультет высшей технической школы Северного Рейна-Вестфалии, Ахен).

Электрофизиологические эксперименты

Экспериментальный препарат состоял из изолированного глаза с отрезком оптического нерва. В некоторых опытах для облегчения процессов диффузионного обмена между микросредой апикальных отделов фоторецепторов и внешним раствором из глазного бокала удаляли хрусталик. Все препараты готовили под бинокулярным микроскопом в условиях общего затемнения и с использованием красного фильтра в осветителе.

Регистрация электроретинограммы (ЭРГ) выполнялась холдером A-M Systems с всасывающим портом и Ag/AgCl электродом, в котором укреплялась стеклянная пипетка с диаметром входного

отверстия около 70 мкм. Электрод закрепляли в экспериментальной ванночке объемом 1 мл. Стеклые пипетки изготавливали на пуллере PC10 и оплавливали до нужного диаметра на микрокузнице MF900 (Narishige).

Электрические сигналы усиливали (A-M System Model 1800, $\times 100$) в полосе частот 0.1–500 Гц, оцифровывали с шагом дискретизации 0.1 мс (Digidata 1440A), записывали на компьютере и обрабатывали с использованием программного пакета pClamp 10.4. Для получения записей импульсной активности программными средствами поднимали нижнюю границу полосы пропускаемых частот до 10 Гц.

Световая стимуляция осуществлялась светодиодом GNL-3012GD ($\lambda_{\text{max}} = 525$ нм), свет от которого подавали к препарату по оптоволоконному жгуту. Освещенность препарата составляла около 1000 лк. В качестве управляемого параметра была выбрана длительность стимула, которую задавали через Digidata 1440A.

Ход электрофизиологического эксперимента

Приготовленный препарат помещали в экспериментальную ванночку, заполненную физиологическим раствором, которую устанавливали в экранированную камеру. Отрезок оптического нерва полностью затягивали в наконечник, который под отрицательным давлением плотно прилегал к главному бокалу. В таком виде препарат оставляли в темноте на время не менее 40 мин до установления относительно стабильной амплитуды ЭРГ, что считали завершением темновой адаптации и определяли периодической регистрацией реакции на световой стимул длительностью 500 мс. По истечении периода адаптации выполняли блок стимуляции световыми вспышками нарастающей длительности. Затем вводили в ванночку раствор исследуемого вещества до достижения необходимой расчетной концентрации и оставляли глаз в новом растворе на время около 15 мин, после чего повторяли блок стимуляции световыми раздражителями. Процедуру стимуляции проводили повторно через 15 мин. Затем возвращали в ванночку исходный физиологический раствор, отмывая им препарат не менее одного часа. В процессе отмывания повторяли блок стимуляции световыми раздражителями для контроля степени восстановления световых ответов глаза.

Использованные вещества

2-Аминоэтилдифенил борат (2-APB, Sigma, D9754) применяли как ингибитор входящего кальциевого тока через каналы TRP и модулятор внутриклеточного высвобождения ионов Ca^{2+} , в том числе и управляемого через рецепторы IP_3 [20].

Маточный раствор вещества 10 мМ готовили на диметилсульфоксиде (DMSO) и хранили в морозильной камере при -25°C в атмосфере аргона. Во время опыта маточный раствор разводили до концентрации 1 мМ физиологическим раствором и в необходимом объеме добавляли в экспериментальную ванночку для достижения нужной концентрации.

Этиленгликоль-бис-(β -аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты тетранатриевая соль (EGTA, Sigma-Aldrich, E8145) применялась как хелатор двухвалентных катионов с повышенным сродством в отношении ионов Ca^{2+} . Маточный раствор EGTA 0.1 М готовили в NaOH и хранили в морозильной камере при -25°C . В ходе эксперимента его разбавляли до желаемой концентрации физиологическим раствором, не содержащим Ca^{2+} , и использовали для наполнения экспериментальной ванночки.

Хлорид кадмия (CdCl_2 , Sigma-Aldrich, 202908) использовали для введения в раствор Cd^{2+} как блокаторов кальциевых каналов [21]. Исходный водный раствор 0.1 М хранили в холодильнике при 4°C и добавляли в необходимом объеме в экспериментальную ванночку для достижения нужной концентрации.

(+)-цис-дилтиазем гидрохлорид (DTZ, Sigma, D2521), блокатор некоторых типов каналов Ca^{2+} [22, 23], применяли для сравнения его эффективности по отношению к фоторецепторам кожи [16] и сетчатки. Маточный раствор DTZ 10 мМ готовили на дистиллированной воде и хранили в морозильной камере при -25°C . Процедура получения рабочего раствора для эксперимента была такой же, как и для 2-APB.

Состав физиологического раствора (мМ): NaCl – 40; KCl – 3; CaCl_2 – 3; MgCl_2 – 3. Значение pH = 7.4–7.6 устанавливали NEPES. В экспериментах с применением EGTA использовали физиологический раствор такого же состава, только без Ca^{2+} (бескальциевый раствор).

Обработка и статистический анализ результатов

Значения амплитуд медленной волны ЭРГ в каждом опыте нормировали относительно ее максимального значения, полученного в контрольном физиологическом растворе до аппликации вещества. Нормированные значения усредняли по всем опытам. Статистическую обработку результатов проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе GraphPad Prism 7.04. Достоверность различий средних значений ЭРГ, полученных в контрольных растворах и в присутствии веществ, оценивали на основе критериев Тьюки и Шидака.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ультроструктура

Основные детали структурной организации и клеточного состава сетчатки *L. stagnalis* подробно описаны ранее в ряде исследований [17, 18]. Поэтому мы сфокусировали внимание на структурных особенностях апикальных частей фоторецепторных клеток и их микровиллярного аппарата как места потенциальной локализации зрительного пигмента и молекулярных элементов механизма фототрансдукции. Вершины фоторецепторных клеток диаметром поперечного сечения около 4–6 мкм выдаются в полость глазного бокала на расстояние до 10–12 мкм. Они образуют многочисленные микровиллярные выросты диаметром от 0.08 до 0.4 мкм и длиной до 6–7 мкм (рис. 1а). В большинстве своем расположение микровилл отдельного фоторецептора выглядит слабо упорядоченным, хотя встречаются отдельные пучки и области их одинаковой пространственной ориентации (рис. 1б). Вероятно, что эти группы микровилл принадлежат разным морфологическим типам фоторецепторов. На полученных фотографиях не просматривается деталей ультроструктуры микровилл: их внутреннее пространство выглядит однородным. При этом в цитоплазме стволовой части апексов фоторецепторов обнаружены многочисленные везикулярные образования, мембранные структуры и митохондрии (рис. 1с).

Электроретинограмма

Детальное описание ЭРГ *L. stagnalis* и ее свойств было выполнено ранее [13]. Поэтому здесь ограничимся лишь некоторыми комментариями. Электрическая реакция глаза, вызванная короткой вспышкой света, состоит из медленной волны и связанной с ней разрядом импульсной активности. Латентный период возникновения волны ЭРГ всегда был короче такового импульсной реакции. Так, например, если после включения света начало волны ЭРГ фиксировали через 150 мс, то вспышку импульсов, возникающих на ее восходящей фазе, — примерно через 250 мс. Форма ЭРГ обычно однообразна, хотя иногда встречались отклонения, что, вероятно, связано с особенностями положения глаза во всасывающем наконечнике. Абсолютное значение амплитуды ЭРГ варьировало от опыта к опыту, но влияние этого фактора устраняли нормированием полученных величин. В некоторых наших опытах амплитуда медленной волны могла достигать 2 мВ, а импульсной активности в максимуме ответа — около 25 мкВ. Ввиду того, что медленная волна, по-видимому, является интегральным показателем рецепторного потенциала фоторецепторов, ее амплитуда была выбрана в качестве ключевого параметра при последующем фармакологическом анализе фототрансдукции.

Влияние веществ на ЭРГ

Влияние 2-АРВ на световые реакции сетчатки глаза было исследовано в диапазоне концентраций 1–100 мкМ. Признаки угнетающего влияния вещества на медленную волну ЭРГ проявлялись при его концентрации около 2 мкМ, а при 100 мкМ наблюдалось практически ее полное подавление. В концентрации 10 мкМ 2-АРВ уменьшал амплитуду ЭРГ в среднем до 0.31 ± 0.19 от исходной величины при длительности вспышки 1 с. В этих опытах статистическая значимость наблюдаемого эффекта подтверждается для всех значений длительности светового стимула кроме 1 мс, причем свыше 10 мс — с высокой степенью достоверности (рис. 2а). Угнетающее влияние препарата проявлялось в снижении как амплитуды волны ЭРГ, так и импульсной активности. И наоборот, нарастание волны ЭРГ при возврате физиологического раствора сопровождалось восстановлением, по крайней мере частичным, импульсной активности (рис. 2б, с). Эти события достаточно хорошо коррелировали друг с другом. Эффект, произведенный веществом, сохранялся в течение нескольких часов, однако все же был обратимым. В специально поставленных опытах с длительным отмыванием полное восстановление амплитуды ЭРГ и импульсного компонента реакции на свет наблюдали через 9 ч после завершения аппликации 2-АРВ в концентрации 10 мкМ.

CdCl_2 , введенный в физиологический раствор в концентрации 0.1 мМ, не оказывал статистически значимых изменений амплитуды ЭРГ. Она сильно уменьшалась для всех длительностей световой вспышки при 1 мМ CdCl_2 . Так, при длительности 500 мс амплитуда волны ЭРГ уменьшалась в среднем до 0.23 ± 0.14 от исходного значения (рис. 3а, б). Импульсная активность в этом случае также была подавлена, но импульсы небольшой величины еще сохранялись (рис. 3с). После возврата физиологического раствора восстановление электрических ответов не наблюдалось даже при длительном промывании.

Влияние EGTA на амплитуду ЭРГ по сравнению с Cd^{2+} выглядит менее эффективным: при концентрации EGTA 1 мМ амплитуда ответа обратимо уменьшалась в среднем до 0.56 ± 0.22 от исходного значения при длительности вспышки 500 мс (рис. 4а). После возврата к физиологическому раствору амплитуда ЭРГ восстанавливалась в течение 1 ч. Повышение концентрации EGTA до 10 мМ приводило к существенному уменьшению амплитуды ЭРГ в среднем до 0.15 ± 0.16 (рис. 4б). Этот эффект был очень сильным и, как правило, сохранялся после нескольких часов возврата к физиологическому раствору. Во всех выполненных экспериментах в случае проявления угнетающего влияния веществ на амплитуду волны ЭРГ также уменьшалась амплитуда импульсного компонента реакции глаза на световой стимул (рис. 4с). Все

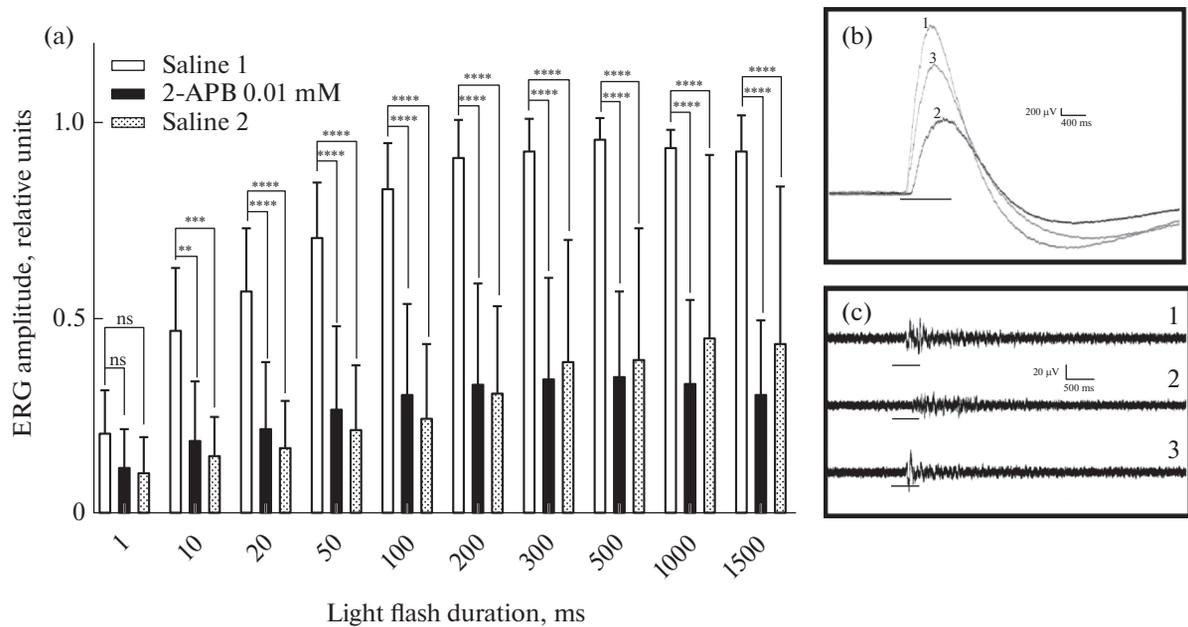


Рис. 2. Влияние аппликации 2-APB на амплитуду медленной волны и импульсного компонента ЭРГ изолированного глаза *Lymnaea stagnalis*. (a) Нормированная и усредненная ($n = 14$) амплитуда медленной волны ЭРГ, вызванной световой вспышкой различной продолжительности в физиологическом растворе (Saline 1), после 30 мин добавления 0.01 мМ 2-APB и после 1 ч восстановления физиологического раствора (Saline 2). (b, c) Примеры волн ЭРГ (b) и импульсных ответов (c), полученных на вспышку света, в физиологическом растворе (1), после 30-минутного применения 0.01 мМ 2-APB (2) и после 1 ч восстановления физиологического раствора (3). Обозначения: вертикальные линии – стандартное отклонение; горизонтальные линии (b и c) – отметка вспышки света; **** – $p < 0.0001$; *** – $p = 0.0001$; ** – $p = 0.001$; ns – $p > 0.05$ (тест Тьюки).

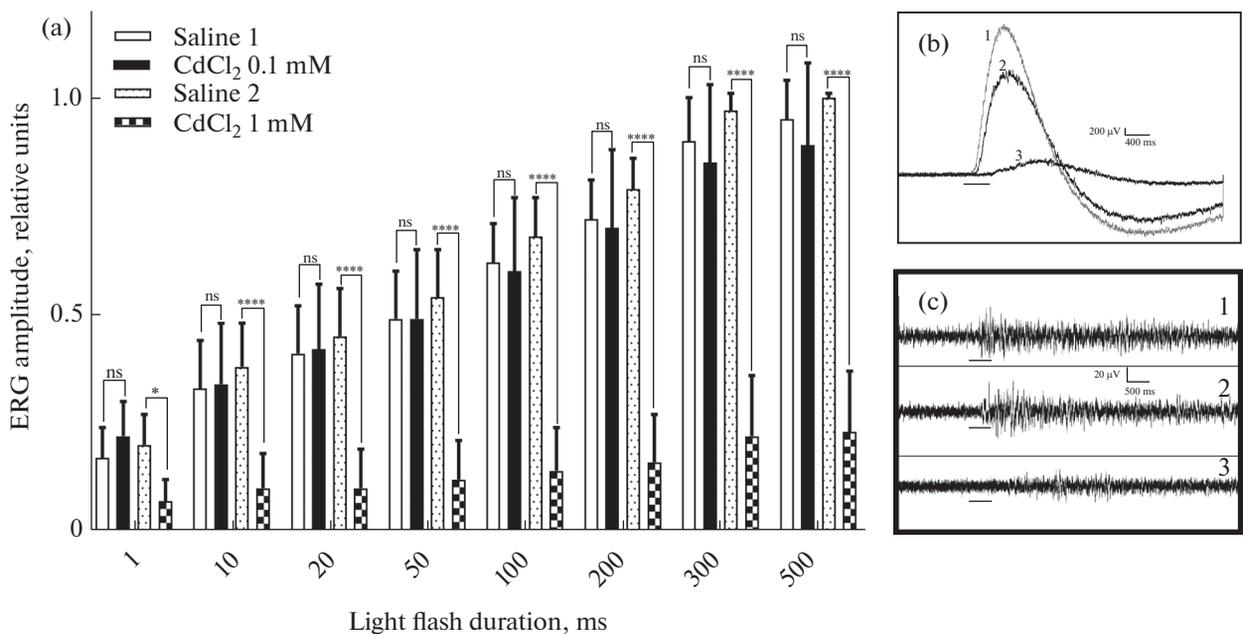


Рис. 3. Влияние Cd^{2+} на амплитуду медленной волны и импульсного компонента ЭРГ изолированного глаза *Lymnaea stagnalis*. (a) Нормированная и усредненная ($n = 15$) амплитуда медленной волны ЭРГ, вызванная световой вспышкой различной продолжительности в физиологическом растворе (Saline 1), после 30 мин добавления 0.1 мМ CdCl_2 , 1 ч восстановления физиологического раствора (Saline 2) и после 30-минутного применения соли кадмия в концентрации 1 мМ. (b, c) Примеры регистраций волн ЭРГ (b) и импульсных ответов (c), полученных в ответ на вспышку света, в физиологическом растворе (1), после 30-минутного применения Cd^{2+} в концентрации 0.1 мМ (2) и 1 мМ (3). Обозначения: вертикальные линии – стандартное отклонение; горизонтальные линии (b и c) – отметка вспышки света; **** – $p < 0.0001$; * – $p = 0.01$; ns – $p > 0.05$ (тест Тьюки).

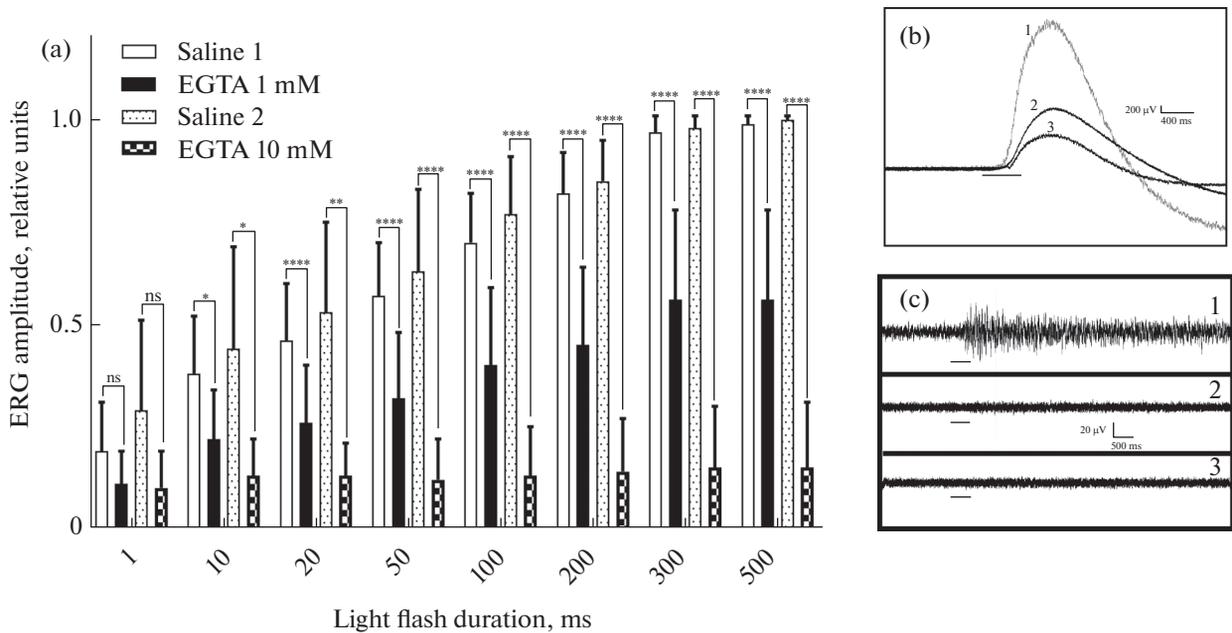


Рис. 4. Влияние EGTA на амплитуду медленной волны и импульсного компонента ЭРГ изолированного глаза *Lymnaea stagnalis*. (a) Нормализованная и усредненная ($n = 16$) амплитуда медленной волны ЭРГ, вызванной световой вспышкой различной длительности в физиологическом растворе (Saline 1), через 30 мин добавления 1 мМ EGTA, через 1 ч восстановления физиологического раствора (Saline 2) и через 30 мин аппликации 10 мМ хелатирующего агента. (b, c) Примеры волн ЭРГ (b) и импульсных ответов (c), полученных на вспышку света в физиологическом растворе (1), после 30-минутного применения EGTA в концентрации 1 мМ (2) и 10 мМ EGTA (3). Обозначения: вертикальные линии – стандартное отклонение; горизонтальные линии (b и c) – отметка вспышки света; **** – $p < 0.0001$; ** – $p = 0.0026$; * – $p < 0.05$; ns – $p > 0.05$ (тест Шидака).

циевом растворе. Однако применение 1 мМ EGTA приводило к быстрому снижению амплитуды медленной волны ЭРГ на 40–50%. Возврат к бескальциевому раствору приводил к небольшому росту волны ЭРГ, а переход к физиологическому раствору сопровождался увеличением как амплитуды волны (рис. 5a), так и импульсной активности (рис. 5b) практически до исходных величин.

DTZ в концентрациях до 0.1 мМ не оказывал статистически значимых отклонений амплитуды волны ЭРГ от контроля, так и заметных изменений импульсной активности в ответ на световые стимулы всех использованных значений длительности. В некоторых случаях возврат к физиологическому раствору после аппликации DTZ сопровождался даже некоторым увеличением амплитуды ЭРГ. Статистически значимое угнетающее влияние DTZ на ЭРГ проявлялось при концентрации 0.5 мМ (рис. 6a). При этом амплитуда волны ЭРГ составила в среднем 0.43 ± 0.19 от исходной величины при длительности вспышки 1.5 с (рис. 6b). Продолжительное отмывание препарата физиологическим раствором приводило к, по крайней мере, частичному восстановлению обоих компонентов ответа на освещение (рис. 6b, c).

Анализ влияния 2-APB, DTZ и Cd^{2+} на амплитуду ЭРГ в бескальциевом растворе, содержащем 1 мМ EGTA, проводили с целью анализа возможного

вклада входящего тока Ca^{2+} в генерацию ответа фоторецепторов на световой стимул. Эти опыты выполнялись на препаратах как интактного глаза, так и после удаления хрусталика. На рисунке 7 представлены примеры ЭРГ, полученные в таких экспериментах. Во всех опытах введение в бескальциевый раствор 1 мМ EGTA уменьшало амплитуду ЭРГ до 50–60% от ее исходного значения. На этом фоне введение в раствор 0.2 мМ Cd^{2+} приводило к дальнейшему уменьшению ЭРГ, которое имело прогрессирующий и необратимый характер (рис. 7a). В таких же исходных условиях введение в раствор 1 мМ DTZ немного даже увеличивало амплитуду ЭРГ (рис. 7b), а 0.1 мМ 2-APB практически полностью ее подавляло (рис. 7c). Следует отметить, что эффект этих веществ был обратимым, а в случае восстановления бескальциевого раствора после аппликации 2-APB амплитуда ЭРГ даже увеличилась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ полученных результатов строится на представлении, что медленная волна ЭРГ представляет собой интегральный показатель рецепторных потенциалов светочувствительных клеток сетчатки. Поэтому обсуждение возможных путей фототрансдукции в сетчатке *L. stagnalis* основано

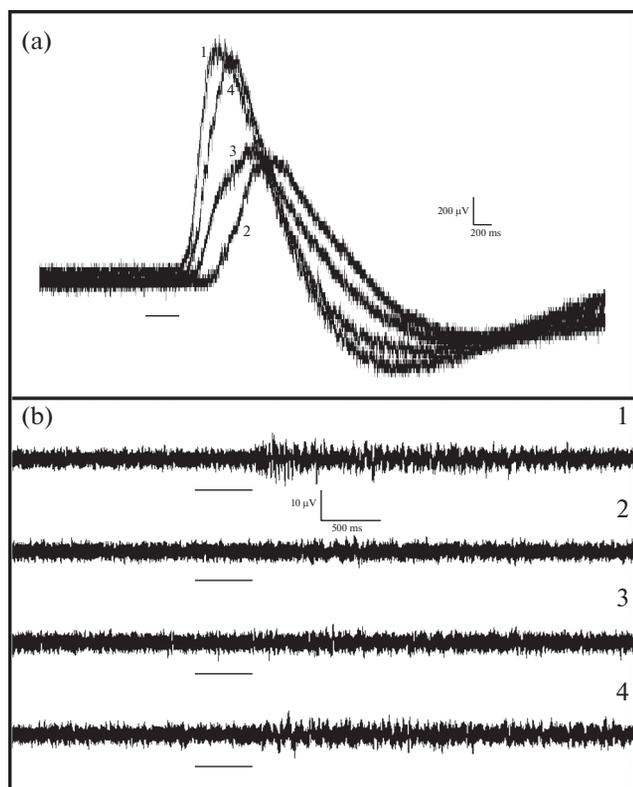


Рис. 5. Примеры записей волн ЭРГ (а) и импульсных реакций (б) изолированного глаза *Lymnaea stagnalis* с удаленным хрусталиком, полученных на световую вспышку, в бескальциевом растворе (1), после 10 мин аппликации 1 мМ EGTA (2), через 10 мин после возвращения бескальциевого раствора (3) и через 10 мин пребывания в физиологическом растворе (4). Горизонтальные линии – отметка вспышки света.

на эффектах препаратов, влияющих именно на этот компонент реакции на свет. Экспериментальные результаты, представленные в статье, указывают на важную роль Ca^{2+} в трансформации светового сигнала в фоторецепторах сетчатки *L. stagnalis*. Поскольку 2-АРВ позиционируется как модулятор высвобождения Ca^{2+} из цитоплазматических депо [24], то его ингибирующее действие на ЭРГ прудовика указывает на наличие именно этого этапа в фототрансдукции в сетчатке прудовика. Такой механизм реализуется, например, в рабдомерных фоторецепторах мечехвоста *Limulus*. В них регуляция концентрации Ca^{2+} предположительно осуществляется посредством активации рецепторов IP_3 мембран внутриклеточных депо. Применение 2-АРВ подавляет повышение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} в фоторецепторах *Limulus* и их деполяризацию, вызванную светом, а также внутриклеточной инъекцией IP_3 [25]. Однако в фоторецепторах *Drosophila* повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при фототрансдукции обеспечивается его поступлением в цитоплазму из

внешнего раствора через активируемые TRP-каналы мембран микровилл [26, 27]. Таким образом, в фоторецепторах животных даже одной таксономической группы могут реализовываться разные механизмы фототрансдукции. Такая диверсификация делает необходимым рассмотреть оба пути поступления Ca^{2+} в цитоплазму фоторецепторов *L. stagnalis*. В бескальциевом растворе сохранялась амплитуда волн ЭРГ, генерируемых препаратами как интактных глаз, так и после удаления из них хрусталика (рис. 5 и 7). Однако после введения в раствор EGTA амплитуда этого ответа уменьшалась, а оставшийся ответ подавлялся аппликацией 2-АРВ (рис. 7). Мы предлагаем следующую трактовку этой последовательности событий. В растворе, не содержащем Ca^{2+} , вблизи микровилл фоторецепторов сохраняется некоторое количество Ca^{2+} , которые не удаляются полностью путем диффузии, но могут быть связаны хелатором. В таких условиях угнетающее влияние на электрические реакции 2-АРВ может быть интерпретировано как подавление внутриклеточного выброса Ca^{2+} в цитоплазму. Отметим отсутствие заметного влияния DTZ на ЭРГ *L. stagnalis* в бескальциевом растворе в присутствии EGTA при том, что в физиологическом растворе он в концентрациях, начиная с 0.5 мМ, уменьшал амплитуду ЭРГ (рис. 6). Возможно, что в физиологическом растворе в применяемых концентрациях проявлялось его блокирующее действие на кальциевые каналы по фармакологическим свойствам близкие в Ca_v каналам, блокируемым (+)-цис-дилтиаземом.

На основании изложенного выше мы предполагаем, что процесс фототрансдукции *L. stagnalis* включает повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме как за счет стимуляции его выхода из цитоплазматических депо, так и частично за счет входящего трансмембранного тока этих ионов, подобного тому, что был обнаружен в микровиллярных фоторецепторах *Lima scarba* [28]. Судя по изменениям амплитуды ЭРГ оба пути поступления Ca^{2+} в цитоплазму фоторецепторов вносят примерно одинаковый вклад в их деполяризацию.

Подавление ЭРГ после введения в раствор Cd^{2+} проявлялось во всех вариантах растворов (физиологическом, бескальциевом и после добавления в него EGTA) при примерно одинаковой концентрации 0.2 мМ. Учитывая необратимый характер указанного влияния, а также способность Cd^{2+} проходить через плазматические мембраны [29], можно предполагать, что влияние этого иона на ЭРГ может быть результатом неспецифического деструктивного действия на белки. Однако, если увеличение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} может быть частично обеспечено входящим током этих ионов, то почему угнетающее влияние Cd^{2+} проявляется только в высоких концентрациях 0.2–0.3 мМ в физиологическом растворе. Это при том,

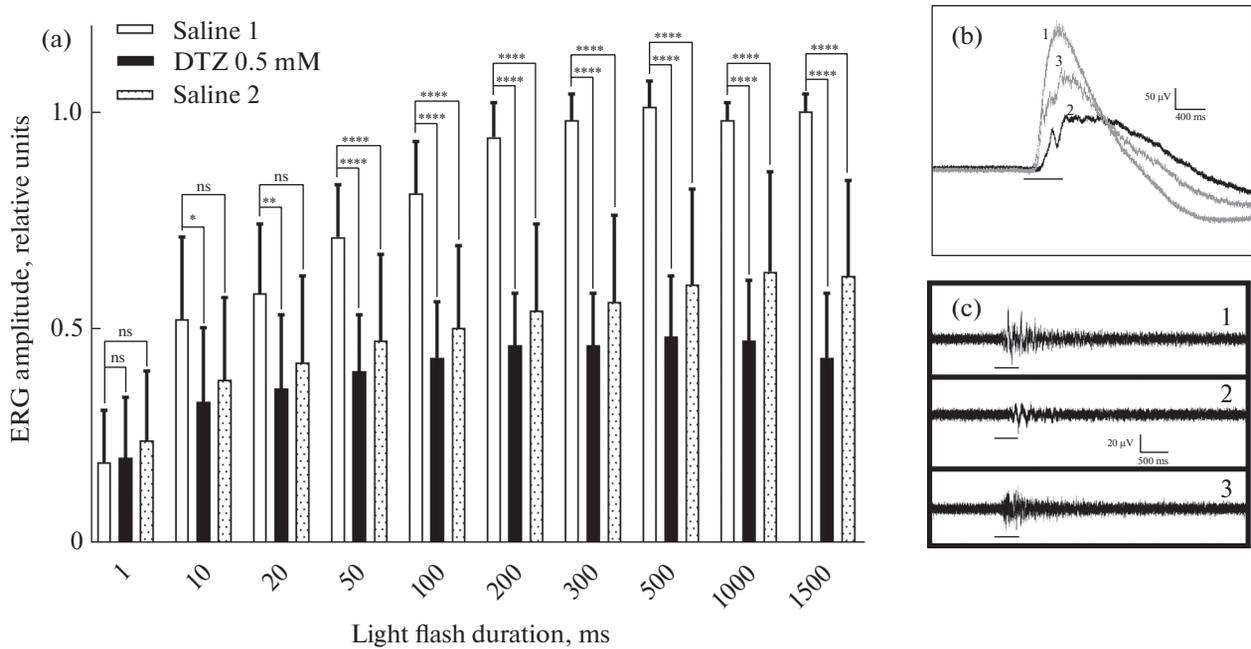


Рис. 6. Влияние DTZ на амплитуду медленной волны и импульсного компонента ЭРГ изолированного глаза *Lymnaea stagnalis*. (a) Нормализованная и усредненная ($n = 10$) амплитуда медленной волны ЭРГ, вызванной вспышкой света различной продолжительности в физиологическом растворе (Saline 1), после 30 мин добавления 0.5 мМ DTZ и спустя 1 ч после восстановления физиологического раствора (Saline 2). (b, c) Примеры записей волн ЭРГ (b) и импульсных ответов (c), полученных на световую вспышку в физиологическом растворе (1), после 30 мин аппликации 0.5 мМ DTZ (2) и 1 ч восстановления физиологического раствора. Обозначения: вертикальные линии – стандартное отклонение; горизонтальные линии (b и c) – отметка вспышки света; **** – $p < 0.0001$; ** – $p = 0.005$; * – $p = 0.019$; ns – $p > 0.05$ (тест Тьюки).

что блокирующий эффект Cd^{2+} на потенциал-зависимые кальциевые каналы проявляется уже при концентрациях в диапазоне 2–10 мкМ [21]. Таким образом, отсутствие влияния на ЭРГ низких концентраций Cd^{2+} в физиологическом растворе входит в видимое противоречие с описанным эффектом EGTA. Предположение о нечувствительности входящего тока Ca^{2+} фоторецепторов к практически миллимолярным концентрациям Cd^{2+} представляется маловероятным. Мы пока не имеем однозначного ответа на этот вопрос, который нуждается в дальнейшем изучении.

Выход Ca^{2+} из цитоплазматических депо может быть результатом гидролиза PIP_2 с образованием IP_3 и последующей активации его рецепторов, как это происходит у *Limulus* [25]. Однако, основываясь только на влиянии 2-APB на амплитуду ЭРГ *L. stagnalis*, нельзя с уверенностью утверждать, что выброс Ca^{2+} в цитоплазму фоторецепторов происходит за счет активации рецепторов IP_3 [30, 31]. Такой механизм может быть рассмотрен в качестве предположения и также нуждается в дополнительных исследованиях. Другой вопрос, где расположены депо кальция и может ли действие на них IP_3 обеспечиваться механизмом простой диффузии его молекул в цитоплазме? Электронно-микроскопический анализ не дает очевидных свидетельств

наличия таких структурных элементов в цитоплазме микровилл фоторецепторов *L. stagnalis*. При этом в стволовой части их апикальных отделов присутствуют многочисленные везикулы и внутриклеточные мембраны, которые могут быть структурной основой внутриклеточного депо ионов кальция. Предположим, что высвобождение Ca^{2+} из депо контролируется активацией рецепторов IP_3 , которая достигается повышением концентрации этого вторичного мессенджера в цитоплазме. В этом случае вопрос заключается в том, может ли образование IP_3 в мембранах микроворсинок, наиболее вероятном месте локализации родопсина, обеспечить эффективную активацию его рецепторов на внутриклеточных структурах апикальной части фоторецептора? Расчеты, основанные на величине коэффициента диффузии IP_3 в цитоплазме клеток нейробластомы, дают в предельном случае около 5 мкм как расстоянию, на котором эффективность внутриклеточного медиатора может быть равна половине максимальной [32]. Такая величина вполне согласуется с линейными размерами фоторецепторных микроворсинок *L. stagnalis*, включая их проксимальные отделы. Поэтому представляется, что геометрия фоторецепторной клетки вполне обеспечивает механизм диффузии внутриклеточного мессенджера к цитоплазматическим депо кальция.

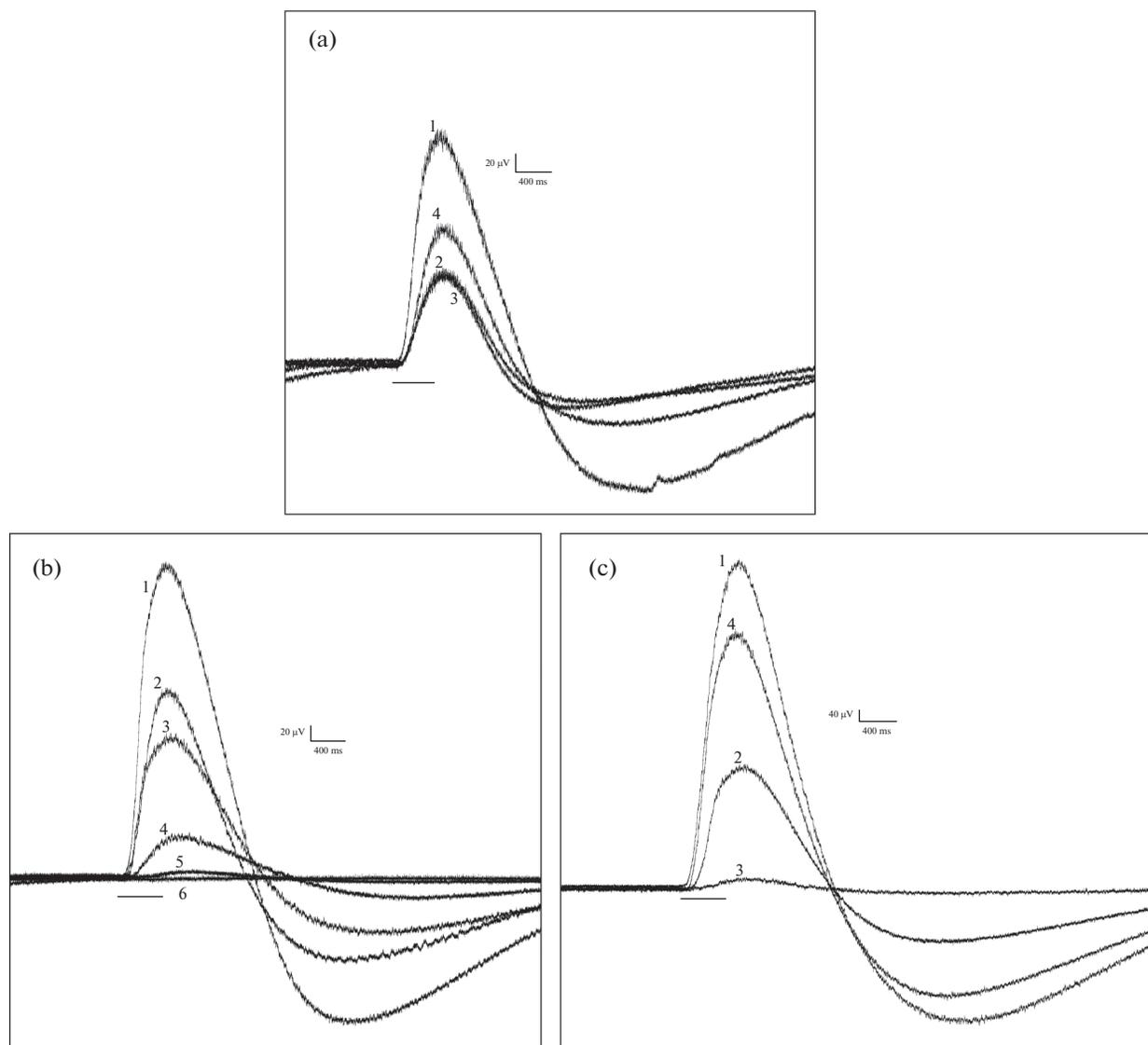


Рис. 7. Влияние 1 мМ DTZ (а), Cd^{2+} (б) и 0.1 мМ 2-АРВ (с) на ЭРГ *Lymnaea stagnalis*. Записи, представленные на (а) и (с), сделаны в бескальциевом растворе (1), после добавления 1 мМ EGTA (2) и аппликации веществ (3) и последующего возвращения исходного раствора (4). Записи, представленные на (б), сделаны: в бескальциевом растворе (1), после добавления 1 мМ EGTA (2), введения в раствор Cd^{2+} в концентрациях 0.1 мМ (3), 0.4 мМ (4) и 0.5 мМ (5) и возврата к исходному раствору (6). ЭРГ на (а) и (б) получены в опытах на препаратах изолированного глаза, а на (с) — после удаления хрусталика. Горизонтальные линии — отметка вспышки света.

Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют также о различии путей фототрансдукции в сетчатке и коже *L. stagnalis*. Основание для такого вывода видится в противоположном влиянии 2-АРВ на реакцию фоторецепторов глаза и кожи на освещение. Так, в наших экспериментах 2-АРВ в концентрациях выше 2 мкМ подавлял волну ЭРГ и импульсные реакции фоторецепторов сетчатки на освещение. При этом в концентрации до 50 мкМ 2-АРВ не оказывал заметного влияния на электрические off-реакции RPeD11 на световое раздражение кожи и поведенческое проявление теневого рефлекса. [16]. В то же время ингибирую-

щее действие DTZ в обоих исследованиях проявлялось в сходных концентрациях. В настоящее время мы не можем связать выявленные различия в действии 2-АРВ на фоторецепторы сетчатки и кожи прудовика с различиями в их строении или электрических свойствах. Реакции на свет, регистрируемые в изолированном глазу, отражают активность фоторецепторов, направляющих свои аксоны непосредственно к зрительному нерву без синаптического переключения [33]. Таким образом, эффекты фармакологических препаратов, наблюдаемые в наших экспериментах, являются результатом их влияния на микровиллярные фоторецепторы сет-

чатки. Что касается электрических off-реакций центрального нейрона RPeD11, регистрируемых при световой стимуляции кожи мантии, то они являются результатом прохождения сигнала хотя бы через один синапс, образованный на нейроне афферентными волокнами мантийного нерва [15]. При этом не очевидно, что электрические реакции на световую стимуляцию области пневмостома *L. stagnalis*, регистрируемые в самом мантийном нерве [14], принадлежат именно фоторецепторным клеткам и не трансформируются, например, в нервном сплетении кожи. Кроме того, остается неизвестным цитологический тип светочувствительных элементов кожи прудовика. По результатам электронно-микроскопического исследования сенсорных структур кожи этого моллюска функция фоторецептора была приписана цилиарным клеткам [34]. Однако это предположение до сих пор не подтверждено.

Отдельно стоит обсудить вопрос об участии Ca^{2+} в генерации импульсной составляющей ЭРГ. Как сама ЭРГ, так и электрические реакции отдельных фоторецепторов [12] состоят из градуальной волны деполяризации и возникающих на ее фоне импульсных реакций. Возможно, что эти процессы разнесены в фоторецепторах пространственно и, очевидно, обеспечиваются различными механизмами. Следует указать, что в случае ЭРГ, которая регистрируется внеклеточно, импульсный компонент представляет собой результат сложения амплитуд потенциалов действия многочисленных фоторецепторов. Поэтому увеличение амплитуды вспышки импульсов в восходящую фазу и пик волны ЭРГ могут быть результатом как увеличения частоты, так и числа возбуждающихся фоторецепторов. В случае применения 2-АРВ в целом наблюдалось соответствие амплитуд волны ЭРГ и импульсного компонента (рис. 2b, c), что объяснимо, если предположить сугубо внутриклеточный механизм действия вещества. В этом случае число и частота импульсирующих фоторецепторов зависят от амплитуд их деполяризации, являющихся, в свою очередь, конечным результатом фототрансдукции. Исчезновение же импульсной реакции при лишь частичном подавлении амплитуды волны ЭРГ, вызванном применением EGTA (рис. 4b, c), может указывать на важную роль именно внеклеточного Ca^{2+} в генерации потенциалов действия фоторецепторов. Аналогично может быть объяснено заметное уменьшение импульсного компонента ЭРГ при введении в раствор DTZ (рис. 6b, c). Что касается эффектов Cd^{2+} , то вопрос механизмов его влияния на компоненты ЭРГ требует дополнительного изучения.

Суммируя приведенные выше рассуждения, мы можем сформулировать некоторые выводы отно-

сительно механизмов преобразования светового сигнала в фоторецепторах *L. stagnalis*:

1) регуляция концентрации Ca^{2+} в цитоплазме является компонентом фототрансдукции в микровиллярных фоторецепторах сетчатки;

2) источником поступления в цитоплазму Ca^{2+} являются как внутриклеточные депо, так и внеклеточная микросреда;

3) выраженный угнетающий эффект 2-АРВ на ЭРГ при отсутствии его заметного влияния на электрические реакции центрального нейрона RPeD11, вызванные световой стимуляцией мантии [16], позволяет предполагать различия молекулярных механизмов фототрансдукции в сетчатке и коже моллюска;

4) входящий ток Ca^{2+} является компонентом механизма генерации фоторецепторами потенциалов действия.

Представленные в статье результаты и их интерпретация являются первым шагом в изучении путей преобразования света в фоторецепторах брюхоногих моллюсков, которое имеет перспективу продолжения как на клеточном, так и на молекулярном уровне.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. Д. фон Кейзерлингу и А. Агбедор (Институт анатомии, Медицинский факультет высшей технической школы Северного Рейна-Вестфалии, Ахен) за предоставленную возможность и помощь в проведении электронно-микроскопических работ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа М.В. Сафонова поддержана грантом БФУ для аспирантов (пр. № 879 от 12.11.2021), а также стартовым грантом по программе 5-100.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.В.Ж.), сбор данных (В.В.Ж, М.В.С.), обработка данных (В.В.Ж, М.В.С.), написание и редактирование манускрипта (В.В.Ж., М.В.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yau KW, Hardie RC (2009) Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139 (2): 246–264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.029>

2. Abbas F, Vinberg F (2009) Transduction and adaptation mechanisms in the cilium or microvilli of photoreceptors and olfactory receptors from insects to humans. *Front Cell Neurosci* 15: 662453. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.662453>
3. Katz B, Minke B (2009) *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Front Cell Neurosci* 3: 2. <https://doi.org/10.3389/neuro.03.002.2009>
4. Fu Y, Yau KW (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch* 454 (5): 805–819. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0194-y>
5. Nasi E, del Pilar Gomez M, Payne R (2000) Phototransduction mechanisms in microvillar and ciliary photoreceptors of invertebrates. In D.G. Stavenga, W.J. DeGrip, E.N. Pugh (eds). *Handbook of Biological Physics*. V. 3. Elsevier Science B.V. North-Holland. 389–448. [https://doi.org/10.1016/S1383-8121\(00\)80011-1](https://doi.org/10.1016/S1383-8121(00)80011-1)
6. Fain GL, Hardie R, Laughlin SB (2010) Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Curr Biol* 20(3): R114–R124. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.006>
7. Arendt D, Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteijn AW, Wittbrodt J (2004) Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* 306: 869–871. <https://doi.org/10.1126/science.1099955>
8. Gotow T, Nishi T (2009) A new photosensory function for simple photoreceptors, the intrinsically photoresponsive neurons of the sea slug *Onchidium*. *Front Cell Neurosci* 3: 18. 2009. <https://doi.org/10.3389/neuro.03.018.2009>
9. Kartelija G, Nedeljkovic M, Radenovic L (2003) Photosensitive neurons in mollusks. *Comp Biochem Physiol A* 134 (3): 483–495. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00351-3](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00351-3)
10. Katagiri Y, Katagiri Y (2008) A multiple photoreceptive system in a marine gastropod, *Onchidium*: 1) Morphological characteristics and photoresponse of four kinds of photoreceptor cells. *Hikaku seiri seikagaku (Comparative Physiology and Biochemistry)* 25 (1): 4–10. <https://doi.org/10.3330/hikakuseiriseika.25.4>
11. Sudoplatov KA, Zhukov VV (1999) Electrical responses of peripheral nerves of the mollusc *Lymnaea stagnalis* to photostimulation of skin surface. *J Evol Biochem Physiol* 35 (4): 360–369. <https://www.researchgate.net/publication/289523282>
12. Sakakibara M, Aritaka T, Iizuka A, Suzuki H, Horikoshi T, Lukowiak K (2005) Electrophysiological responses to light of neurons in the eye and statocyst of *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* 93 (1): 493–507. <https://doi.org/10.1152/jn.00692.2004>
13. Zhukov VV, Fedorenko AD, Lavrova AI, Postnikov EB (2017) Electrical responses of *Lymnaea stagnalis* to light stimulation: Effect of divalent cations. *J Evol Biochem Physiol* 53 (5): 404–413. <https://doi.org/10.1134/S0022093017050064>
14. Takigami S, Sunada H, Horikoshi T, Sakakibara M (2014) Morphological and physiological characteristics of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*. *Biophysics (Nagoya-shi)* 10: 77–88. <https://doi.org/10.2142/biophysics.10.77>
15. Sunada H, Sakaguchi T, Horikoshi T, Lukowiak K, Sakakibara M (2010) The shadow-induced withdrawal response, dermal photoreceptors, and their input to the higher-order interneuron RPeD11 in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* 213(20): 3409–3415. <https://doi.org/10.1242/jeb.043521>
16. Pankey S, Sunada H, Horikoshi T, Sakakibara M (2010) Cyclic nucleotide-gated channels are involved in phototransduction of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Physiol B* 180 (8): 1205–1211. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0490-x>
17. Stoll CJ (1973) Observations on the ultrastructure of the eye of the basommatophoran snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Proc Kon Ned Akad Wet* 76C: 414–424. <https://eurekamag.com/research/023/225/023225797.php>
18. Bobkova MV, Gál J, Zhukov VV, Shepeleva IP, Meyer-Rochow VB (2004) Variations in the Retinal Designs of Pulmonate Snails (Mollusca, Gastropoda): Squaring Phylogenetic Background and Ecophysiological Needs (I). *Invertebrate Biology* 123 (2): 101–115. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2004.tb00146.x>
19. Zhukov VV, Saphonov MV (2020) Activation of IP₃ receptors is a component of phototransduction in gastropods retina. *J Evol Biochem Physiol* 56(7): 811. <https://doi.org/10.31857/S0044452920072978>
20. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* 122 (3): 498–505. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021780>
21. Lansman JB, Hess P, Tsien RW (1986) Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol* 88 (3): 321–347. <https://doi.org/10.1085/jgp.88.3.321>
22. Dobrev D, Milde AS, Andreas K, Ravens U (1999) The effects of verapamil and diltiazem on N-, P- and Q-type calcium channels mediating dopamine release in rat striatum. *Br J Pharmacol* 127 (2): 576–582. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702574>
23. Laryushkin DP, Maiorov SA, Zinchenko VP, Gaidin SG, Kosenkov AM (2021) Role of L-Type Voltage-Gated Calcium Channels in Epileptiform Activity of Neurons. *Int J Mol Sci* 22 (19): 10342. <https://doi.org/10.3390/ijms221910342>
24. Leybaert L (2016) IP₃, still on the move but now in the slow lane. *Sci Signal* 9 (453): fs17. <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.aal1929>
25. Wang Y, Deshpande M, Payne R (2002) 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits phototransduction and blocks voltage-gated potassium channels in *Limulus* ventral photoreceptors. *Cell Calcium* 32 (4): 209–216. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001562>
26. Montell C (2012) *Drosophila* visual transduction. *Trends Neurosci* 35 (6): 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.004>
27. Hardie RC (2012) Phototransduction mechanisms in *Drosophila* microvillar photoreceptors. *WIREs Membr Transp Signal* 1: 162–187. <https://doi.org/10.1002/wmts.20>
28. del Pilar Gomez M, Nasi E (2009) Prolonged calcium influx after termination of light-induced calcium release in

- invertebrate photoreceptors. *J Gen Physiol* 134 (3): 177–189.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910214>
29. Van Kerkhove E, Pennemans V, Swennen Q (2010) Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *Biometals* 23 (5): 823–855.
<https://doi.org/10.1007/s10534-010-9357-6>
30. Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM (2002) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca^{2+} release. *FASEB J* 16 (10): 1145–1150.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0037rev>
31. Prakriya M, Lewis RS (2001) Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 536 (1): 3–19.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00003.x>
32. Dickinson GD, Ellefsen KL, Dawson SP, Pearson JE, Parker I (2016) Hindered cytoplasmic diffusion of inositol trisphosphate restricts its cellular range of action. *Sci Signal* 9 (453): ra108.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aag1625>
33. Zhukov VV (2007) On the problem of retinal transmitters of the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J Evol Biochem Phys* 43 (5): 524–532.
<https://doi.org/10.1134/S0022093007050118>
34. Zylstra U (1972) Distribution and ultrastructure of epidermal sensory cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Neth J Zool* 22: 283–298.
<https://doi.org/10.1163/002829672X00103>

CALCIUM COMPONENT OF THE RETINAL LIGHT RESPONSE IN THE SNAIL *LYMNAEA STAGNALIS*: A PHARMACOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY

V. V. Zhukov^{a,#} and M. V. Saphonov^a

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

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

The study aimed to analyze the role and sources of calcium ions during the retinal light response in the freshwater pond snail *Lymnaea stagnalis*. We explored the effect of the following pharmacological agents modulating intracellular Ca^{2+} concentration on the electroretinogram (ERG) of an isolated eye: 2-aminoethyl diphenyl borate, a Ca^{2+} current modulator; EGTA, a Ca^{2+} chelator; (+)-cis-diltiazem and Cd^{2+} , Ca^{2+} channel blockers. All these agents suppressed the slow ERG wave and associated impulse activity with varying degrees of effectiveness and reversibility. It was concluded that light response of *L. stagnalis* microvillar photoreceptors is accompanied by an elevation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. Together with ultrastructural features of photoreceptors, our results suggest that during the light response calcium ions are not only released from the apical intracellular Ca^{2+} stores, but, at least partly, enter from the extracellular medium.

Keywords: *Lymnaea stagnalis*, retina, photoreceptors, ultrastructure, phototransduction, electroretinogram, pharmacological analysis, Ca^{2+}

ВИТАМИН D3 ИНГИБИРУЕТ ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ АСТРОЦИТОВ МОЗГА КРЫСЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

© 2022 г. Т. В. Соколова^{1,*}, М. П. Рычкова¹, Н. Е. Басова¹, М. Г. Ефимова^{1,**}

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

*e-mail: sokolt1956@mail.ru

**e-mail: yefimova3@gmail.com

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 01.04.2022 г.

Дефицит витамина D3 рассматривают в качестве фактора риска при развитии нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся повышенным образованием апоптотических субстратов. В ткани мозга млекопитающих первичным сенсором апоптотических субстратов являются астроглиальные клетки, обладающие фагоцитарной активностью. В настоящей работе был изучен вопрос о влиянии витамина D3 в составе коммерческих препаратов “ДЕТРИМЕД D3” и “Витамин D3 2000МЕ” на фагоцитарную активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре. Впервые установлено, что витамин D3 является мощным природным ингибитором фагоцитарной активности астроцитов. Предварительная инкубация астроцитов с 10 мкМ витамина D3 приводила к снижению фагоцитарной активности астроцитов (в 1.9 и 3.5 раза по отношению к контролю, при использовании препаратов “ДЕТРИМЕД D3” и “Витамин D3 2000МЕ” соответственно). Этот эффект сопровождался достоверным истощением активного расщепляющего компартмента астроцитов, к которому относятся компоненты эндо-лизосомальной системы (на 31% по сравнению с контролем). Результаты проведенного исследования могут быть использованы в клинической практике для корректировки существующих стратегий лечения с применением витамина D3 у пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, сопровождающимися накоплением апоптотических субстратов.

Ключевые слова: астроциты, фагоцитоз, витамин D3

DOI: 10.31857/S0044452922030068

Витамин D3 (холекальциферол) является плейотропным гормоноподобным соединением, ответственным за регуляцию гомеостаза ионов кальция в организме. Кроме этого, витамин D3 вовлечен в процессы дифференцировки различных типов клеток, обладает иммуномодулирующей активностью, а также способностью ингибировать пролиферацию различных типов нормальных и раковых клеток [1].

Доставка витамина D3 клеткам различных тканей осуществляется с помощью витамин-D связывающего белка (DBP), который синтезируется в печени и секретируется в кровоток [2]. DBP также выявляется в цереброспинальной жидкости, но в меньших концентрациях по сравнению с плазмой крови [3]. DBP структурно сходен с альбумином, который, как полагают, также способен участвовать в связывании витамина D3 [1]. Незначительное количество витамина D3, не связанного с DBP, поступает в клетки путем диффузии [1], однако основная доля комплекса витамин D3-DBP доставляется путем эндоцитоза, опосредованного белками кавеолином и мегалином (caveolin-, megalin-

mediated endocytosis) [4]. После диссоциации комплекса витамин D3-DBP, DBP расщепляется, а холекальциферол гидроксилируется до его биологически активного метаболита $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ с помощью белка CYP27B1, принадлежащего семейству цитохромов P450 [1].

Два типа высокоаффинных рецепторов витамина D (VDR, vitamin D-receptor), а именно ядерный (nVDR) и мембранный (mVDR) опосредуют геномный и внегеномный ответ клетки соответственно. При этом nVDR является ядерным лиганд-зависимым фактором транскрипции, который в комплексе с активной формой витамина D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) регулирует экспрессию более чем 900 генов, в то время как mVDR обеспечивает быстрый ответ клетки за счет запуска различных каскадов клеточной сигнализации [1]. Полагают, что в большинстве случаев ответ клетки на воздействие витамина D3 представляет собой сочетанный эффект активации ядерного и мембранного рецепторов.

В современной литературе широко обсуждается роль витамина D3 в ЦНС. Рецепторы витамина D3 обнаружены в нейрональных и глиальных клетках мозга млекопитающих в эмбриональный, ранний и поздний постнатальный периоды. При этом обнаруживается сходство в распределении VDR у экспериментальных животных и человека [5]. VDR детектируются в гиппокампе, коре головного мозга и лимбической системе человека и животных, а также обонятельном, зрительном и слуховом центрах мозга [5], что свидетельствует о значимости витамина D3 для реализации процессов обучения и памяти, а также для осуществления сенсорных функций.

Недавние исследования показали, что мембранный и ядерный рецепторы витамина D3, а также CYP27B1-белок, ответственный за конверсию витамина D3 в его биологически активную форму, экспрессируются в астроцитах мозга [6]. Астроциты являются наиболее многочисленными клетками нейроглии, количество которых достигает 40% от общей популяции клеток головного мозга [7]. Астроциты отвечают за реализацию многообразных функций в ЦНС. Так, они создают специфическое микроокружение для нейронов, обеспечивая условия для генерации и передачи нервных импульсов, участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера, осуществляют опорную, трофическую и секреторную функции. Кроме этого, астроциты являются непрофессиональными фагоцитами мозга. К числу последних, согласно общепринятой терминологии [8], относятся клетки негематопоэтического происхождения. Это отличает астроциты от микроглиальных клеток мозга, имеющих гематопоэтическое происхождение и относящихся к профессиональным фагоцитам. За счет фагоцитарной активности астроцитов происходит ликвидация синапсов в развивающемся и зрелом мозге [9]. Кроме этого, астроциты принимают участие в удалении апоптотических субстратов, возникающих в ходе старения, а также при различных патологических состояниях ЦНС. Своевременное и полное удаление апоптотических субстратов необходимо для поддержания тканевого гомеостаза, а также для того, чтобы исключить возникновение аутоиммунных реакций в ответ на внутриклеточные антигены, высвобождающиеся из поврежденных и/или апоптотических клеток [10]. Фагоцитарная активность астроцитов опосредуется двумя рецепторными белками плазматической мембраны: MEGF10 (Multiple EGF-Like Domains 10) и рецепторной тирозинкиназой MERTK (Mer proto-oncogene Tyrosine Kinase) [11], последней отводится ключевая роль в удалении миелиновых обломков, образующихся в ходе естественных процессов обновления миелина [12]. Нарушение процесса удаления/расщепления миелина наблюдается при состоянии острой демиелинизации, характерной для рассеянного склероза [13].

Ряд авторов полагают, что применение высоких доз витамина D3 способствует замедлению развития рассеянного склероза, а также других нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера и Паркинсона), сопровождающихся возникновением апоптотических субстратов в ЦНС [6, 14]. Однако накопленные экспериментальные данные не позволяют установить четкую корреляцию между уровнем витамина D3 и развитием/течением нейродегенеративного состояния. Более того, в некоторых случаях показано, что достаточное количество витамина D3 отягощает течение патологического процесса [14].

Учитывая вышеизложенное, а также принимая во внимание важную роль астроцитов в поддержании тканевого гомеостаза в ЦНС, целью настоящей работы составило выяснение вопроса о возможной роли витамина D3 в процессе удаления апоптотических субстратов астроглиальными клетками мозга. Задачами настоящего исследования явилось изучение влияния различных коммерческих препаратов витамина D3 на эффективность фагоцитоза апоптотических субстратов астроцитами мозга крысы в первичной культуре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичная культура астроглии

Астроциты выделяли из мозга новорожденных крыс по методу [15]. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10% инактивированной фетальной сыворотки теленка (Биолот, Россия) и антибиотики (пенициллин G 50 Ед/мл и стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот Россия). Культивирование производили в чашках Петри (Ø3.5 см, Orange scientific) или в 24-луночных планшетах (Orange scientific) в течение 7–9 дней при 37°C и 5% CO₂ до достижения 75%-ной конfluence. О жизнеспособности клеток судили по окрашиванию Trypan Blue (Биолот, Россия), способному проникать через поврежденные клеточные мембраны.

Субстраты фагоцитоза

В качестве апоптотического субстрата фагоцитоза использовали фракцию наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки крысы, которую выделяли по модифицированному методу [16]. Конъюгацию препаратов НСП с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC, Merck, Германия) осуществляли, как нами было описано ранее [17]. Клетки промывали фосфатно-солевым раствором, рН 7.4 (PBS), после чего инкубировали в среде DMEM, содержащей 2% инактивированной фетальной сыворотки теленка, и добавляли субстраты фагоцитоза в соотношении 1: 10 (клетка/субстрат фагоцитоза; подсчет

клеток и фрагментов НСП проводили с использованием камеры Фукса–Розенталя).

В предварительных исследованиях нашей лаборатории был детально изучен процесс фагоцитоза апоптотических субстратов различного типа астроцитами мозга крысы в первичной культуре и исследованы кинетические характеристики этого процесса [18]. При этом нами было установлено, что в качестве субстрата апоптотического типа может быть использована изолированная фракция НСП крыс. Действительно, в процессе фагоцитоза НСП распознаются и поглощаются астроцитами мозга с кинетическими параметрами, которые сопоставимы с таковыми, характерными для захвата и поглощения апоптотических нейронов. Поэтому в настоящей работе в качестве субстрата фагоцитоза мы использовали изолированную фракцию НСП, а стандартное время инкубации астроцитов мозга с апоптотическим субстратом составило 3 ч.

Обработка клеток коммерческими препаратами витамина D3

Использовали 2 типа коммерческих препаратов: капли “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор; ООО “Медикал горизонт”, Армения) и капсулы “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор в капсулах; Gross Hertz; ООО “Миролла”, Россия). Диапазон тестируемых концентраций витамина D3 составлял от 0.1 до 100 мкМ; время предынкубации с препаратами составляло 1 и 24 ч. После инкубации клеток с указанными препаратами в культуральную среду, содержащую витамин D3, добавляли конъюгат FITC-НСП и инкубировали клетки в течение 3 ч. По окончании инкубации производили оценку фагоцитарной и лизосомальной активности астроцитов (см. ниже).

Анализ фагоцитарной активности астроцитов мозга

После окончания инкубации с НСП излишки субстрата отмывали охлажденным PBS и проводили фиксацию клеток в течение 3–5 мин в 4%-ном параформальдегиде, приготовленном на PBS. После промывки препаратов раствором PBS проводили окраску ядер 0.001%-ным раствором Hoechst 33258/PBS (Serva, Германия). Результаты опытов оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Imager.A1, Axio (Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCamMRc (Zeiss, Германия). При оценке фагоцитарной активности клетки фотографировали и оценивали 2 параметра: 1) общее количество субстрата, взаимодействующего с клетками (субстрат, связанный фагоцитом + субстрат, поглощенный фагоцитом), 2) субстрат, поглощенный фагоцитом (далее в тексте мы будем использовать эти обозначения как параметр 1 и параметр 2). В случае параметра 1 мы производи-

ли подсчет площади, занимаемой субстратом фагоцитоза (зеленое окрашивание), и относили его к числу ядер клеток (синее окрашивание). В случае параметра 2 оценивали количество клеток, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеарной области (субстрат, поглощенный фагоцитом) в % к общему числу клеток в препарате. Для количественного анализа для каждой точки в эксперименте использовали 2 параллельных стекла. На каждом стекле проводили фотофиксацию 15 случайно выбранных полей, содержащих суммарно до 1500 клеток. Всего было проведено 3–5 независимых экспериментов. Необходимые расчеты проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Оценка активного расщепляющего компартмента астроцитов мозга

Оценку активного расщепляющего компартмента астроцитов мозга проводили по методу [19] с модификациями. При этом использовали метод количественной микроскопии, а также проводили количественную оценку методом флуоресцентной фотометрии. По окончании инкубации клеток с апоптотическими субстратами производили промывку раствором PBS, далее добавляли 50 мкМ лизосомотропного агента монодансилкадаверина (D4008, Sigma-Aldrich), приготовленного на PBS, pH 7.4, и инкубировали клетки в течение 10 мин при 37° С. После инкубации клетки промывали 4 раза раствором PBS, после чего либо лизировали клетки раствором 10 мМ Tris-HCl, pH 8.0, содержащего 0.1% Triton X-100, либо анализировали на флуоресцентном микроскопе и фотографировали с помощью камеры (см. выше). О количестве внутриклеточного монодансилкадаверина (MDC) судили по данным флуоресцентной фотометрии (при длинах волн возбуждения и эмиссии 365 и 525 нм соответственно), которую осуществляли с использованием планшетного ридера CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия). Полученные величины относили к содержанию ДНК. Для этого в каждую пробу добавляли раствор бромистого этидия (EtBr, конечная концентрация 0.2 мкМ) и считывали флуоресценцию (длина волны возбуждения и эмиссии 530 и 590 нм соответственно). Для количественного анализа для каждой точки в эксперименте использовали 4 параллельных пробы, содержащих до 500 000 клеток каждая. Расчетная величина для каждой пробы представляла собой соотношение MDC/EtBr. Всего было проведено 3 независимых эксперимента.

Статистическая обработка результатов

Во всех опытах статистическую обработку результатов осуществляли на основании однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), при-

Таблица 1. Общее количество апоптотического субстрата (связанный + поглощенный) в астроцитах мозга крысы (параметр 1) при различном времени предварительной инкубации с препаратами “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) и “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор)

Время инкубации (ч)	Контроль (+ НСП)	+ НСП + витамин D3 (мкМ) (масляный раствор)				+ НСП + витамин D3 (мкМ) (водный раствор)	
		0.1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	1 мкМ	10 мкМ
24	145.3 ± 21.1 (n = 56)	0.1 мкМ	1 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	1 мкМ	10 мкМ
		123.9 ± 20.5 (n = 13)	168.9 ± 45.5 (n = 17)	173.6 ± 17.2 (n = 45)	211.1 ± 30.9 (n = 25)	189.2 ± 41.8 (n = 31)	187.4 ± 42.7 (n = 11)
1	153.6 ± 17.5 (n = 55)	–	111.3 ± 17.5 (n = 19)	85.0 ± 19.3* (n = 47)	122.6 ± 16.6 (n = 15)	–	–

* Различия достоверны при $p < 0.05$.

меняя тест для множественных сравнений Бонферрони. Предварительно была проведена проверка выборок на нормальность распределения при помощи теста Шапиро–Уилка (GraphPad-Prism (SanDiego, США)). Данные таблиц и гистограмм представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительная инкубация с витамином D3 приводит к снижению фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в первичной культуре

В первой серии опытов мы оценили фагоцитарную активность астроцитов мозга в присутствии коммерческих препаратов витамина D3: “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор) и “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор). Поскольку в литературе полагают, что ответ клеток на воздействие витамина D3 представляет собой сочетанный эффект от активации ядерного и мембранного рецепторов, в первой серии опытов время предварительной инкубации астроцитов с препаратами витамина D3 составило 24 ч, после чего к клеткам добавляли субстрат фагоцитоза. Диапазон тестируемых концентраций витамина D3 в коммерческих препаратах варьировал в пределах от 0.1 до 100 мкМ.

Результаты опытов приведены на рис. 1. Из данных рисунка следует, что в обоих случаях инкубация астроцитов с витамином D3 приводила к снижению числа клеток, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеарной области (рис. 1a,b). Статистическая обработка данных показала, что общее количество флуоресцентного субстрата в клетках, прошедших предварительную инкубацию с коммерческими препаратами витамина D3 (параметр 1), не претерпевает достоверных изменений по сравнению с контролем при концентрации витамина D3 в препаратах от 0.1 до 100 мкМ (масляный раствор) и от 0.1 до 10 мкМ (водный раствор) (табл. 1).

В то же время оценка числа астроцитов, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеар-

ной области, выявила достоверное снижение этого параметра по сравнению с контролем при концентрациях витамина D3 от 0.1 до 100 мкМ в случае использования препарата “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) и от 1 до 10 мкМ в случае использования препарата “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор) (рис. 1d, e). При этом эффект препарата “ДЕТРИМЕД D3” был выражен несколько сильнее, чем у препарата “Витамин D3 2000МЕ”. Так, при концентрации 10 мкМ витамина D3 (водный раствор) количество клеток, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеарной области, снижалось в 3.5 раза по сравнению с контролем ($22.4 \pm 2.1\%$ ($n = 50$) контроль; $6.4 \pm 0.8\%$ ($n = 56$) ДЕТРИМЕД D3), в то время как в случае масляного раствора в 1.9 раза соответственно ($19.9 \pm 1.2\%$ ($n = 80$) контроль; $10.4 \pm 1.0\%$ ($n = 76$) “Витамин D3 2000МЕ”). Следует специально отметить, что при оценке влияния препарата “Витамин D3 2000МЕ” на фагоцитарную активность астроцитов в качестве контроля мы использовали очищенное масло подсолнечника, которое производитель препарата указывает в качестве растворителя. Согласно нашим данным (рис. 1d), при инкубации астроцитов с маслом подсолнечника наблюдалась тенденция к снижению общего количества флуоресцентного субстрата (параметр 1). В то же время производитель препарата “ДЕТРИМЕД D3” не указывает состав соответствующего растворителя и/или эмульгатора, поэтому в данном случае в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество раствора PBS. В связи с вышесказанным, в последующих опытах для оценки влияния витамина D3 на фагоцитарную активность астроцитов мозга крысы основное внимание уделялось препарату “Витамин D3 2000МЕ”.

Кратковременная инкубация с витамином D3 приводит к снижению фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в первичной культуре

В следующей серии опытов мы оценили влияние кратковременной инкубации астроцитов мозга

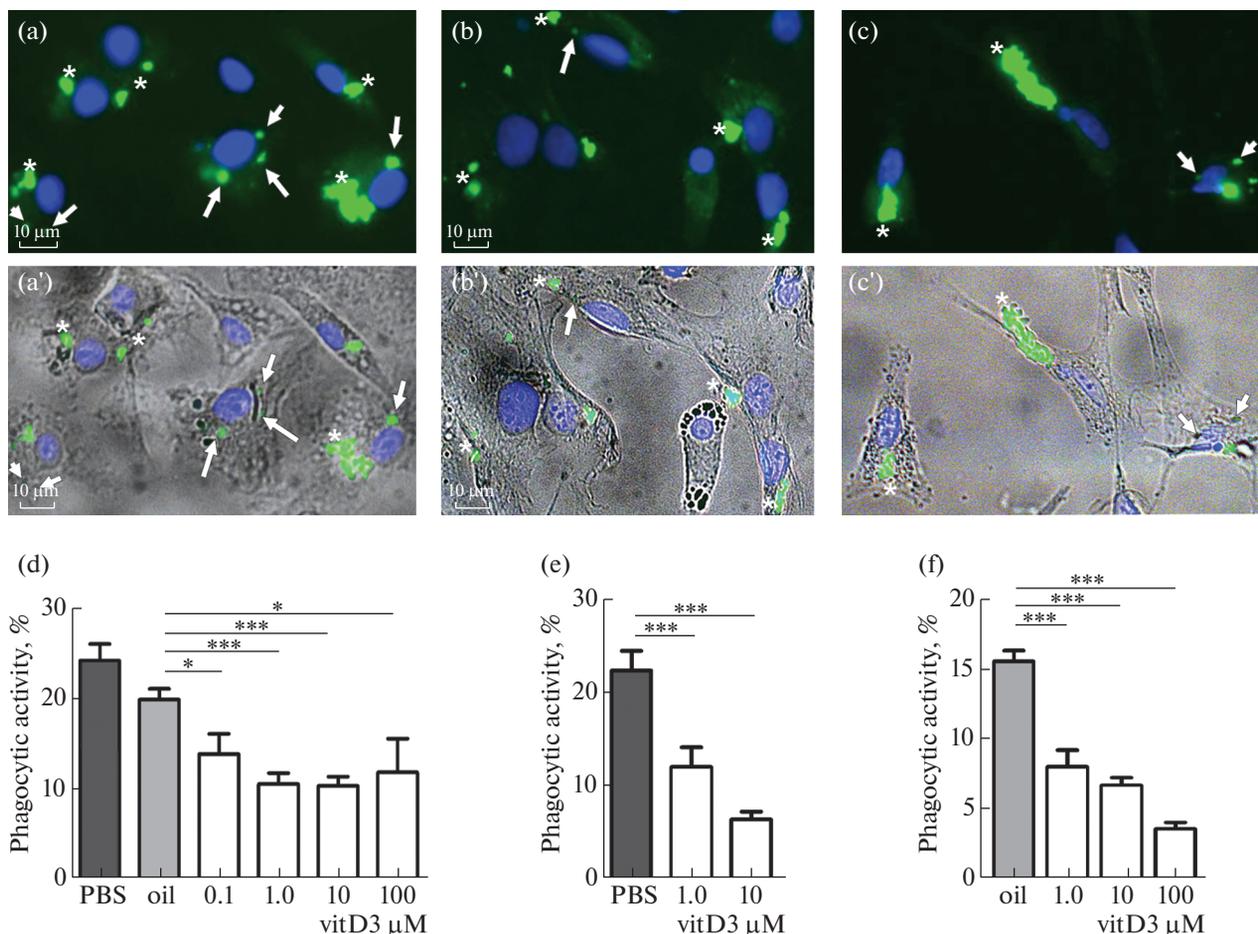


Рис. 1. Фагоцитарная активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре, прошедших предварительную инкубацию с коммерческими препаратами витамина D3. (a, a') – контрольные препараты астроцитов мозга после инкубации с конъюгатом НСП-FITC. (a') получен с помощью наслоения на панель (a) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (b, b') – препараты астроцитов мозга крысы, подвергнутых предварительной инкубации с препаратом “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) и далее проинкубированных с конъюгатом НСП-FITC. (b') получен с помощью наслоения на панель (b) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (c, c') – препараты астроцитов мозга крысы, подвергнутых предварительной инкубации с препаратом “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор) и далее проинкубированных с конъюгатом НСП-FITC. (c') получен с помощью наслоения на панель (c) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (d, e, f) – количественная оценка фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы (параметр 2), прошедших предварительную инкубацию с препаратами “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) (d) и “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор) (e) в течение 24 ч и с препаратом “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) в течение 1 ч (f). ** – различия достоверны при $p < 0.001$; * – различия достоверны при $p < 0.05$. Стрелками отмечены конъюгаты НСП-FITC в перинуклеарной области астроцитов, звездочками отмечены конъюгаты НСП-FITC на периферии клеток. По вертикальной оси (d, e, f) отложена фагоцитарная активность клеток (параметр 2 (%)). По горизонтальной оси отложена концентрация холекальциферола (мкМ) в коммерческих препаратах обоих типов.

крысы с коммерческим препаратом “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) на фагоцитарную активность клеток. Во всех опытах время инкубации астроцитов с витамином D3 составляло 1 ч, после чего к клеткам добавляли препараты НСП. Результаты, полученные в этой серии опытов, представлены на рис. 1 и в табл. 1. Как следует из данных, приведенных на рис. 1f, кратковременная инкубация с препаратом “Витамин D3 2000МЕ” также вызывала достоверное снижение фагоцитарной активности астроцитов при всех изученных концентрациях препарата. Наибольший эффект наблюда-

ли при концентрациях витамина D3 10 и 100 мкМ по отношению к контролю ($6.7 \pm 0.6\%$, $n = 99$; $3.6 \pm 0.6\%$, $n = 30$ и $15.4\% \pm 1.0\%$, $n = 154$ соответственно). Таким образом, выраженность ингибирующего эффекта витамина D3 на фагоцитарную активность астроцитов в результате предварительной 1- и 24-часовой инкубации клеток с препаратом “Витамин D3 2000МЕ” примерно одинакова (рис. 1d, e, f). Однако в отличие от предыдущей серии опытов в данном случае мы наблюдали достоверное снижение общего количества флуоресцентного субстрата в клетках, прошедших предвари-

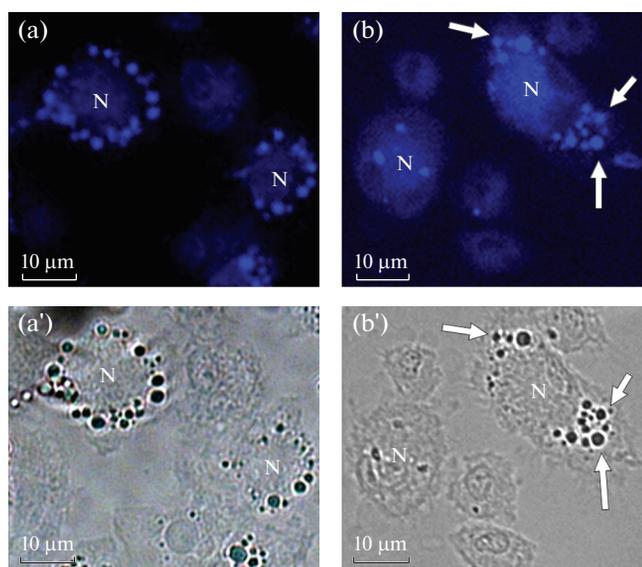


Рис. 2. Распределение монодансилкадаверина (MDC) в контрольных препаратах астроцитов мозга крысы в первичной культуре и после инкубации с апоптотическим субстратом. (а, а') – контрольные препараты астроцитов мозга крысы. (а') получен с помощью наслоения на панель (а) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (b, b') – контрольные препараты астроцитов мозга после инкубации с конъюгатом НСП-ФИТС. (b') получен с помощью наслоения на панель (b) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. Стрелками отмечено распределение MDC на периферии клеток. N – ядро клетки.

тельную инкубацию с препаратом “Витамин D3 2000МЕ” при концентрации 10 мкМ, и тенденцию к снижению при концентрациях 1 и 100 мкМ (параметр 1) (табл. 1). Эти данные могут свидетельствовать в пользу того, что кратковременная инкубация с витамином D3 влияет на процесс распознавания и/или связывания апоптотического субстрата астроглиальными клетками мозга.

Фагоцитарная активность астроцитов сопровождается истощением активного расщепляющего компартмента клеток

В результате процесса фагоцитоза субстрат, поглощенный клеткой-фагоцитом, подвергается расщеплению с участием лизосомальных протеаз. В большинстве случаев в ответ на поступление субстрата количество лизосом в фагоцитарной клетке пропорционально возрастает, что обеспечивает эффективную деградацию поглощенного субстрата кислыми гидролазами [20–22]. Однако известно, что для астроцитов мозга характерна низкая способность к расщеплению поглощенного субстрата [23]. В связи с этим в следующей серии опытов представляло интерес изучить вопрос об относительном количестве/динамике лизосом в астро-

цитах, реализующих фагоцитоз апоптотических субстратов в присутствии и/или в отсутствие витамина D3.

В этих целях мы использовали лизосомотропный агент монодансилкадаверин (MDC). MDC применяют для оценки так называемого активного расщепляющего компартмента (active degradative compartment) в клетках различных типов [19]. Как правило, при добавлении к живым клеткам MDC распределяется в перинуклеарной области, в соответствии с внутриклеточной локализацией лизосом [23]. На рис. 2 приведены результаты типичного опыта по распределению MDC в контрольных препаратах астроцитов мозга и после добавления субстратов фагоцитоза. Как следует из данных рисунка, действительно, в контрольных препаратах лизосомотропный агент MDC распределен в перинуклеарной области астроцитов [23]. При этом обращает на себя внимание одинаковый размер частиц, окрашенных MDC. Однако в результате инкубации с препаратами НСП распределение и размеры этих частиц меняются. Наблюдается сдвиг частиц к периферии клетки, а размеры флуоресцентных частиц перестают быть однородными. Последнее может свидетельствовать о процессе слияния лизосом с первичной фагосомой, содержащей захваченный субстрат. Кроме этого, в результате инкубации с НСП, в астроцитах мозга выявляется тенденция к снижению общего количества частиц, окрашенных MDC.

Инкубация с витамином D3 препятствует истощению активного расщепляющего компартмента астроцитов

Для того, чтобы провести количественную оценку наблюдаемого феномена и выявить влияние витамина D3, в следующей серии опытов мы применили метод флуоресцентной фотометрии. Полученные результаты сведены в рис. 3. Из данных рисунка следует, что в результате фагоцитоза НСП количество лизосом в астроцитах мозга достоверно снижается (на 31% по сравнению с контролем). В то же время в клетках, прошедших предварительную инкубацию с витамином D3 (препарат “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор), количество расщепляющего компартмента не отличается от такового, характерного для контроля. Полученные в этой серии опытов результаты согласуются с данными предыдущих разделов работы о способности витамина D3 блокировать доставку апоптотического субстрата во внутриклеточный компартмент астроцита. Снижение количества субстрата, предназначенного для расщепления в цитоплазме астроцитов, препятствует истощению активного расщепляющего компартмента клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К настоящему времени накоплены многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о важности витамина D3 для развития и нормального функционирования ЦНС. Однако вопрос о роли витамина D3 при различных нейродегенеративных состояниях ЦНС остается открытым. В настоящем исследовании нами было впервые изучено влияние препаратов витамина D3 на процесс удаления апоптотических субстратов астроцитами мозга крысы в первичной культуре. Нами были протестированы коммерческие препараты витамина D3 “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор) и “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) и установлено, что в условиях *in vitro* эти препараты являются мощными ингибиторами фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в отношении апоптотических субстратов.

Инкубация с витамином D3 в составе препаратов “ДЕТРИМЕД D3” и “Витамин D3 2000МЕ” приводила к резкому снижению поглощения апоптотического субстрата астроцитами мозга, что выражалось в уменьшении количества фрагментов НСП в перинуклеарной области астроцитов. Обращает на себя внимание тот факт, что этот эффект проявлялся как в результате короткой (1 ч) инкубации с витамином D3, так и при длительной инкубации (24 ч). Однако выраженность ингибирующего эффекта была выше при использовании короткой инкубации, что свидетельствует в пользу вовлечения мембранного рецептора витамина D3 в реализацию ответа астроцита на воздействие экзогенного холекальциферола. В этом плане наши результаты согласуются с данными литературы о том, что воздействие витамина D3 на астроциты мозга не приводит к изменению мРНК или экспрессии белка MERTK — основного рецептора, ответственного за поглощение апоптотических субстратов и миелиновых обломков клетками астроглии [24]. Это составляет принципиальное отличие непрофессиональных фагоцитов астроцитов от микроглии — клеток гематопозитического происхождения, являющихся профессиональными фагоцитами мозга [8]. В последних инкубация с витамином D3 также приводит к снижению фагоцитарной активности, но за счет активации ядерного рецептора, приводящего к снижению экспрессии MERTK [24].

Совокупность полученных нами результатов, а также данных литературы позволяет полагать, что в ответ на воздействие витамина D3 в ткани мозга происходит снижение фагоцитарной активности обоих типов фагоцитарных клеток. При этом по времени ответа реакция астроцитов предшествует таковой, характерной для микроглии, поскольку не предполагает изменения экспрессии основного рецепторного белка MERTK. Таким образом, в отношении фагоцитарного ответа, реакция астроцитов на соответствующие стимулы опережает реак-

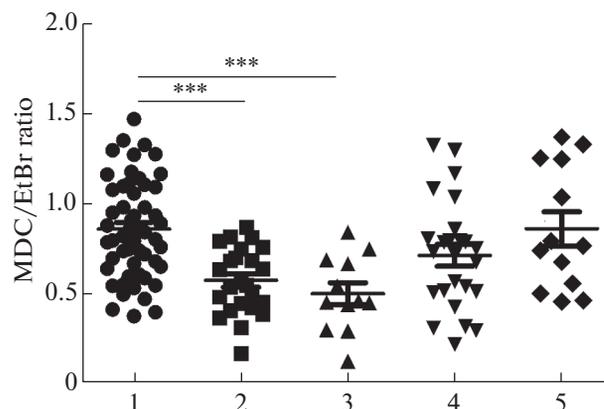


Рис. 3. Соотношение МДК/БЭ в астроцитах мозга крысы после инкубации с апоптотическим субстратом в присутствии и в отсутствие витамина D3 (препараты “Витамин D3 2000МЕ” (масляный раствор) и “ДЕТРИМЕД D3” (водный раствор)). 1 – контроль, 2 – НСП, 3 – НСП + витамин D3 1 мкМ (масляный раствор), 4 – НСП + витамин D3 10 мкМ (масляный раствор), 5 – НСП + витамин D3 10 мкМ (водный раствор). Время инкубации астроцитов мозга с препаратами витамина D составляло 1 ч; *** – различия достоверны при $p < 0.001$.

цию микроглии. Действительно, в случае фагоцитоза миелиновых обломков показано, что именно астроциты являются первичными сенсорами, запускающими процесс фагоцитоза, после чего происходит вторичная мобилизация микроглиальных клеток и инфильтрация макрофагов и Т-клеток в места локального повреждения миелиновой оболочки [25, 26].

Несмотря на быструю мобилизацию астроцитов в ответ на появление апоптотических субстратов, способность этих клеток поддерживать фагоцитарную активность, по-видимому, является ограниченной во времени, что обуславливает последующее вовлечение профессиональных фагоцитов в реализацию фагоцитарной функции. Так, недавно показано, что астроциты проявляют относительно слабую лизосомальную активность [23], в связи с чем поглощенный субстрат накапливается в цитоплазме, но не подвергается полной деградации. В то же время для профессиональных фагоцитов мозга микроглиальных клеток характерна высокая лизосомальная активность [23].

Согласно нашим результатам, фагоцитоз апоптотических субстратов действительно сопровождается истощением так называемого активного расщепляющего компартмента астроцитов, к которому относят компоненты эндо-лизосомальной системы, распознающиеся лизосомотропным агентом МДК. Действительно, в процессе фагоцитоза фрагментов НСП астроцитами мозга мы наблюдали достоверное уменьшение интенсивности флуоресцентного сигнала МДК на 31% по сравне-

нию с контролем. Истощение расщепляющего компартмента не выявлялось в препаратах астроцитов, прошедших предварительную инкубацию с витамином D₃ (10 мкМ). Этот результат полностью согласуется с нашими данными о способности холекальциферола блокировать поглощение апоптотических субстратов астроглиальными клетками мозга крысы.

Молекулярный механизм, посредством которого витамин D₃ приводит к снижению поглощения апоптотического субстрата астроцитами мозга, требует дополнительного исследования. В настоящий момент наибольший интерес представляют данные о способности витамина D₃ ингибировать протеинкиназу mTOR [27, 28], играющую важную роль в регуляции процессов роста и пролиферации клеток, а также аутофагии. Ингибирование mTOR приводит к активации аутофагии – лизосом-зависимого процесса расщепления разнообразных компонентов клетки. При этом установлено, что в непрофессиональных фагоцитах, таких как клетки пигментного эпителия глаза, клетки гранулозы фолликулов, клетки Сертоли семенников, активация аутофагии приводит к резкому снижению фагоцитарной активности за счет конкуренции обоих процессов за расщепляющий компартмент [29–31]. В связи с вышесказанным нельзя исключить, что снижение фагоцитарной активности астроцитов, прошедших предварительную инкубацию с витамином D₃, может быть обусловлена активацией аутофагии. В пользу этой гипотезы свидетельствует и истощение активного расщепляющего компартмента, которое выявляется в клетках различных типов в течение нескольких часов, последующих за активацией аутофагии [32].

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, позволяют заключить, что в условиях *in vitro* оба коммерческих препарата витамина D₃, а именно, “ДЕТРИМЕД D₃” и “Витамин D₃ 2000МЕ”, оказывают мощный ингибиторный эффект на фагоцитарную активность астроцитов, препятствуя поглощению апоптотических субстратов этими клетками. Однако степень выраженности эффекта была выше у водного препарата витамина D₃. Последнее, по-видимому, обусловлено присутствием эмульгатора, за счет которого витамин D₃ встроен в липофильные мицеллы, взаимодействующие с мембраной клеток и обеспечивающие эффективную внутриклеточную доставку холекальциферола. Что касается масляного раствора, то в данном случае можно полагать, что в доставке витамина D₃ астроцитам мозга крысы принимает участие DBP и/или альбумин. Действительно, в нашей экспериментальной системе *in vitro*, DBP и альбумин присутствуют в фетальной сыворотке теленка, входящей в состав среды культивации астроцитов.

Оба исследованных коммерческих препарата применяются в клинической практике для компенсации дефицита витамина D₃, который, как полагают, является фактором риска для развития нейродегенеративных заболеваний [33]. Действительно, в клинических исследованиях установлено, что патологические состояния ЦНС, такие как рассеянный склероз, болезни Альцгеймера и Паркинсона, сопровождаются относительным дефицитом витамина D₃. Однако добавление препаратов витамина D₃ в рацион пациентов, страдающих болезнями Альцгеймера и Паркинсона, не оказывает нейропротекторного действия [34]. Более того, в некоторых случаях применение витамина D₃ отягощает течение патологического процесса [14]. В этом плане данные, полученные в настоящей работе, могут пролить свет на механизм неблагоприятного воздействия холекальциферола на течение нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся избыточным образованием апоптотических субстратов. Действительно, ингибирование процесса поглощения апоптотических субстратов и обломков миелина астроцитами не только препятствует поддержанию тканевого гомеостаза, но также может блокировать мобилизацию микроглиальных клеток, происходящую в ответ на запуск фагоцитоза в первичных сенсорах апоптотических субстратов – астроглиальных клетках мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полное и своевременное удаление апоптотических субстратов является необходимым условием для поддержания гомеостаза во всех тканях организма. В ткани мозга млекопитающих первичным сенсором апоптотических субстратов являются астроглиальные клетки мозга. Выяснение вопросов о способах регуляции фагоцитарной активности астроцитов может способствовать выработке новых стратегий для лечения нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся появлением субстратов апоптотического типа.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.В.С., Н.Е.Б., М.П.Р. – проведение экспериментов; Т.В.С., М.Г.Е. – анализ экспериментальных данных,

статистическая обработка результатов, подготовка графических материалов, подготовка рукописи; М.Г.Е, Н.Е.Б. — подготовка и корректировка рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sirajudeen S, Shah I, Al Menhali A* (2019) A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues. *Int J Mol Sci* 20: 3832. <https://doi.org/10.3390/ijms20153832>
2. *Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F* (2020) Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front Endocrinol* 10: 910. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00910>
3. *Smolders J, Moen SM, Damoiseaux J, Huitinga I, Holmøy T* (2011) Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: access and function. *J Neurol Sci* 311: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.07.033>
4. *Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B, Ghiso J* (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4229–4234. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4229>
5. *Gáll Z, Székely O* (2021) Role of Vitamin D in Cognitive Dysfunction: New Molecular Concepts and Discrepancies between Animal and Human Findings. *Nutrients* 13: 3672. <https://doi.org/10.3390/nu13113672>
6. *Jiao KP, Li SM, Lv WY, Jv ML, He HY* (2017) Vitamin D3 repressed astrocyte activation following lipopolysaccharide stimulation in vitro and in neonatal rats. *Neuroreport* 28: 492–497. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000782>
7. *Jung YJ, Chung WS* (2018) Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol Ther (Seoul)* 26: 350–357. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.133>
8. *Rabinovitch M* (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5: 85–87. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)88955-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)88955-2)
9. *Lee JH, Kim JY, Noh S, Lee H, Lee SY, Mun JY, Park H, Chung WS* (2021) Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis. *Nature* 590: 612–617. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03060-3>
10. *Itoh M, Yano A, Li X, Miyamoto K, Takeuchi Y* (1999) Limited uptake of foreign materials by resident macrophages in murine ovarian tissues. *J Reprod Immunol* 43: 55–66. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(99)00004-2)
11. *Chung WS, Clarke L, Wang G, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, Joung J, Foo LC, Thompson A, Chen C, Smith SJ, Barres BA* (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504: 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
12. *Healy LM, Perron G, Won SY, Michell-Robinson MA, Rezk A, Ludwin SK, Moore CS, Hall JA, Bar-Or A, Antel JP* (2016) MerTK Is a Functional Regulator of Myelin Phagocytosis by Human Myeloid Cells. *J Immunol* 196: 3375–3384. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502562>
13. *Franklin RJM, Ffrench-Constant C* (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9: 839e855. <https://doi.org/10.1038/nrn2480>
14. *Koduah P, Paul F, Dörr JM* (2017) Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *EPMA J* 8: 313–325. <https://doi.org/10.1007/s13167-017-0120-8>
15. *Hamprecht B, Löffler F* (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109: 341–345. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(85\)09097-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(85)09097-8)
16. *Militante JD, Lombardini JB* (2000) Stabilization of calcium uptake in rat rod outer segments by taurine and ATP. *Amino Acids* 19: 561–570. <https://doi.org/10.1007/s007260070006>
17. *Yefimova MG, Messaddeq N, Harnois T, Meunier AC, Clarhaut J, Noblanc A, Weickert JL, Cantereau A, Philippe M, Bourmeyster N, Benzakour O* (2013) A chimerical phagocytosis model reveals the recruitment by Sertoli cells of autophagy for the degradation of ingested illegitimate substrates. *Autophagy* 9: 653–666. <https://doi.org/10.4161/auto.23839>
18. *Соколова ТВ, Васильев ДС, Рычкова МП, Аврова НФ, Ефимова МГ* (2020) Фагоцитоз апоптотических субстратов сопровождается пролиферацией астроглиальных клеток мозга крыс в первичной культуре. Журн эвол биохим физиол 56: 81–84. [Sokolova TV, Vasilyev DS, Rychkova MP, Avrova NF, Yefimova MG (2020) Phagocytosis of Apoptotic Substrates Is Accompanied by Proliferation of Cultured Rat Primary Astrocytes. *J Evol Biochem Physiol* 56: 81–84. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093020010111>
19. *Vázquez CL, Colombo MI* (2009) Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods Enzymol* 452: 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03606-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03606-9)
20. *LaVail MM* (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194: 1071–1074. <https://doi.org/10.1126/science.982063>
21. *Chemes H* (1986) The phagocytic function of Sertoli cells: a morphological, biochemical, and endocrinological study of lysosomes and acid phosphatase localization in the rat testis. *Endocrinology* 119: 1673–1681. <https://doi.org/10.1210/endo-119-4-1673>
22. *Yefimova MG, Lefevre C, Bashamboo A, Eozenou C, Burel A, Lavault MT, Meunier AC, Pimentel C, Veau S, Neyroud AS, Jaillard S, Jégou B, Bourmeyster N, Ravel C* (2020) Granulosa cells provide elimination of apoptotic oocytes through unconventional autophagy-assisted phagocytosis. *Hum Reprod* 35: 1346–1362. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa097>
23. *Lööv C, Mitchell CH, Simonsson M, Erlandsson A* (2015) Slow degradation in phagocytic astrocytes can be enhanced by lysosomal acidification. *Glia* 63: 1997–2009. <https://doi.org/10.1002/glia.22873>

24. Clarke J, Yaqubi M, Futhey NC, Sedaghat S, Baufeld C, Blain M, Baranzini S, Butovsky O, Antel J, White JH, Healy LM (2020) Vitamin D Regulates MerTK-Dependent Phagocytosis in Human Myeloid Cells. *J Immunol* 205: 398–406.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000129
25. Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, Sahinkaya FR, Vortmeyer A, Raine CS, Pitt D (2017) Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain* 140: 399–413.
https://doi.org/10.1093/brain/aww298
26. Damisah EC, Hill RA, Rai A, Chen F, Rothlin CV, Ghosh S, Grutzendler J (2020) Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo. *Sci Adv* 6: eaba 3239.
https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3239
27. Lisse TS, Hewison M (2011) Vitamin D: a new player in the world of mTOR signaling. *Cell Cycle* 10: 1888–1889.
https://doi.org/10.4161/cc.10.12.15620
28. Al-Hendy A, Diamond MP, Boyer TG, Halder SK (2016) Vitamin D3 Inhibits Wnt/ β -Catenin and mTOR Signaling Pathways in Human Uterine Fibroid Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 101: 1542–1551.
https://doi.org/10.1210/jc.2015-3555
29. Kim JY, Zhao H, Martinez J, Doggett TA, Kolesnikov AV, Tang PH, Ablonczy Z, Chan CC, Zhou Z, Green DR, Ferguson TA (2013) Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* 154: 365–376.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.012
30. Muniz-Feliciano L, Doggett TA, Zhou Z, Ferguson TA (2017) RUBCN/rubicon and EGFR regulate lysosomal degradative processes in the retinal pigment epithelium (RPE) of the eye. *Autophagy* 13: 2072–2085.
https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1380124
31. Yefimova MG, Ravel C, Rolland AD, Bourmeyster N, Jégou B (2021) MERTK-Mediated LC3-Associated Phagocytosis (LAP) of Apoptotic Substrates in Blood-Separated Tissues: Retina, Testis, Ovarian Follicles. *Cells* 10: 1443.
https://doi.org/10.3390/cells10061443
32. Xu H, Ren D (2015) Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* 77: 57–80.
https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071649
33. Chai B, Gao F, Wu R, Dong T, Gu C, Lin Q, Zhang Y (2019) Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *BMC Neurol* 19: 284.
https://doi.org/10.1186/s12883-019-1500-6
34. Janjusevic M, Gagno G, Fluca AL, Padoan L, Beltrami AP, Sinagra G, Moretti R, Aleksova A (2022) The peculiar role of vitamin D in the pathophysiology of cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Life Sci* 289: 120193.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120193

VITAMIN D3 INHIBITS PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF RAT BRAIN ASTROCYTES IN PRIMARY CULTURE

T. V. Sokolova^{a, #}, M. P. Rychkova^a, N. E. Basova^a, and M. G. Yefimova^{a, ##}

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

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

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

Vitamin D deficiency is considered as a risk factor for neurodegenerative diseases associated with the accumulation of apoptotic substrates. Astroglial cells endowed with phagocytic activity are primary sensors of apoptotic substrates in the mammalian brain. In this work, we explored the effect of vitamin D3 in the form of commercial drugs (trade marks Витамин D3 2000МЕ and ДЕТРИМЕД D3) on phagocytic activity of primary rat brain astrocytes. We showed for the first time that vitamin D3 is a powerful natural inhibitor of the phagocytic activity of astrocytes. Pre-incubation of astrocytes with 10 μ m vitamin D3 led to a decrease in the phagocytic activity of astrocytes (by 1.9 and 3.5 times vs. control for ДЕТРИМЕД D3 and Витамин D3 2000МЕ, respectively). This effect was accompanied by a significant depletion of the endo-lysosomal compartment (by 31% compared vs. control). The data obtained may find use in clinical practice to develop vitamin D3-corrected treatment strategies of patients with neurodegenerative disorders associated with the accumulation of apoptotic substrates.

Keywords: astrocytes, phagocytosis, vitamin D3

ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЙ ЭФФЕКТ КОМБИНИРОВАННОГО ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНА И С-ПЕПТИДА НА ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС И ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ СИГНАЛИНГ В МОДЕЛИ КРАТКОСРОЧНОГО ТЯЖЕЛОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У САМЦОВ КРЫС

© 2022 г. К. В. Деркач¹, А. А. Бахтюков¹, Н. Е. Басова¹,
И. И. Зорина¹, А. О. Шпаков^{1,*}

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

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

После доработки 16.03.2022 г.

Принята к публикации 22.03.2022 г.

Уже на ранних стадиях тяжелого сахарного диабета 1-го типа (СД1), для которого характерны сильно выраженный инсулиновый дефицит, острая гипергликемия и гиперфагия, возникают нарушения инкретинового и адипокинового статуса и эндокринные дисфункции, меняется гипоталамическая регуляция. Это во многом обусловлено дефицитом инсулина в мозге, вследствие чего применение интраназально вводимого инсулина (ИВИ), компенсирующего его недостаток, способно предотвратить ряд негативных последствий СД1. Поскольку при СД1 также отмечается дефицит С-пептида проинсулина, способного усиливать эффекты инсулина, то представляется перспективным использовать совместное введение ИВИ с интраназально вводимым С-пептидом (ИСП). Целью работы было изучить влияние 7-дневного лечения крыс с непродолжительным СД1, вызванным высокой дозой стрептозотоцина (65 мг/кг), с помощью ИВИ (20 мкг/крысу/день), в том числе совместно с ИСП (36 мкг/крысу/день), на уровни гормонов и инкретинов в крови и на экспрессию гипоталамических генов, кодирующих факторы пищевого поведения, рецепторы инсулина, лептина, серотонина и дофамина, а также регуляторы митохондриальной динамики и апоптоза. Лечение ИВИ и его комбинацией с ИСП нормализовали повышенные при СД1 уровни глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и грелина и увеличивали сниженные при СД1 уровни лютеинизирующего и тиреотропного гормонов, тиреоидных гормонов, не влияя на уровень тестостерона. Одним из механизмов этого было повышение в гипоталамусе экспрессии анорексигенных генов, кодирующих меланокортиновый рецептор 4-го типа и про-опиомеланокортин, снижение генной экспрессии орексигенного нейропептида Y и нормализация экспрессии генов, ответственных за митохондриальную динамику (*Mfn-1*, *Mfn-2*, *Drp-1*), апоптоз (*Bcl-2*) и аутофагию (*Beclin-1*). Монотерапия с ИВИ была менее эффективной, в то время как монотерапия ИСП практически не влияла на оцениваемые показатели. Таким образом, лечение комбинацией ИВИ с ИСП и, в меньшей степени, одним ИВИ нормализует уровни ГПП-1 и грелина, восстанавливает уровень лютеинизирующего гормона и гормональные показатели тиреоидной системы у самцов крыс с краткосрочным тяжелым СД1, что обусловлено, в том числе, нормализацией гипоталамической сигнализации.

Ключевые слова: интраназально вводимый инсулин, С-пептид проинсулина, стрептозотоциновый диабет 1-го типа, лептин, инкретины, нейропротекция, тиреоидный гормон, апоптоз

DOI: 10.31857/S0044452922030020

Начальные стадии сахарного диабета 1-го типа (СД1) характеризуются постепенным нарастанием симптоматики инсулиновой недостаточности без явных изменений глюкозного гомеостаза. Однако после снижения уровня инсулина ниже определенного критического уровня стремительно развивается сильно выраженная гипергликемия, что может привести к кетоацидотической коме и необратимым изменениям в органах и тканях, в том числе в ЦНС. Для изучения острого СД1 обычно исполь-

зуют модель стрептозотоцин-индуцированного диабета, для чего грызунам однократно вводят высокие дозы стрептозотоцина (СТЗ, 60–70 мг/кг для 2–3-месячных крыс), что приводит к резкому ослаблению у них инсулин-продуцирующей функции β-клеток поджелудочной железы. При такой модели СД1, наряду с системным инсулиновым дефицитом, развивается острая недостаточность инсулина в мозге, поскольку его единственным источником является инсулин, поступающий из кро-

ви через гематоэнцефалический барьер. Следует отметить, что инсулиновая сигнальная система широко представлена в гипоталамусе и других структурах мозга. Она контролирует не только функционирование интегративных нейрональных сетей, но также метаболизм, инсулиновую чувствительность и различные системы организма, включая эндокринную [1–3].

Устранить недостаток инсулина в мозге можно путем его подкожных инъекций (классическая инсулиновая терапия) или доставкой гормона непосредственно в мозг – с помощью интраназального введения, которое в условиях клиники неприменимо [4], или с помощью интраназального введения, когда инсулин по аксональным путям беспрепятственно поступает в обонятельную луковицу и затем в гипоталамус и другие отделы мозга [4–6]. Лечение СД1 интраназально вводимым инсулином (ИВИ) имеет практическое значение, поскольку позволяет предотвратить диабетическую энцефалопатию и когнитивный дефицит, а также улучшить энергетический обмен и эндокринные функции, которые зависят в том числе и от активности инсулиновой системы мозга [7, 8]. Следует отметить, что в клинике в настоящее время ИВИ применяется для лечения болезни Альцгеймера и других когнитивных расстройств, в том числе ассоциированных с СД1 и постоперационными состояниями [9–12]. Экспериментальные и доклинические исследования показывают его эффективность для предотвращения нейродегенерации, в том числе при ишемических поражениях головного мозга [13], а также демонстрируют индуцированное длительным введением инсулина улучшение эндокринных функций, нарушенных при диабете [7].

Биосинтез инсулина в β -клетках включает стадию сайт-специфичного расщепления молекулы проинсулина, в ходе которого, наряду с инсулином, генерируется С-пептид. Он необходим для правильной сшивки А- и В-цепей инсулина с помощью межмолекулярных дисульфидных связей, а также образует гетероолигомерные комплексы с инсулином, обеспечивая сохранение его активности, по крайней мере, до секреции в кровотоки [14–16]. Имеются свидетельства, что С-пептид играет самостоятельную роль в регуляции физиологических процессов, действуя через собственную сигнальную систему, хотя природа рецептора для него не выяснена [17]. Предполагают также, что С-пептид образует комплексы с инсулином и после секреции в кровотоки, обеспечивая его защиту от протеолитических ферментов, в том числе инсулиндеградирующего фермента. Кроме того, С-пептид облегчает диссоциацию инсулина из его комплексов, повышая эффективность его взаимодействия с инсулиновым рецептором. Все это делает актуальным применение комплексов инсулина с С-пепти-

дом при устранении системного инсулинового дефицита при СД1, в том числе в ЦНС [18–20].

Применение различных молярных соотношений С-пептида и инсулина при их интраназальном введении диабетическим крысам показало, что оптимальным является соотношение 3: 1 или близкие к нему [21–23]. Однако исследования проводили на моделях длительного мягкого или среднетяжелого СД1, когда функции С-пептида и инсулина состояли в отсроченной компенсации уже установившегося инсулинового дефицита в ЦНС, в то время как возможность компенсации острого дефицита инсулина на начальных стадиях тяжелого СД1 не была исследована. Такая компенсация имеет большое значение для устранения или ослабления ранней, порой очень тяжелой симптоматики стремительно развивающегося СД1, и позволяет выяснить эффективность превентивного восстановления инсулинового сигналинга в мозге в условиях нарастающего дефицита инсулина в ЦНС.

Целью работы было изучить влияние семидневного введения ИВИ и интраназально вводимого С-пептида (ИСП) и их комбинации на массу тела, уровни инсулина, лептина и инкретин в крови, гормональные показатели, характеризующие статус репродуктивной и тиреоидной систем, а также на экспрессию гипоталамических генов, кодирующих компоненты пептидгормональных и моноаминергических систем, орексигенные и анорексигенные факторы, регуляторы митохондриальной динамики и апоптоза у самцов крыс с непродолжительной моделью тяжелого СД1. СД1 вызывали высокой дозой СТЗ (65 мг/кг), и лечение начинали через 7 дней после инъекции СТЗ. Совместное введение ИВИ и ИСП сравнивали с монотерапией этими препаратами, используя ИВИ и ИСП в тех же дозах. Выбор для исследования инсулина, лептина и инкретин обусловлен не только их важной ролью в регуляции энергетического обмена, но и участием в контроле функций эндокринной системы [24–28]. В свою очередь, исследование функционального состояния гипоталамических сигнальных систем и факторов, определяющих выживаемость и активность гипоталамических нейронов, вызвано определяющей ролью гипоталамуса в контроле гипоталамо-гипофизарной-гонадной и -тиреоидной систем.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали самцов крыс линии Вистар в возрасте 2–2.5 месяца, которых содержали в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе (сухая кормовая смесь) и со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры по уходу и использованию животных осуществляли в полном соответствии с требованиями Этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол

№ 3/02-2020), European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Индукция сахарного диабета 1-го типа. СД1 вызывали в/б введением крысам СТЗ (“Sigma”, США), растворенного в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5), в дозе 65 мг на кг массы тела животного. Спустя 7 дней после инъекции СТЗ отбирали крыс с постпрандиальным уровнем глюкозы выше 20 ммоль/л. Уровень глюкозы оценивали в цельной крови с помощью тест-полосок “One Touch Ultra” (США) и глюкометра. Случайным образом формировали 4 группы диабетических крыс (в каждой по 6 животных): диабет без лечения (Д), диабет с лечением ИВИ в суточной дозе 20 мкг/крысу (ДИ), ИСП в суточной дозе 36 мкг/крысу (ДС) и совместно ИВИ и ИСП в тех же дозах (ДИС). Продолжительность лечения составила 7 дней, препараты растворяли в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5) и вводили ежедневно в 10.00. Контрольные крысы (К) в те же сроки и в том же объеме получали растворитель. На протяжении эксперимента определяли количество потребляемого стандартного корма (пересчитывали в ккал/крыса/день). На шестой день эксперимента у животных забирали образцы крови, взятой под местным наркозом (2%-ный раствор лидокаина, 2–4 мг/кг) из хвостовой вены, для оценки уровня тиреоидных гормонов, тестостерона и тиреотропного гормона (ТТГ). На седьмой день эксперимента за 1 ч до выведения животных из опыта (12.00) забирали кровь для оценки уровней инсулина, лептина, глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), грелина и лютеинизирующего гормона (ЛГ). У каждого животного отбирали около 700–800 мкл крови, что позволяло получить 240–280 мкл сыворотки, необходимой для измерения концентрации гормонов. Перед забоем также определяли содержание гликированного гемоглобина (HbA1c), являющегося интегральным показателем выраженности гипергликемии, для чего использовали набор Multi Test HbA1c System (“Polymer Technology Systems”, США). В конце эксперимента крыс наркотизировали (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б), декапитировали и забирали образцы гипоталамуса для изучения экспрессии генов.

Измерение уровня инсулина, лептина, инкретинов и гликопротеиновых гипофизарных гормонов. Уровни инсулина, лептина, ГПП-1, грелина, ЛГ и ТТГ в крови оценивали с помощью иммуноферментных наборов “Rat Insulin ELISA” (“Mercodia”, Швеция), “ELISA for Leptin, Rat”, “ELISA for GLP-1, Rat”, “ELISA for Ghrelin, Rat” и “ELISA for LH, Rat” (“Cloud-Clone Corp.”, США), “ELISA, Rat TSH” (“Cusabio Biotech. Co., Ltd.”, Китай). Уровни свободного (fT4) и общего тироксина (tT4), свободного (fT3) и общего трийодтиронина (tT3) оценивали с помощью наборов фирмы “Иммунотех”

(Россия), уровень тестостерона – с помощью набора “Тестостерон ИФА” (“Алкор-Био”, Россия).

Измерение экспрессии гипоталамических генов. Экспрессию генов в образцах гипоталамуса оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией, для чего из ткани гипоталамуса выделяли тотальную РНК с помощью TRIzol Reagent (США), как описано ранее [29]. Для получения кДНК использовали коммерческий набор “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия). Амплификацию осуществляли в смеси, содержащей 10 нг обратно транскрибированного продукта, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, среду “qPCRmix-HS SYBR+LowROX” (“Евроген”, Россия). Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора “7500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для оценки экспрессии генов, кодирующих митофузины-1 (*Mfn-1*) и -2 (*Mfn-2*), митохондриальный белок DRP-1 (*Drp-1*), регулятор аутофагии BECLIN-1 (*Beclin-1*), проапоптотический белок BAX (*Bax*), антиапоптотический белок BCL-2 (*Bcl-2*), меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типов (*Mc3r*, *Mc4r*), про-опио-меланокортин (ПОМК) (*Pomc*), агути-подобный пептид (*Agrp*), нейропептид Y (*Npy*), дофаминовые рецепторы 1-го (*D1r*) и 2-го типов (*D2r*), серотониновые рецепторы 1В- (*Htr1b*) и 2С-подтипов (*Htr2c*), инсулиновый (*Insr*) и лептиновый рецепторы (*Lepr*), протеинфосфотирозинфосфатазу 1В (*Ptp1b*), использовали праймеры, приведенные в табл. 1. Ген *18S rRNA* использовали как референсный. Данные рассчитывали с помощью метода delta-delta C_t, как описано ранее [29].

Статистический анализ экспериментальных данных. Для статистической обработки полученных данных использовали программу “Microsoft Office Excel 2007”, результаты представляли как $M \pm SEM$. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела и жировой ткани, глюкозный гомеостаз и уровни гормонов и инкретинов в крови диабетических крыс и влияние лечения ИВИ и ИСП

Масса тела и жировой ткани (эпидидимального и абдоминального жира) у диабетических крыс была значимо снижена в сравнении с контрольной группой (табл. 2). Потребление пищи, оцениваемое в килокалориях, в группе Д было повышено, что свидетельствует о развитии гиперфагии. У диабетических крыс были в значительной степени повышены уровни постпрандиальной глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c), что указывает на тяжелую форму гипергликемии. Уровни инсу-

Таблица 1. Прямые и обратные праймеры, использованные для изучения экспрессии генов гипоталамических белков у контрольных и диабетических крыс

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Mfn-1</i>	CTGGTGGAGATACAGGGCTAC	ACAGCATTGCGTTGATGACA
<i>Mfn-2</i>	ATGTCAAAGGGTACCTGTCCA	CAATCCCAGATGGCAGAACTT
<i>Drp-1</i>	GCTCAGTGCTGGAAAGCCTA	ACTCCATTTTCTTCTCCTGTTGT
<i>Beclin-1</i>	TTCAAGATCCTGGACCGAGTGAC	AGACACCATCCTGGCGAGTTTC
<i>Bax</i>	TAGCAAAGTGGTGTCAAGG	TCTTGGATCCAGACAAGCAG
<i>Bcl-2</i>	TAGCAAAGTGGTGTCAAGG	TCTTGGATCCAGACAAGCAG
<i>Mc3r</i>	CAGCACATGGATAATATCTTCGACTCT	GGCAATGGCCAGGAGGTT
<i>Mc4r</i>	TGGGTGTCATAAGCCTGTTGG	GCGTCCGTGTCCGTAAGT
<i>Pomc</i>	AGGACCTCACCACGGAAAG	GTCAAGGGCTGTTTCATCTCC
<i>AgRP</i>	TGAAGAAGACAGCAGCAGACC	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC
<i>Npy</i>	ACCAGGCAGAGATATGGCAAGA	GGACATTTTCTGTGCTTTCTCTCATTA
<i>D1r</i>	ACATCTGGGTAGCCTTTGACATC	TACCTGTCCACGCTGATCACG
<i>D2r</i>	GCAGCAGTCGAGCTTTCAGA	CGCCTGTTCAGTGGGAAACT
<i>Htr1b</i>	TCCGGGTCTCCTGTGTACGT	GGCGTCTGAGACTCGCACTT
<i>Htr2c</i>	CGAGTCCGTTTCTCGTCTAGCT	TTGGCCTATGCTTGCAGGTA
<i>Insr</i>	CTGGAGAAGTGTCTGGTTCATT	GGCCATAGACACGGAAAAGAAG
<i>Lepr</i>	GCATGCAGAATCAGTGATATTTGG	CAAGCTGTATCGACACTGATTTCTTC
<i>Ptp1b</i>	CAACCGAGGAGGAACAAAAGG	CAGTCTGTCTGAGTAAAACATACCCG
<i>18S rRNA</i>	GGACACGGACAGGATTGACA	ACCCACGGAAATCGAGAAAGA

лина и лептина в группе Д в значительной степени снижались, в случае инсулина в 5 раз, что свидетельствует о развитии острого инсулинового дефицита, характерного для тяжелой формы стрептозотоцинового СД1. Лечение диабетических крыс ИВИ и ИСП не влияло на массу тела и жировой ткани, показатели глюкозного гомеостаза и уровень инсулина. При этом лечение ИВИ или совместно ИВИ и ИСП значительно снижало потребление пищи и в небольшой степени повышало уровень лептина, хотя различия с группой Д в этом случае не были значимыми.

У диабетических крыс отмечали значимое повышение уровней ГПП-1 и грелина в крови. Лечение с помощью комбинации ИВИ и ИСП приводило к снижению уровней инкретинов. У диабетических крыс снижались уровни ЛГ и ТТГ, что указывает на нарушение функций гонадной и тиреоидной осей на гипоталамическом и (или) гипофизарном уровнях. Лечение ИВИ и комбинацией ИВИ и ИСП нормализовало уровни гормонов, причем в группе ДИС отмечали повышение уровня ТТГ выше такового в контроле. Монотерапия ИСП лишь в небольшой степени влияла на уровни ЛГ и ТТГ, хотя и смягчала дефицит этих гормонов.

Уровни тиреоидных гормонов и тестостерона в крови диабетических крыс и влияние лечения ИВИ и ИСП

Изучение уровней тиреоидных гормонов и андрогенного статуса показало, что при остром СД1 уровни тиреоидных гормонов и тестостерона достоверно снижались (рис. 1). ИВИ нормализовал уровень свободного тироксина (fT4), в то время как комбинация ИВИ и ИСП нормализовала уровни всех тиреоидных гормонов, причем в случае fT4, fT4 и fT3 различия с группой Д были статистически значимыми. Монотерапия ИСП в отношении восстановления тиреоидного статуса не была эффективной. На уровень тестостерона в крови диабетических крыс все варианты лечения ИВИ и ИСП не влияли.

Экспрессия гипоталамических генов у диабетических крыс и влияние лечения ИВИ и ИСП

В гипоталамусе исследовали экспрессию нескольких групп генов. Первая группа кодировала белки, ответственные за биогенез митохондрий — митофузины-1 и -2 (*Mfn-1*, *Mfn-2*), белок BECLIN-1, регулирующий аутофагию (*Beclin-1*), а также проапоптотический белок BAX (*Bax*) и антиапоптотический белок BCL-2 (*Bcl-2*). Вторая группа генов

Таблица 2. Масса тела и жировой ткани, потребление пищи, уровни глюкозы, гликированного гемоглобина, инсулина, лептина, ГПП-1, грелина, ЛГ и ТТГ в крови крыс с краткосрочным СД1 и влияние на эти показатели лечения ИВИ и ИСП

Показатель	К	Д	ДИ	ДС	ДИС
Масса тела, г	315.2 ± 7.8	283.8 ± 5.8 ^a	285.2 ± 9.5 ^a	291.5 ± 7.6	287.8 ± 7.8 ^a
Масса жира, г*	7.8 ± 0.3	5.7 ± 0.4 ^a	5.8 ± 0.4 ^a	6.2 ± 0.3 ^a	5.8 ± 0.3 ^a
Потребление пищи, ккал/крыса/день**	59.2 ± 1.7	78.2 ± 2.1 ^a	67.3 ± 2.1 ^{a,b}	73.3 ± 1.0 ^{a,c}	66.2 ± 3.3 ^b
Глюкоза, мМ	4.9 ± 0.2	23.4 ± 1.6 ^a	21.7 ± 2.0 ^a	24.5 ± 1.4 ^a	22.7 ± 1.3 ^a
HbA1c, %	4.4 ± 0.2	7.0 ± 0.3 ^a	6.5 ± 0.3 ^a	6.8 ± 0.3 ^a	6.5 ± 0.3 ^a
Инсулин, нг/мл	0.81 ± 0.09	0.16 ± 0.04 ^a	0.18 ± 0.05 ^a	0.19 ± 0.04 ^a	0.20 ± 0.05 ^a
Лептин, нг/мл	2.73 ± 0.21	1.24 ± 0.17 ^a	1.69 ± 0.19 ^a	1.47 ± 0.19 ^a	1.71 ± 0.22 ^a
ГПП-1, пг/мл	28.3 ± 1.3	37.4 ± 2.2 ^a	33.2 ± 1.6 ^a	38.9 ± 2.0 ^a	29.1 ± 1.7 ^b
Грелин, нг/мл	1.27 ± 0.12	2.12 ± 0.21 ^a	1.79 ± 0.14 ^a	2.00 ± 0.23 ^a	1.52 ± 0.19
ЛГ, нг/мл	2.21 ± 0.21	1.13 ± 0.14 ^a	1.94 ± 0.24 ^b	1.44 ± 0.16 ^a	2.08 ± 0.25 ^b
ТТГ, мкМЕ/мл	0.76 ± 0.09	0.40 ± 0.06 ^a	0.86 ± 0.10 ^b	0.54 ± 0.07 ^c	1.15 ± 0.09 ^{a,b}

Различия с группами К (^a), Д (^b) и ДИ (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$. * – масса жира включает сумму масс абдоминального и эпидидимального жира. ** – рассчитывали в течение 6 дней лечения (исключая последний день эксперимента, когда осуществляли декапитацию животных).

кодировала гены, ответственные за регуляцию пищевого поведения, в том числе меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типов (*Mc3r*, *Mc4r*), проопиомеланокортин (ПОМК), прекурсор анорексигенных меланокортиновых пептидов (*Pomc*), орексигенные факторы – нейропептид Y и агути-подобный пептид (*Npy*, *Agrp*). Третья группа включала как гены, кодирующие рецепторы биогенных аминов – дофамина (*D1r*, *D2r*) и серотонина (*Htr1b*, *Htr2c*), так и гены, кодирующие рецепторы инсулина (*Insr*) и лептина (*Lepr*) и негативный регулятор инсулинового и лептинового сигналинга – тирозиновую фосфатазу 1В (*Ptp1b*).

При СД1 снижалась экспрессия генов митохондриальной ДНК и белков VCLIN-1 и VCL-2 (рис. 2). Лечение ИВИ и комбинацией ИВИ и ИСП ее нормализовало, в случае VCLIN-1 повышало экспрессию выше ее уровня в контроле. ИСП достоверно повышал только экспрессию гена *Vcl-2*. У животных с СД1 возрастала экспрессия гена белка DRP-1. Лечение ИВИ ее не меняло, в то время как ИСП отдельно или совместно с ИВИ снижали экспрессию гена *Vcl-2* до уровня, не отличающегося от такового у контрольных животных.

В гипоталамусе диабетических крыс, по сравнению с контролем, была снижена экспрессия гена *Mc4r* и повышена экспрессия гена *Npy* (рис. 3). Лечение ИВИ и совместно ИВИ и ИСП нормализовало экспрессию этих генов. У крыс с СД1 экспрессия *Mc3r* и *Pomc* не отличалась от контроля, тогда как введение ИВИ, одного или в сочетании с ИСП, повышало экспрессию этих генов. Комбинированная терапия также вызывала значимое снижение экспрессии гена нейропептида Y не только в срав-

нении с группой Д, но и с контролем. Монотерапия ИСП повышала только экспрессию гена *Pomc*.

У крыс с СД1 экспрессия гена *D1r*, кодирующего дофаминовый рецептор 1-го типа, не менялась, в то время как экспрессия гена *D2r*, кодирующего дофаминовый рецептор 2-го типа, снижалась в 2 раза (рис. 4). Оба препарата, отдельно или совместно, восстанавливали экспрессию гена *D2r*, но не влияли на экспрессию гена *D1r*, в результате чего сниженное при СД1 отношение *D2r/D1r* нормализовалось у животных, получавших препараты. Экспрессия генов *Htr1b* и *Htr2c* при СД1 не менялась. Лечение ИВИ и совместно ИВИ и ИСП не влияло на экспрессию *Htr2c*, но повышало экспрессию гена *Htr1b* по сравнению с контролем. При СД1, в условиях системного дефицита инсулина, экспрессия инсулинового рецептора в гипоталамусе повышалась и значимо снижалась в группах с обработкой ИВИ, в среднем в 2 раза ниже ее уровня в контроле. Монотерапия ИСП не влияла на экспрессию гена инсулинового рецептора. При СД1 экспрессия гена *Ptp1b* не менялась, тогда как ИВИ (один и в комбинации с ИСП) ее повышал. Экспрессия гена лептинового рецептора во всех группах существенно не менялась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для тяжелого краткосрочного СД1, в отличие от длительно текущих, легких или среднетяжелых форм СД1, характерны быстро нарастающие дефицит инсулина, гипергликемия, а также снижение массы тела и жировой ткани, несмотря на сильно выраженную гиперфагию. Нами показано, что, на-

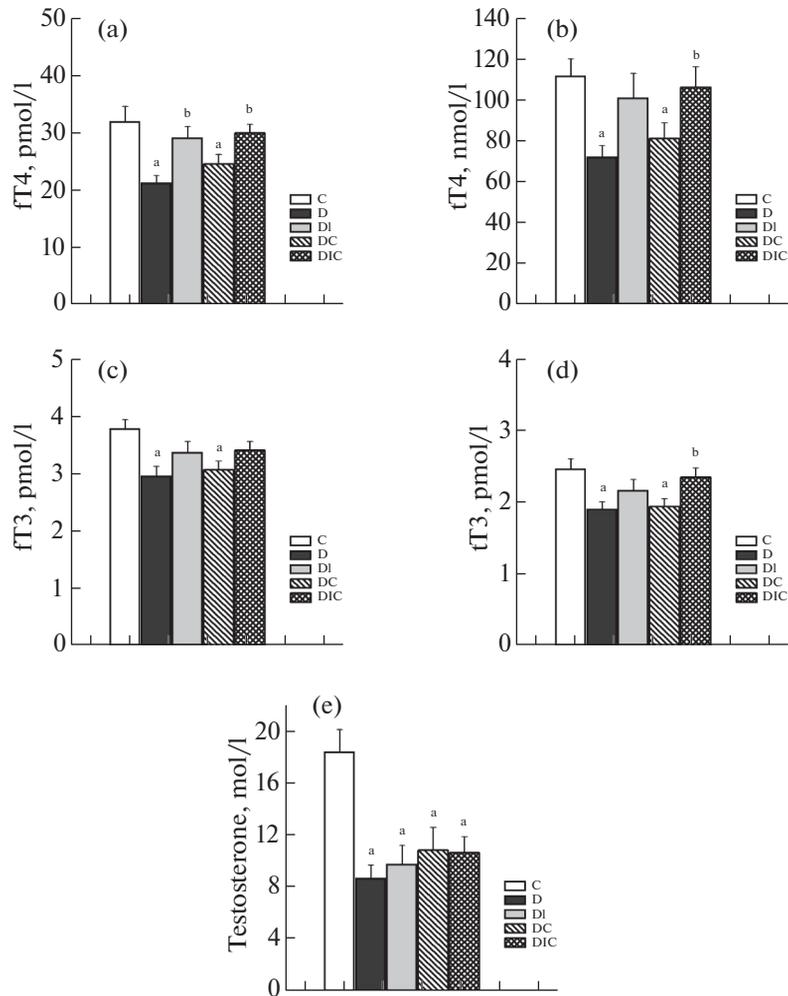


Рис. 1. Уровни тиреоидных гормонов и тестостерона у самцов крыс с краткосрочным СД1 и влияние на них ИВИ и ИСП. (а) – свободный тироксин (fT4), (б) – общий тироксин (tT4), (с) – свободный трийодтиронин (fT3), (д) – общий трийодтиронин (tT3), (е) – тестостерон. Обозначения групп: С (К) – контроль; Д (Д) – диабет без лечения; Д1 (ДИ) – диабет с лечением интраназально вводимым инсулином в суточной дозе 20 мкг/крысу; ДС (ДС) – диабет с лечением интраназально вводимым С-пептидом в суточной дозе 36 мкг/крысу; ДИС (ДИС) – комбинированное лечение интраназально вводимыми инсулином и С-пептидом в тех же дозах. Различия с группами К (а) и Д (б) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

ряду с дефицитом инсулина, в крови крыс с СД1 снижался уровень лептина и повышались уровни ГПП-1 и грелина. Снижение уровня лептина обусловлено истощением запасов жировой ткани, секретирующей лептин [30]. Основной причиной повышения уровня ГПП-1, продуцируемого L-клетками кишечника, является характерная для СД1 гиперфагия, поскольку увеличение объема пищи, поступающей в желудок и контактирующей с L-клетками в кишечнике, стимулирует секрецию ГПП-1 в кровь. Повышение уровня ГПП-1, обладающего мощным инсулинотропным действием на панкреатические β -клетки [31], можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на восстановление инсулин-продуцирующей функции β -клеток, что показано при диабетиче-

ской патологии у человека [32]. Об ослаблении продукции лептина и гиперсекреции ГПП-1 при СД1 сообщали в своих работах и другие авторы [33–36].

Обнаруженное нами повышение уровня грелина у крыс с СТЗ-индуцированным СД1 может быть важным фактором, способствующим регенерации β -клеток в условиях их повреждения СТЗ. Так, имеются данные, что грелин предотвращает апоптоз панкреатических клеток, повышая их выживаемость [37]. Повышение уровня грелина в крови может быть следствием нарушения инсулин-продуцирующей функции β -клеток. Установлено, что повышение уровня инсулина у здоровых людей приводит к значительному снижению уровня постпрандиального грелина, в то время как в условиях

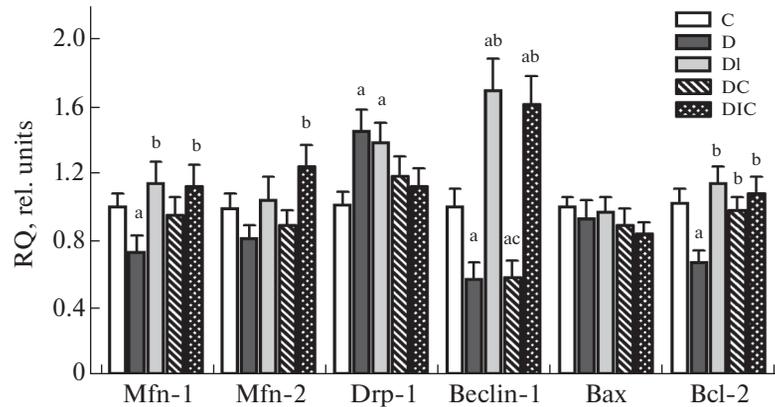


Рис. 2. Экспрессия мРНК для белков, вовлеченных в регуляцию митохондриальной динамики, аутофагии и апоптоза в гипоталамусе крыс с краткосрочным острым СД1 и влияние ИВИ и ИСП. Представлена экспрессия генов митофузинов-1 (*Mfn-1*) и -2 (*Mfn-2*), а также белков DRP-1 (*Drp-1*), BECLIN-1 (*Beclin-1*), BAX (*Bax*) и BCL-2 (*Bcl-2*). Обозначения групп: С (К) – контроль; D (Д) – диабет без лечения; DI (ДИ) – диабет с лечением интраназально вводимым инсулином в суточной дозе 20 мкг/крысу; DC (ДС) – диабет с лечением интраназально вводимым С-пептидом в суточной дозе 36 мкг/крысу; DIC (ДИС) – комбинированное лечение интраназально вводимыми инсулином и С-пептидом в тех же дозах. Различия с группами К (^a), Д (^b) и ДИ (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

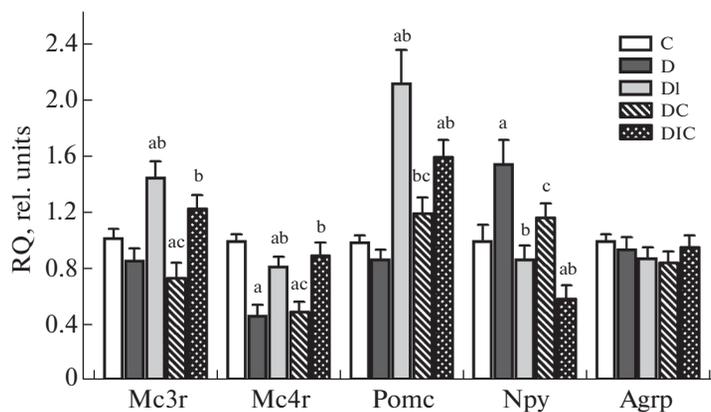


Рис. 3. Влияние СД1 и лечения ИВИ и ИСП на экспрессию мРНК меланокортиновых рецепторов и факторов, определяющих пищевое поведение, в гипоталамусе крыс. Представлена экспрессия генов меланокортиновых рецепторов 3-го (*Mc3r*) и 4-го типов (*Mc4r*), про-опиомеланокортина (*Pomc*), нейропептида Y (*Npy*) и агути-подобного пептида (*Agrp*). Обозначения групп: С (К) – контроль; D (Д) – диабет без лечения; DI (ДИ) – диабет с лечением интраназально вводимым инсулином в суточной дозе 20 мкг/крысу; DC (ДС) – диабет с лечением интраназально вводимым С-пептидом в суточной дозе 36 мкг/крысу; DIC (ДИС) – комбинированное лечение интраназально вводимыми инсулином и С-пептидом в тех же дозах. Различия с группами К (^a), Д (^b) и ДИ (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

инсулинового дефицита при СД1 уровень грелина остается значимо повышенным [38]. Повышение уровня грелина на ранних стадиях СД1 было описано и в ряде экспериментальных исследований [39–41].

У крыс с СД1 комбинация ИВИ и ИСП существенно не влияла на уровни инсулина и лептина в крови, сниженные при СД1, но нормализовала уровни ГПП-1 и грелина. Это было ассоциировано с ослаблением гиперфагии в группе ДИС. Вопрос о том, как вызываемая комбинацией ИВИ и ИСП активация инсулиновой системы в мозге (гипоталамусе) ослабляет орексигенные влияния грелина

на периферии, остается открытым и требует дальнейших исследований. Отсутствие влияния монотерапии ИСП на уровни инкретинных указывает на ключевую роль в этом инсулина мозга. В то же время ИСП-индуцированное усиление влияния ИВИ на гиперфагию и уровни ГПП-1 и грелина в крови свидетельствует в пользу потенцирования С-пептидом инсулинового сигналинга в мозге. Это может быть обусловлено способностью С-пептида повышать эффективность взаимодействия инсулина с его рецепторами, дестабилизируя олигомерные комплексы инсулина [14–16].

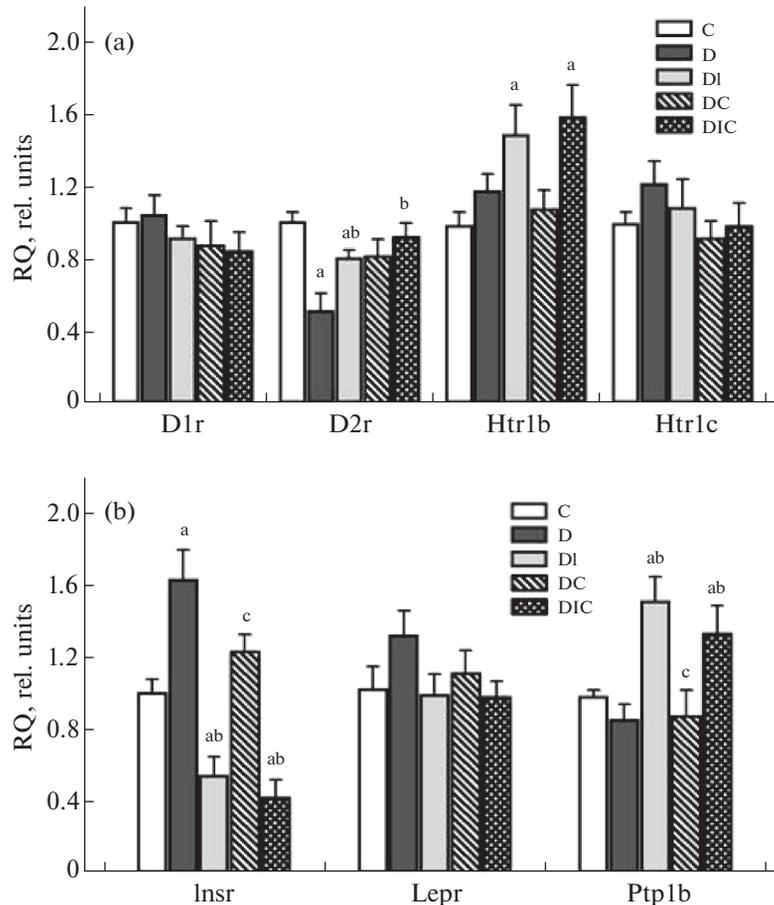


Рис. 4. Влияние СД1 и лечения ИВИ и ИСП на экспрессию мРНК рецепторов дофамина, серотонина, инсулина и лептина, а также протеинфосфотирозинфосфатазы 1В в гипоталамусе крыс. (а) – экспрессия генов дофаминовых рецепторов 1-го (*D1r*) и 2-го типов (*D2r*) и серотониновых рецепторов 1В- (*Htr1b*) и 2С-подтипов (*Htr2c*), (б) – экспрессия генов инсулинового (*Insr*) и лептинового рецепторов (*Lepr*) и протеинфосфотирозинфосфатазы (*Ptp1b*). Обозначения групп: С (К) – контроль; D (Д) – диабет без лечения; DI (ДИ) – диабет с лечением интраназально вводимым инсулином в суточной дозе 20 мкг/крысу; DC (ДС) – диабет с лечением интраназально вводимым С-пептидом в суточной дозе 36 мкг/крысу; DIC (ДИС) – комбинированное лечение интраназально вводимыми инсулином и С-пептидом в тех же дозах. Различия с группами К (^a), Д (^b) и ДИ (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

В крови диабетических крыс были снижены уровни гликопротеиновых гипофизарных гормонов – ЛГ и ТТГ, что указывает на снижение активности гипоталамо-гипофизарной системы. При СД1 также ослаблялся синтез андрогенов и тиреоидных гормонов. Эти данные согласуются с результатами других авторов и ранее полученными нами данными о том, что у самцов крыс с различными по тяжести и более продолжительными моделями СД1 уровни ЛГ [42, 43] и ТТГ [44, 45], тестостерона [19, 46, 47] и тиреоидных гормонов [7, 44, 45, 48] были также снижены.

Нами установлено, что ИВИ нормализовал уровень ТТГ в крови и, тем самым, восстанавливал уровни тиреоидных гормонов у диабетических крыс, причем совместное применение с ИСП приводило к усилению его эффекта. Это согласуется с ранее полученными данными о том, что обработка

здоровых крыс и животных с длительным, умеренно выраженным СД1 с помощью ИВИ также приводит к устойчивому и значимому повышению уровня ТТГ [7]. В настоящем исследовании было также показано, что ИВИ и ИВИ совместно с ИСП повышают уровень ЛГ в крови диабетических крыс. Ранее влияние ИВИ на продукцию ЛГ при СД1 не было исследовано. Имеется лишь одно клиническое исследование, в котором было изучено влияние однократно введенного ИВИ (40 МЕ) на уровень ЛГ в крови у здоровых мужчин и мужчин с СД2 [49]. Dhindsa и соавт. не выявили значимых изменений в уровне ЛГ после обработки ИВИ. Однако необходимо принимать во внимание, что обработка проводилась однократно, а уровень ЛГ у пациентов с СД2 был повышен в сравнении со здоровыми пациентами, а не снижен, как в случае СД1 [49].

Повышение продукции ТТГ и ЛГ при их дефиците в условиях СД1, как мы полагаем, обусловлено стимулирующим эффектом ИВИ на гипоталамические тиролиберин- и гонадолиберин-экспрессирующие нейроны. Имеются данные о том, что инсулин в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса повышает продукцию тиролиберина, рилизинг-фактора ТТГ путем стимуляции меланокортиновых путей и ингибирования нейронов, экспрессирующих нейропептид Y и агути-подобный пептид [50, 51], негативные регуляторы синтеза тиролиберина [52, 53]. Сходные механизмы показаны для стимуляции продукции гонадолиберина, рилизинг-фактора гонадотропинов [54–56]. Нами показано, что ИВИ и его комбинация с ИСП повышали экспрессию генов *Pomc*, *Mc4r* и *Mc3r*, вовлеченных в позитивную регуляцию экспрессии гипоталамических рилизинг-факторов гонадотропинов и ТТГ, и снижали повышенную при СД1 экспрессию гена нейропептида Y, негативного регулятора гонадолиберина и тиролиберина. Так, в группе Д соотношение *Npy/Pomc* составило 1.78, в то время как в группах ДИ и ДИС – 0.41 и 0.37 соответственно. Это указывает на то, что ИВИ смещает соотношение экспрессии нейропептида Y и ПОМК в пользу последнего, стимулирующего продукцию гипоталамических рилизинг-факторов.

Нами обнаружено, что оба варианта терапии с ИВИ приводят к снижению экспрессии гена инсулинового рецептора, повышенной в условиях характерного для СД1 системного инсулинового дефицита, что обусловлено длительной активацией инсулиновой системы мозга при интраназальном введении гормона. Необходимо отметить, что повышение экспрессии инсулиновых рецепторов в гипоталамусе диабетических крыс согласуется как с нашими результатами о двукратном повышении специфического связывания инсулина с синапсомальными мембранами, выделенными из мозга крыс со стрептозотоциновым СД1 [57], так и с данными других авторов о повышении инсулин-стимулированного фосфорилирования инсулиновых рецепторов в гиппокампе крыс с СД1 [58]. Наряду с этим, в обеих группах с введением ИВИ выявлено значимое повышение экспрессии гена фосфатазы 1B, негативного регулятора инсулинового сигналинга. Активность этого фермента зависит от степени активации инсулиновой сигнальной системы и повышается в условиях длительной ее стимуляции инсулином [59, 60]. Эти данные свидетельствуют о том, что при введении СД1 крысам ИВИ, в том числе в сочетании с ИСП, инсулин непосредственно поступает к гипоталамическим нейронам и стимулирует в них инсулиновую сигнальную систему.

Необходимо отметить, что монотерапия ИСП слабо влияла на уровни ЛГ, ТТГ, тиреоидных гормонов и тестостерона. Это указывает на то, что сигнальные пути С-пептида непосредственно не во-

влечены в контроль продукции тиролиберина и гонадолиберина. При этом некоторое усиление восстанавливающего эффекта ИВИ при его комбинированном применении с ИСП на тиреоидный статус (значимое повышение уровней тТ3 и тТ4 в группе ДИС в сравнении с контролем), как и в случае инкретинов, может быть обусловлено повышением доступности инсулина для его рецепторов вследствие облегчения диссоциации инсулиновых комплексов в присутствии С-пептида [14–16].

Одним из механизмов восстановления экспрессии компонентов гипоталамических сигнальных систем, включая нормализацию соотношения дофаминовых рецепторов 1-го и 2-го типов, может быть нейропротекторный эффект ИВИ, который ранее был продемонстрирован нами и другими авторами [13, 61, 62], в том числе при диабетической патологии [63]. Этот эффект был выявлен и в настоящем исследовании в отношении тяжелого краткосрочного СД1, на что указывает восстановление экспрессии генов митохондриальных белков, а также нормализация соотношения проапоптотического белка BAX к антиапоптотическому белку BCL-2. Так, соотношение экспрессии генов *Bax* и *Bcl-2* в гипоталамусе диабетических крыс составило 1.38, а в группах ДИ и ДИС оно снизилось до 0.85 и 0.78 соответственно, что может указывать на ослабление апоптотических процессов в гипоталамических нейронах. ИВИ восстанавливал сниженную при СД1 экспрессию белка BECLIN-1, ответственного за индукцию аутофагии. В этой связи необходимо отметить, что аутофагия в мозге является одним из механизмов, защищающих нейроны от апоптоза [64]. Наряду с этим в группе ДИС отмечали восстановление экспрессии генов, кодирующих митофузины (*Mfn-1*, *Mfn-2*), и снижение экспрессии гена *Drp-1*, повышенной при СД1, что свидетельствует о нормализации биогенеза митохондрий, и в целом согласуется с нашими данными, полученными при изучении влияния комбинированной терапии ИВИ и ИСП на крыс с длительным среднетяжелым СД1 [63]. Обработка крыс одним С-пептидом частично восстанавливала соотношение *Bax* и *Bcl-2*, но почти не влияла на экспрессию генов митохондриальных белков и BECLIN-1.

Таким образом, впервые показан восстанавливающий эффект недельной терапии ИВИ и его комбинацией с ИСП на гормональный статус и экспрессию генов, кодирующих компоненты гипоталамических сигнальных систем у самцов крыс с краткосрочным тяжелым СД1. Показано частичное восстановление уровней лептина, ГПП-1, грелина, гипофизарных гликопротеиновых гормонов (ЛГ, ТТГ), а также тиреоидных гормонов при лечении диабетических крыс ИВИ и комбинацией ИВИ и ИСП, что указывает на ИВИ-индуцированное улучшение функций гипоталамо-гипофизарной и инкретиновой систем и нормализацию тиреоид-

ного статуса, нарушенных при краткосрочном СД1. Одним из механизмов восстанавливающего действия ИВИ и его комбинации с ИСП является нормализация экспрессии гипоталамических факторов, ответственных за аппетит, и восстановление экспрессии генов, ответственных за снижение апоптоза, стимуляцию аутофагии и повышение выживаемости нейронов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана государственным заданием Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН АААА-А18-118012290427-7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (А.О.Ш., К.В.Д.), проведение эксперимента (К.В.Д., А.А.Б., И.И.З.), обработка данных, подготовка графических материалов, (К.В.Д., А.А.Б., Н.Е.Б., И.И.З.), написание и редактирование манускрипта (А.О.Ш., К.В.Д.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA 1*: FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
2. *Milstein JL, Ferris HA* (2021) The brain as an insulin-sensitive metabolic organ. *Mol Metab 52*: 101234. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101234>
3. *Scherer T, Sakamoto K, Buettner C* (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat Rev Endocrinol 17*: 468–483. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
4. *Rhea EM, Salameh TS, Banks WA* (2019) Routes for the delivery of insulin to the central nervous system: A comparative review. *Exp Neurol 313*: 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.11.007>
5. *Dholakia J, Prabhakar B, Shende P* (2021) Strategies for the delivery of antidiabetic drugs via intranasal route. *Int J Pharm 608*: 121068. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121068>
6. *Hallschmid M* (2021) Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol 33*: e12934. <https://doi.org/10.1111/jne.12934>
7. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res 47*: 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
8. *Derkach KV, Ivantsov AO, Chistyakova OV, Sukhov IB, Buzanakov DM, Kulikova AA, Shpakov AO* (2017) Intranasal Insulin Restores Metabolic Parameters and Insulin Sensitivity in Rats with Metabolic Syndrome. *Bull Exp Biol Med 163*: 184–189. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3762-6>
9. *Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, Donohue MC, Brewer JB, Jenkins C, Harless K, Gessert D, Aisen PS* (2020) Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol 77*: 1099–1109. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1840>
10. *Badenes R, Qeva E, Giordano G, Romero-García N, Bilotta F* (2021) Intranasal Insulin Administration to Prevent Delayed Neurocognitive Recovery and Postoperative Neurocognitive Disorder: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health 18*: 2681. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052681>
11. *Gaddam M, Singh A, Jain N, Avanthika C, Jhaveri S, De la Hoz I, Sanka S, Goli SR* (2021) A Comprehensive Review of Intranasal Insulin and Its Effect on the Cognitive Function of Diabetics. *Cureus 13*: e17219. <https://doi.org/10.7759/cureus.17219>
12. *Hallschmid M* (2021) Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease. *CNS Drugs 35*: 21–37. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00781-x>
13. *Zakharova IO, Bayunova LV, Zorina II, Sokolova TV, Shpakov AO, Avrova NF* (2021) Insulin and α -Tocopherol Enhance the Protective Effect of Each Other on Brain Cortical Neurons under Oxidative Stress Conditions and in Rat Two-Vessel Forebrain Ischemia/Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci 22*: 11768. <https://doi.org/10.3390/ijms222111768>
14. *Jörnvall H, Lindahl E, Astorga-Wells J, Lind J, Holmlund A, Melles E, Alvelius G, Nerelius C, Måler L, Johansson J* (2010) Oligomerization and insulin interactions of proinsulin C-peptide: Threefold relationships to properties of insulin. *Biochem Biophys Res Commun 391*: 1561–1566. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.125>
15. *Nerelius C, Alvelius G, Jörnvall H* (2010) N-terminal segment of proinsulin C-peptide active in insulin interaction/desaggregation. *Biochem Biophys Res Commun 403*: 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.058>
16. *Landreh M, Johansson J, Wahren J, Jörnvall H* (2014) The structure, molecular interactions and bioactivities of proinsulin C-peptide correlate with a tripartite molecule. *Biomol Concepts 5*: 109–118. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0005>
17. *Landreh M, Jörnvall H* (2021) Biological activity versus physiological function of proinsulin C-peptide. *Cell Mol Life Sci 78*: 1131–1138. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03636-2>
18. *Derkach KV, Shpakova EA, Bondareva VM, Shpakov AO* (2018) The effect of intranasal administration of proinsulin C-peptide and its C-terminal fragment on metabolic parameters in rats with streptozotocin diabetes. *J Evol Biochem Physiol 54*: 242–245. <https://doi.org/10.1134/S0022093018030092>
19. *Derkach KV, Bondareva VM, Shpakov AO* (2019) Regulatory effects of intranasal C-peptide and insulin on thyroid and androgenic status of male rats with moderate type 1

- diabetes mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 55: 493–496. <https://doi.org/10.1134/S0022093019060073>
20. Washburn RL, Mueller K, Kaur G, Moreno T, Moustaid-Moussa N, Ramalingam L, Dufour JM (2021) C-Peptide as a Therapy for Type 1 Diabetes Mellitus. *Biomedicines* 9: 270. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030270>
 21. Derkach KV, Bondareva VM, Shpakov AO (2018) Co-administration of intranasally delivered insulin and proinsulin C-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. *Advances in Gerontology* 8: 139–146. <https://doi.org/10.1134/S2079057018020030>
 22. Derkach KV, Bondareva VM, Perminova AA, Shpakov AO (2019) C-peptide and insulin during combined intranasal administration improve the metabolic parameters and activity of the adenylate cyclase system in the hypothalamus, myocardium, and epididymal fat of rats with type 2 diabetes. *Cell Tissue Biol* 13: 228–236. <https://doi.org/10.1134/S1990519X19030039>
 23. Derkach KV, Perminova AA, Buzanakov DM, Shpakov AO (2019) Intranasal Administration of Proinsulin C-Peptide Enhances the Stimulating Effect of Insulin on Insulin System Activity in the Hypothalamus of Diabetic Rats. *Bull Exp Biol Med* 167: 351–355. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04525-w>
 24. Khan SM, Hamnvik OP, Brinkoetter M, Mantzoros CS (2012) Leptin as a modulator of neuroendocrine function in humans. *Yonsei Med J* 53: 671–679. <https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.4.671>
 25. Jensterle M, Janez A, Fliers E, DeVries JH, Vrtacnik-Bokal E, Siegelaar SE (2019) The role of glucagon-like peptide-1 in reproduction: from physiology to therapeutic perspective. *Hum Reprod Update* 25: 504–517. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz019>
 26. Cena H, Chiovato L, Nappi RE (2020) Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 105: e2695–2709. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa285>
 27. Al-Hussaniy HA, Alburghaif AH, Naji MA (2021) Leptin hormone and its effectiveness in reproduction, metabolism, immunity, diabetes, hopes and ambitions. *J Med Life* 14: 600–605. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0153>
 28. Schalla MA, Stengel A (2021) The Role of the Gastric Hormones Ghrelin and Nesfatin-1 in Reproduction. *Int J Mol Sci* 22: 11059. <https://doi.org/10.3390/ijms222011059>
 29. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14: e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
 30. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS (2010) Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med* 152: 93–100. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-2-201001190-00008>
 31. Aulinger BA, Vahl TP, Wilson-Pérez HE, Prigeon RL, D'Alessio DA (2015) β -Cell Sensitivity to GLP-1 in Healthy Humans Is Variable and Proportional to Insulin Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 100: 2489–2496. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-4009>
 32. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993) Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7–36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91: 301–307. <https://doi.org/10.1172/JCI116186>
 33. Gülen S, Dinçer S (2007) Effects of leptin on oxidative stress in healthy and Streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 302: 59–65. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9426-5>
 34. Romero MJ, Lucas R, Dou H, Sridhar S, Czikora I, Mosieri EM, Rick FG, Block NL, Sridhar S, Fulton D, Weintraub NL, Bagi Z, Schally AV (2016) Role of growth hormone-releasing hormone in dyslipidemia associated with experimental type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 1895–1900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525520113>
 35. Cruz B, Flores RJ, Uribe KP, Espinoza EJ, Spencer CT, Serafine KM, Nazarian A, O'Dell LE (2019) Insulin modulates the strong reinforcing effects of nicotine and changes in insulin biomarkers in a rodent model of diabetes. *Neuropsychopharmacology* 44: 1141–1151. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0306-3>
 36. Kralova E, Marusakova M, Hadova K, Krenek P, Klimas J (2021) Dapagliflozin elevates plasma high-density lipoprotein levels and influences visceral fat gene expression in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Pharm Pharmacol* 73: 778–784. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab005>
 37. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Koyama H, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T (2013) Overexpression of intraslet ghrelin enhances β -cell proliferation after streptozotocin-induced β -cell injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E140–E148. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00112.2013>
 38. Murdolo G, Lucidi P, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Fatone C, Fanelli CG, Bolli GB, Santeusanio F, De Feo P (2003) Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes* 52: 2923–2927. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.12.2923>
 39. Gelling RW, Overduin J, Morrison CD, Morton GJ, Frayo RS, Cummings DE, Schwartz MW (2004) Effect of uncontrolled diabetes on plasma ghrelin concentrations and ghrelin-induced feeding. *Endocrinology* 145: 4575–4582. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0605>
 40. Ariga H, Imai K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T (2008) Does ghrelin explain accelerated gastric emptying in the early stages of diabetes mellitus? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1807–R1812. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00785.2007>
 41. Luvuno M, Mbongwa HP, Khathi A (2016) The effects of *Syzygium aromaticum*-derived triterpenes on gastrointestinal ghrelin expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 13: 8–14. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i4.2>
 42. Bestetti G, Locatelli V, Tirone F, Rossi GL, Müller EE (1985) One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. *Endocrinology* 117: 208–216. <https://doi.org/10.1210/endo-117-1-208>

43. *Stoyanovitch AG, Johnson MA, Clifton DK, Steiner RA, Fraley GS* (2005) Galanin-like peptide rescues reproductive function in the diabetic rat. *Diabetes* 54: 2471–2476. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2471>
44. *van Haasteren GA, Sleddens-Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, de Jong FH, Visser TJ, de Greef WJ* (1997) Possible role of corticosterone in the down-regulation of the hypothalamo-hypophysial-thyroid axis in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *J Endocrinol* 153: 259–267. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1530259>
45. *Ige AO, Chidi RN, Egbeluya EE, Jubreel RO, Adele BO, Adewoye EO* (2019) Amelioration of thyroid dysfunction by magnesium in experimental diabetes may also prevent diabetes-induced renal impairment. *Heliyon* 5: e01660. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01660>
46. *Pontes DA, Fernandes GS, Piffer RC, Gerardin DC, Pereira OC, Kempinas WG* (2011) Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: the role of testosterone. *Pharmacol Rep* 63: 130–138. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70407-8](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70407-8)
47. *Guo Z, Yan X, Wang L, Wu J, Jing X, Liu J* (2016) Effect of Telmisartan or Insulin on the Expression of Adiponectin and its Receptors in the Testis of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 48: 404–412. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101549>
48. *Bestetti GE, Raymond MJ, Perrin IV, Kniel PC, Lemarchand-Béraud T, Rossi GL* (1987) Thyroid and pituitary secretory disorders in streptozotocin-diabetic rats are associated with severe structural changes of these glands. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 53: 69–78. <https://doi.org/10.1007/BF02890227>
49. *Dhindsa S, Chemitiganti R, Ghanim H, Santiago E, Haider A, Chaar N, Mok M, McKee A, Dandona P* (2018) Intranasal Insulin Administration Does Not Affect LH Concentrations in Men with Diabetes. *Int J Endocrinol* 2018: 6170154. <https://doi.org/10.1155/2018/6170154>
50. *McCarty MF* (1995) Central insulin may up-regulate thyroid activity by suppressing neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus. *Med Hypotheses* 45: 193–199. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90068-3)
51. *Kouidhi S, Clerget-Froidevaux MS* (2017) Integrating Thyroid Hormone Signaling in Hypothalamic Control of Metabolism: Crosstalk Between Nuclear Receptors. *Int J Mol Sci* 19: 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms19072017>
52. *Fekete C, Kelly J, Mihály E, Sarkar S, Rand WM, Légrádi G, Emerson CH, Lechan RM* (2001) Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142: 2606–2613. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8207>
53. *Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM* (2002) Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143: 3846–3853. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220338>
54. *Oghbaei H, Fattahi A, Hamidian G, Sadigh-Eteghad S, Ziaee M, Mahmoudi J* (2021) A closer look at the role of insulin for the regulation of male reproductive function. *Gen Comp Endocrinol* 300: 113643. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113643>
55. *Shpakov AO* (2021) Improvement Effect of Metformin on Female and Male Reproduction in Endocrine Pathologies and Its Mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)* 14: 42. <https://doi.org/10.3390/ph14010042>
56. *Bano R, Shamas S, Khan SUH, Shahab M* (2022) Inverse age-related changes between hypothalamic NPY and KISS1 gene expression during pubertal initiation in male rhesus monkey. *Reprod Biol* 22: 100599. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100599>
57. *Chistyakova OV, Sukhov IB, Loshkareva ML, Shipilov VN, Bondareva VM, Shpakov AO* (2012) Initial stages of the insulin signaling system in the brain of rats with experimental diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med* 153: 25–28. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1634-7>
58. *King MR, Anderson NJ, Liu C, Law E, Cundiff M, Mixcoatl-Zecuatl TM, Jolivalt CG* (2015) Activation of the insulin-signaling pathway in sciatic nerve and hippocampus of type 1 diabetic rats. *Neuroscience* 303: 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.060>
59. *Vieira MN, Lyra E, Silva NM, Ferreira ST, De Felice FG* (2017) Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Potential Target for Alzheimer's Therapy? *Front Aging Neurosci* 9: 7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00007>
60. *Dodd GT, Xirouchaki CE, Eramo M, Mitchell CA, Andrews ZB, Henry BA, Cowley MA, Tiganis T* (2019) Intranasal Targeting of Hypothalamic PTP1B and TCPTP Reinstates Leptin and Insulin Sensitivity and Promotes Weight Loss in Obesity. *Cell Rep* 28: 2905–2922.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.019>
61. *Roque PS, Hooshmandi M, Neagu-Lund L, Yin S, Yousefpour N, Sato H, Sato T, Nakadate Y, Kawakami A, Tahmasebi S, Ribeiro-da-Silva A, Gkogkas CG, Prager-Khoutorsky M, Schrickler T, Wykes L, Khoutorsky A* (2021) Intranasal insulin rescues repeated anesthesia-induced deficits in synaptic plasticity and memory and prevents apoptosis in neonatal mice via mTORC1. *Sci Rep* 11: 15490. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94849-3>
62. *Xu LB, Huang HD, Zhao M, Zhu GC, Xu Z* (2021) Intranasal Insulin Treatment Attenuates Metabolic Distress and Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Neurocrit Care* 34: 154–166. <https://doi.org/10.1007/s12028-020-01011-4>
63. *Derkach KV, Zorina II, Zakharova IO, Basova NE, Bakhtyukov AA, Shpakov AO* (2020) The Influence of Intranasally Administered Insulin and C-peptide on AMP-Activated Protein Kinase Activity, Mitochondrial Dynamics and Apoptosis Markers in the Hypothalamus of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Evol Biochem Physiol* 56: 207–217. <https://doi.org/10.1134/S0022093020030035>
64. *Guan ZF, Zhou XL, Zhang XM, Zhang Y, Wang YM, Guo QL, Ji G, Wu GF, Wang NN, Yang H, Yu ZY, Zhou HG, Guo JC, Liu YC* (2016) Beclin-1-mediated autophagy may be involved in the elderly cognitive and affective disorders in streptozotocin-induced diabetic mice. *Transl Neurodegener* 5: 22. <https://doi.org/10.1186/s40035-016-0070-4>

**THE RESTORATIVE EFFECT OF COMBINED INSULIN
AND C-PEPTIDE INTRANASAL ADMINISTRATION
ON HORMONAL STATUS AND HYPOTHALAMIC SIGNALING
IN THE MALE RAT MODEL OF SEVERE SHORT-TERM
STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES**

**K. V. Derkach^a, A. A. Bakhtyukov^a, N. E. Basova^a,
I. I. Zorina^a, and A. O. Shpakov^{a,#}**

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

[#]*e-mail: alex_shpakov@list.ru*

At early stages of severe type 1 diabetes mellitus (DM1), which is characterized by severe insulin deficiency, acute hyperglycemia and hyperphagia, there arise impaired incretin secretion and adipokine status, endocrine dysfunctions, and altered hypothalamic regulation. This is largely due to brain insulin deficiency. The use of intranasally administered insulin (I-I), which compensates for its deficiency, is able to prevent DM1 complications. Since in DM1 there is a deficiency of the proinsulin C-peptide, which can enhance insulin effects, it seems promising to co-use I-I with intranasally administered C-peptide (I-CP). This work aimed to study the effect of 7-day treatment of rats with short-term DM1 induced by high-dose streptozotocin (65 mg/kg) with I-I (20 µg/rat/day), including in combination with I-CP (36 µg/rat/day), on hormone and incretin blood levels and the expression of hypothalamic genes encoding food intake factors, insulin, leptin, serotonin and dopamine receptors, as well as regulators of mitochondrial dynamics and apoptosis. I-I alone and its combination with I-CP normalized glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and ghrelin levels, which were elevated in DM1, and increased those of luteinizing and thyroid-stimulating hormones, as well as thyroid hormones, which were reduced in DM1, without affecting testosterone levels. One of the mechanisms behind these effects was an increase in the expression of anorexigenic genes encoding type 4 melanocortin receptor and pro-opiomelanocortin, a decrease in the gene expression of orexigenic neuropeptide Y, and normalization of the expression of genes responsible for mitochondrial dynamics (*Mfn-1*, *Mfn-2*, *Drp-1*), apoptosis (*Bcl-2*) and autophagy (*Beclin-1*) in the hypothalamus. I-I monotherapy was less effective, while I-CP monotherapy had no effect on the assessed parameters. Thus, combination therapy with I-I and I-CP and, to a lesser extent, I-I monotherapy normalize GLP-1 and ghrelin levels, restore luteinizing hormone levels and hormonal parameters of the thyroid system in male rats with severe short-term DM1, including due to the normalization of hypothalamic signaling.

Keywords: intranasal insulin, proinsulin C-peptide, streptozotocin-induced type 1 diabetes, leptin, incretins, neuroprotection, thyroid hormone, apoptosis

НАРУШЕНИЕ СТИМУЛ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ У МЫШЕЙ, НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ РЕЦЕПТОРА СЛЕДОВЫХ АМИНОВ 1-ГО ТИПА (TAAR1)

© 2022 г. В. М. Князева^{1,*}, Е. С. Дмитриева¹, Н. В. Полякова¹, Ю. А. Симон¹,
Л. Н. Станкевич¹, А. Ю. Александров¹, А. А. Александров¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: v.m.knyazeva@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

Многочисленные исследования подтверждают, что рецепторы следовых аминов 1-го типа (TAAR1) выступают в качестве нейромодулятора моноаминергических систем, обеспечивающего отрицательную регуляцию активности дофаминергических и серотонинергических нейронов. Способность TAAR1 регулировать моноаминергические системы обуславливает его заметную роль в возникновении психических и неврологических расстройств. Настоящее исследование направлено на то, чтобы представить дополнительные доказательства роли TAAR1 в генерации негативности рассогласования (НР) на модели грызунов. Регистрация электроэнцефалограммы в свободном поведении проводилась у мышей, нокаутных по гену, кодирующему TAAR1, и мышей дикого типа. Известно, что НР отражает комбинацию реакции стимул-специфической адаптации к повторяющемуся стимулу (ССА) и механизма обнаружения отклонения. Для того, чтобы разграничить эти два процесса, мы сравнили стандартные и девиантные стимулы, зарегистрированные в парадигме “одд-болл”, с контрольными стимулами, зарегистрированными в парадигме мультистандартного контроля. Различие, наблюдаемое между высокоадаптированными стандартными и низкоадаптированными контрольными стимулами, вместе со сходной реакцией на девиантные и контрольные стимулы позволяет предположить, что НР-подобный ответ у мышей дикого типа, скорее всего, отражает процесс ССА. С другой стороны, мыши, нокаутные по гену, кодирующему TAAR1, не обнаруживают различий между стандартными, девиантными и контрольными стимулами. Можно предположить, что полученный результат указывает на нарушение процесса ССА на повторяющиеся стимулы у мышей линии TAAR-KO.

Ключевые слова: рецепторы следовых аминов, TAAR1, негативность рассогласования (НР), стимул-специфическая адаптация, слуховые вызванные потенциалы (ВП), парадигма “одд-болл”

DOI: 10.31857/S0044452922030044

Рецептор следовых аминов 1-го типа (TAAR1) представляет собой связанный с G-белком родопсин-подобный рецептор, который широко экспрессируется в периферических тканях и подкорковых областях центральной нервной системы, включая лимбическую систему и моноаминергические пути [1–4]. В исследованиях на мышах было установлено, что TAAR1 также обнаруживается в области медиальной префронтальной коры, в V слое пирамидных нейронов [5]. Локализация TAAR1 совместно с переносчиками дофамина и серотонина, коэкспрессия с транспортером норадреналина, а также нейроанатомическое расположение TAAR1 свидетельствуют о его возможной роли в регуляции моноаминергической передачи и связанных с этим когнитивных процессов [6].

Вышеупомянутые особенности делают TAAR1 потенциально полезной мишенью для лечения

психоневрологических расстройств, таких как биполярное расстройство, наркомания, болезнь Паркинсона и шизофрения [7]. Хотя установлено, что редкие варианты гена *TAAR1* связаны с развитием шизофрении у людей [8], а новое лекарство на основе агониста TAAR1 уже проходит стадию клинических испытаний [9], неврологическая основа этого заболевания до сих пор остается предметом для обсуждения.

Исследования на модельных животных показывают, что мыши, нокаутные по гену, кодирующему TAAR1, демонстрируют особенности физиологии и поведения, аналогичные наблюдающимся у пациентов с шизофренией. Было обнаружено, что такие животные обладают повышенной двигательной реакцией в ответ на введение амфетаминов, имеют повышенное содержание дофамина, норадреналина и серотонина в стриатуме [3, 10],

недостаточную функциональную активность рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) в медиальной префронтальной коре [5], а также дефицит предимпульсного торможения [10, 11].

Частыми симптомами, отражающими когнитивные и функциональные нарушения, наблюдаемые при шизофрении, являются такие высокореплицируемые биомаркеры, как дефицит сенсорного гейтинга, волны P300 и негативности рассогласования (НР) [12]. Недавно полученные результаты показали влияние введения агониста TAAR1 на электрофизиологические аналоги биомаркеров шизофрении на модели мышей. Выявлено, что введение агониста TAAR1 вызывает достоверное увеличение индекса сенсорного гейтинга [13], а также увеличение амплитуды НР-подобного ответа [14].

НР представляет собой независимый от внимания когнитивный компонент слуховых вызванных потенциалов (ВП), который регистрируется в ответ на редкие изменения в повторяющихся звуковых последовательностях [15]. Дефицит НР у людей является стабильным показателем аномалий слухового восприятия и внимания у больных шизофренией [16–18]. Таким образом, исследование НР-подобного ответа у мышей, нокаутных по гену, кодирующему TAAR1, может представить новые данные о роли рецепторов TAAR1 в нарушениях процессов произвольного внимания и слухового восприятия у пациентов с шизофренией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования на животных проводились в строгом соответствии с этическими стандартами, утвержденными правовыми актами РФ и принципами Базельской декларации. Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета.

Двенадцать мышей дикого типа (WT) и шестнадцать мышей-самцов, нокаутных по гену, кодирующему TAAR1 (TAAR1-KO), в возрасте от 3 до 5 месяцев были получены из вивария Института трансляционной биомедицины (Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия). Мыши дикого типа (WT) и мыши TAAR1-KO были получены путем скрещивания гетерозиготных животных C57BL6/129SvJ.

Операционные процедуры проводили под общим наркозом: золетил (70 мг/кг) вводился внутривенно и ксилазин (0.2 мг/кг) – внутримышечно. Эпидуральные активные электроды были имплантированы билатерально (AP = –6; ML = ±3.5, координаты указаны в мм от bregma), референтный электрод был расположен в правом полушарии (AP = –2.5, ML = 3.5); заземляющий электрод – в левом полушарии (AP = –2.5, ML = –3.5). Электроды фиксировали дентальной пластмассой

холодного отверждения “Акродент” (ОАО “Стома”, Украина). Операционное поле обрабатывалось банеоцином; до операции в качестве антибиотика внутримышечно вводился бициллин-5 (100 мг/кг). Восстановительный период составлял не менее 5 дней.

Регистрация электроэнцефалограммы (ЭЭГ) проводилась в свободном поведении: для адаптации животных помещали в экспериментальную камеру за 15 мин до начала эксперимента, во время эксперимента животные могли свободно перемещаться по экспериментальной камере. Экспериментальная камера (бокс из плексигласа 30 × 15 × 17 см) располагалась между динамиками, через которые с интенсивностью 86 дБ подавались стимулы, генерируемые программой Psytask v. 2.4 (ООО “Мицар”, Россия). ЭЭГ регистрировалась с помощью электроэнцефалографа Мицар-ЭЭГ-05/70-201 и программного обеспечения WinEEG v. 2.4 (ООО “Мицар”, Россия).

Для уменьшения влияния физических свойств стимулов на параметры слуховых ВП ответы регистрировались в прямой (стандартный стимул 6 кГц и девиантный стимул 8 кГц) и обратной (стандартный стимул 8 кГц и девиантный стимул 6 кГц) парадигме “одд-болл”. В каждой последовательности предъявлялось 1000 стимулов, 10% из которых были девиантными. Стимулы предъявлялись в псевдослучайном порядке таким образом, чтобы перед каждым девиантным стимулом воспроизводилось не менее трех стандартных стимулов. Поскольку разница в характеристиках ВП в ответ на стандартные и девиантные стимулы может отражать как процессы опознания отклоняющегося стимула, так и стимул-специфическую адаптацию, мы дополнительно регистрировали слуховые ВП в мультистимульной контрольной парадигме [19]. Мультистимульная парадигма состояла из 10 тонов (от 6 до 9 кГц с шагом 1 кГц), которые предъявлялись в псевдослучайном порядке без повторений. Все стимулы представляли собой синусоидальные тоны длительностью 100 мс (включая интервал нарастания/спада 5 мс); межстимульный интервал составлял 500 мс. Всего предъявлялось 1000 стимулов, каждый тон проигрывался 100 раз.

ЭЭГ была отфильтрована в диапазоне от 1.6 до 50 Гц. Артефакты, связанные с грумингом и движениями, были определены с помощью визуального анализа и удалены. Индивидуальные ВП в ответ на стандартные, девиантные и контрольные стимулы соответствующих частот были рассчитаны с коррекцией изолинии от –100 до 0 мс. Для дальнейшего анализа были усреднены только стандартные стимулы, предшествующие девиантному стимулу, а также усреднены ВП для левого и правого отведения.

На кривой усредненного ВП для двух групп животных визуально были выделены 4 основные ком-

поненты: P1 – как первое максимальное положительное отклонение со средней латентностью 20 мс; N1 – как соседнее максимальное отрицательное отклонение со средней латентностью 32 мс; P2 – как соседнее максимальное положительное отклонение со средней латентностью 56 мс и поздний компонент (LC) со средней латентностью 176 мс. Средние амплитуды индивидуальных ВП (от изолинии до пика) в ответ на предъявление стандартных, девиантных и контрольных стимулов рассчитывали для компонент P1 (16–24 мс), N1 (28–36 мс), P2 (52–60 мс) и позднего компонента (168–184 мс).

Все данные имели нормальное распределение согласно критерию Колмогорова–Смирнова. Достоверность различия средних амплитуд компонент ВП анализировали с помощью метода смешанного дисперсионного анализа (IBM SPSS Statistic v. 21, IBM Corporation, Нью-Йорк, США) с внутригрупповым фактором Тип стимула и межгрупповым фактором Группа (TAAR1-КО и WT). В случае значимого нарушения сферичности применялась поправка Гринхауза–Гейссера ($p < 0.05$ согласно критерию Моучли). Апостериорный анализ проводился с использованием поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Парадигма “одд-болл”

На рис. 1 представлены усредненные ВП в ответ на предъявление стандартных и девиантных стимулов для групп TAAR1-КО и WT. Для ранних компонент ВП P1 (16–24 мс), N1 (28–36 мс) и P2 (52–60 мс) не было обнаружено статистически значимых различий между группами животных ($p > 0.888$), что указывает на сохранность ранних стадий обработки слуховой информации у мышей TAAR1-КО. Для компонента P2 была обнаружена разница в амплитуде ответа на девиантные и стандартные стимулы для двух групп животных (значимое влияние фактора Тип стимула: $F(1, 26) = 4.324$, $p = 0.048$, $\eta^2 = 0.143$). Для компонент P1 и N1 значимых различий обнаружено не было ($p > 0.126$).

Статистический анализ для позднего компонента ВП (168–184 мс) показал достоверное взаимодействие факторов Тип стимула*Группа ($F(1, 26) = 5.518$, $p = 0.027$, $\eta^2 = 0.175$). Анализ парных сравнений показал достоверное увеличение негативности амплитуды ответа на девиантный стимул ($M = 2.562$, $SD = 4.627$) по сравнению с ответом на стандартный стимул ($M = 5.013$, $SD = 2.391$) в группе WT ($p = 0.037$). В группе TAAR1-КО достоверных различий между стандартными ($M = 1.412$, $SD = 3.001$) и девиантными ($M = 2.416$, $SD = 4.641$) стимулами обнаружить не удалось ($p = 0.307$). Анализ парных сравнений амплитуд ответа между двумя группами животных показал боль-

шую амплитуду ответа на стандартный стимул в группе WT по сравнению с группой TAAR1-КО ($p = 0.002$). Достоверных различий между амплитудами ответов на девиантные стимулы обнаружено не было ($p = 0.935$).

Мультистимульная контрольная парадигма

Привыкание, то есть снижение интенсивности реакции при повторяющемся действии раздражителя, оказывает значительное влияние на характеристики ВП. Особенно этот процесс влияет на амплитуду часто повторяющегося стандартного стимула и может вносить значительный вклад в разницу ответов на девиантные и стандартные стимулы [20].

Чтобы разграничить процессы стимул-специфической адаптации и обнаружения отклонения, мы сравнили ВП на стандартные и девиантные стимулы с ВП в ответ на предъявление контрольных стимулов соответствующей частоты, предъявляемых в мультистандартной контрольной парадигме. Результаты дисперсионного анализа показывают отсутствие достоверных различий между амплитудами ответов на девиантные и контрольные стимулы ($p > 0.088$). Для ранних компонент P1 и N1 в ответ на стандартные стимулы главные эффекты или взаимодействие факторов также не были значимыми ($p > 0.494$). Для компонента P2 была обнаружена разница между ВП в ответ на контрольные и стандартные стимулы как для группы WT, так и для группы TAAR1-КО (значимое влияние фактора Тип стимула: $F(1, 26) = 7.456$, $p = 0.011$, $\eta^2 = 0.223$), что указывает на усиление реакции на контрольные стимулы. Для позднего компонента обнаружено значимое влияние фактора Группа ($F(1, 26) = 7.551$, $p = 0.011$, $\eta^2 = 0.225$). Были проведены два отдельных однофакторных дисперсионных анализа, которые показали достоверное влияние фактора Тип стимула в группе WT ($F(1, 11) = 4.952$, $p = 0.048$, $\eta^2 = 0.310$) и отсутствие достоверных различий в группе TAAR1-КО ($p = 0.513$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

TAAR1 известен как нейромодулятор моноаминергических систем, обеспечивающий отрицательную регуляцию активности дофаминергических и серотонинергических нейронов [21–24]. Способность TAAR1 регулировать моноаминергические системы обуславливает его заметную роль в возникновении психических и неврологических расстройств. Физиологические и патофизиологические эффекты TAAR1 выражаются в его антидепрессивном и прокогнитивном действии [24], а также в регуляции аддиктивного поведения [6, 25–27]. Кроме того, TAAR1, вероятно, задействован в развитии ряда расстройств, таких как болезнь Паркинсона и шизофрения [28]. Проко-

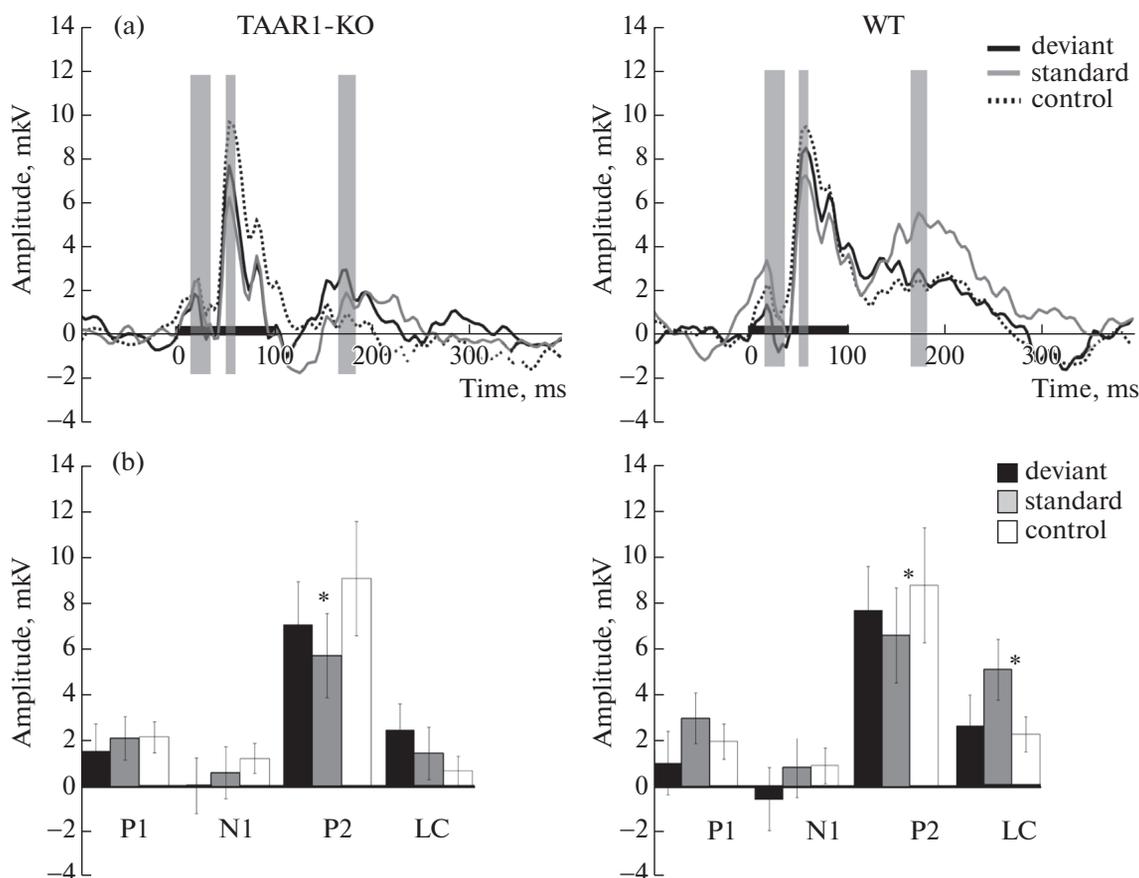


Рис. 1. Вызванные потенциалы и усредненная амплитуда пиков для групп TAAR1-KO и WT. (a) – ВП в ответ на стандартные (серая линия), девиантные (черная линия) и контрольные (пунктирная линия) стимулы. Черная горизонтальная линия указывает время предъявления стимула. Серые прямоугольники показывают интервалы для статистического анализа. (b) – усредненная амплитуда пиков ($M \pm SEM$) для групп TAAR1-KO и WT в ответ на стандартные (серые столбцы), девиантные (черные столбцы) и контрольные (белые столбцы) стимулы; * $p > 0.05$ по результатам дисперсионного анализа и апостериорных тестов с использованием поправки Бонферрони.

гнитивная активность TAAR1 также подтверждается его влиянием на электрофизиологические корреляты когнитивных процессов: негласность расогласования и сенсорный гейтинг [13, 14]. Снижение таламокортикального гейтинга [29], а также дефицит НР являются хорошо известными биомаркерами шизофрении [12], отражающими нарушение механизма адаптации или процесса обнаружения отклонений [18].

Настоящее исследование направлено на то, чтобы представить дополнительные доказательства роли TAAR1 в генерации НР на модели грызунов. Обнаружено, что мыши TAAR1-KO демонстрируют уменьшение разницы в ответах на стандартные и девиантные стимулы в парадигме “одд-балл”. В то время как у мышей линии TAAR1-KO ранние компоненты ВП (P1, N1, P2) не нарушены, наблюдаемый эффект отражается в изменении амплитуды позднего ответа (168–184 мс) на стандартный стимул.

Поскольку НР представляет собой комбинацию процессов стимул-специфической адаптации и реакции обнаружения отклонения, мы сравнили стандартные и девиантные стимулы с контрольными стимулами, предъявляемыми в мультистандартной парадигме [20]. В этой парадигме все стимулы предъявлялись с одинаковой вероятностью, равной 10%, что было идентично вероятности предъявления девиантных стимулов в парадигме “одд-балл”. Таким образом, ответы на контрольные стимулы, с одной стороны, имели более низкий уровень адаптации по сравнению с ответами на повторяющиеся стандартные стимулы, а с другой, не были подвержены изменениям, вызванным новизной предъявляемого стимула (в отличие от девиантных стимулов).

Нами было установлено, что ВП в ответ на девиантные стимулы достоверно не отличаются от ВП в ответ на контрольные стимулы, в то время как на стандартные стимулы достоверное различие наблюдается на временном интервале 168–184 мс.

Это указывает на то, что разница между ответами на стандартные и девиантные стимулы у мышей WT не может быть объяснена процессами обнаружения отклонения. Разница амплитуд, наблюдаемая между высокоадаптированными стандартными и низкоадаптированными контрольными стимулами вместе со сходной реакцией на девиантные и контрольные стимулы, позволяет предположить, что НР-подобный ответ у мышей WT, скорее всего, отражает процессы ССА. С другой стороны, мыши TAAR-KO не показывают различий между стандартными, девиантными и контрольными стимулами. Возможно, это свидетельствует о нарушении процесса ССА при предъявлении повторяющихся стимулов у мышей TAAR-KO, что выражается в отсутствие разницы между адаптированным стандартным и менее адаптированным контрольным стимулами.

ССА представляет собой сложный и многоуровневый неврологический механизм, который регулирует интенсивность ответа на повторяющуюся стимуляцию. Он включает как ГАМКергическое постсинаптическое торможение [30], так и синаптическую депрессию на уровне коры, среднего мозга и таламуса [20, 31–33]. Роль TAAR1 в ССА может быть опосредована его обширным влиянием на моноаминергические системы. Введение агонистов TAAR1 приводит к снижению скорости возбуждения нейронов вентральной области покрышки [22], тогда как у мышей линии TAAR1-KO, а также при введении антагониста TAAR1 наблюдается противоположная реакция увеличения активности нейронов [3, 21]. В прилежащем ядре агонисты TAAR1 также ингибируют высвобождение дофамина *in vitro* [34] и *in vivo* [27], а мыши TAAR1-KO демонстрируют повышенную чувствительность постсинаптических рецепторов дофамина D2 в стриатуме [5]. Обнаружено, что серотониновые нейроны в дорсальном ядре шва также подвержены влиянию TAAR1, что выражается в снижении возбуждения после введения полного агониста TAAR1 и увеличении возбуждения после введения антагониста [22]. У мышей TAAR1-KO наблюдается повышенная частота спонтанной активности нейронов в дорсальном ядре шва [22], однако базовый уровень высвобождения серотонина в дорсальном стриатуме, прилежащем ядре и префронтальной коре, не изменяется [4].

Влияние дофаминергических и серотонинергических систем на НР хорошо известно, но содержит ряд противоречий: в нескольких исследованиях сообщалось, что снижение дофаминергической активности приводит к увеличению реакции на отклоняющийся стимул [35, 36], а снижение синтеза серотонина выражается в уменьшении амплитуды НР [37, 38]. С другой стороны, некоторые исследования указывают на увеличение амплитуды и уменьшение латентности НР при снижении синтеза серотонина [39]. Эффект уменьшения ССА на-

блюдается у мышей после введения селективного ингибитора обратного захвата серотонина и у мышей, нокаутных по гену, кодирующему транспортер серотонина (SERT-KO) [40]. Мыши SERT-KO демонстрируют повышенный уровень серотонина в прилежащем ядре, скорлупе и префронтальной коре [41], повышенный уровень тревожности и снижение амплитуды НР [40].

Таким образом, мы обнаружили, что у мышей TAAR1-KO наблюдается снижение ССА, что, скорее всего, является результатом нарушения модуляции моноаминергических систем. В совокупности полученные данные позволяют предположить, что мыши TAAR1-KO могут представлять собой полезную модель нарушений НР.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhilani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA, Gerald C (2001) Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8966–8971. <https://doi.org/10.1073/pnas.151105198>
2. Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, Darland T, Suchland KL, Pasumamula S, Kennedy JL, Olson SB, Magenis RE, Amara SG, Grandy DK (2001) Amphetamine, 3,4-methylenedioxy-methamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol* 60:1181–1188. <https://doi.org/10.1124/mol.60.6.1181>
3. Lindemann L, Meyer C, Jeanneau K, Bradaia A, Ozmen L, Bluethmann H, Bettler B, Wettstein J, Borroni E, Moreau J, Hoener M (2008) Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 324:948–956. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132647>

4. Di Cara B, Maggio R, Aloisi G, Rivet JM, Lundius EG, Yoshitake T, Svenningsson P, Brocco M, Gobert A, de Groote L, Cistarelli L, Veiga S, de Montron CD, Rodriguez M, Galizzi JP, Lockhart BP, Cogé F, Boutin JA, Vayer P, Verdouw PM, Groenink L, Millan MJ (2011) Genetic deletion of trace amine 1 receptors reveals their role in auto-inhibiting the actions of ecstasy (MDMA). *J Neurosci* 31:16928–16940. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2502-11.2011>
5. Espinoza S, Lignani G, Caffino L, Maggi S, Sukhanov I, Leo D, Mus L, Emanuele M, Ronzitti G, Harmeier A, Medrihan L, Sotnikova TD, Chiergatti E, Hoener MC, Benfenati F, Tucci V, Fumagalli F, Gainetdinov RR (2015) TAAR1 modulates cortical glutamate NMDA receptor function. *Neuropsychopharmacology* 40:2217–2227. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.65>
6. Pei Y, Asif-Malik A, Canales JJ (2016) Trace amines and the trace amine-associated receptor 1: Pharmacology, neurochemistry, and clinical implications. *Front Neurosci* 10:148. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00148>
7. Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M (2017) Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol Ther* 180:161–180. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.002>
8. John J, Kukshal P, Bhatia T, Chowdari KV, Nimganonkar VL, Deshpande SN, Thelma BK (2017) Possible role of rare variants in trace amine associated receptor 1 in schizophrenia. *Schizophr Res* 189:190–195. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.02.020>
9. Dodd S, F. Carvalho A, Puri BK, Maes M, Bortolasci CC, Morris G, Berk M (2021) Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1): A new drug target for psychiatry? *Neurosci Biobehav Rev* 120:5 37–541. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.028>
10. Wolinsky TD, Swanson CJ, Smith KE, Zhong H, Borowsky B, Seeman P, Branchek T, Gerald CP (2007) The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: An animal model with relevance to schizophrenia. *Genes Brain Behav* 6:628–639. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00292.x>
11. Полякова НВ, Виноградова ЕП, Александров АА, Гайнетдинов РР (2018) Преимпульсное торможение у мышей-нокаут по TAAR1 рецептору. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 104 (9):1098–1105. [*Polyakova NV, Vinogradova EP, Aleksandrov AA, Gainetdinov RR* (2018) Prepulse inhibition in the TAAR1 knockout mice. *Russ J Physiol* 104 (9):1098–1105. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.010>
12. Light GA, Swerdlow NR (2015) Future clinical uses of neurophysiological biomarkers to predict and monitor treatment response for schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 1344:105–119. <https://doi.org/10.1111/nyas.12730>
13. Aleksandrov AA, Dmitrieva ES, Volnova AB, Knyazeva VM, Gainetdinov RR, Polyakova NV (2019) Effect of trace amine-associated receptor 1 agonist RO5263397 on sensory gating in mice. *Neuroreport* 30:1004–1007. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000001313>
14. Aleksandrov AA, Knyazeva VM, Volnova AB, Dmitrieva ES, Polyakova NV, Gainetdinov RR (2019) Trace amine-associated receptor 1 agonist modulates mismatch negativity-like responses in mice. *Front Pharmacol* 10:470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00470>
15. Näätänen R, Kujala T, Winkler I (2011) Auditory processing that leads to conscious perception: A unique window to central auditory processing opened by the mismatch negativity and related responses. *Psychophysiology* 48:4–22. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2010.01114.x>
16. Näätänen R, Kähkönen S (2009) Central auditory dysfunction in schizophrenia as revealed by the mismatch negativity (MMN) and its magnetic equivalent MMNm: A review. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:125–135. <https://doi.org/10.1017/S1461145708009322>
17. Javitt DC, Doneshka P, Zylberman I, Ritter W, Vaughan HG (1993) Impairment of early cortical processing in schizophrenia: An event-related potential confirmation study. *Biol Psychiatry* 33:513–519. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90005-X)
18. Michie PT (2001) What has MMN revealed about the auditory system in schizophrenia? *Int J Psychophysiol* 42:177–194. [https://doi.org/10.1016/S0167-8760\(01\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8760(01)00166-0)
19. O'Reilly JA, Conway BA (2021) Classical and controlled auditory mismatch responses to multiple physical deviances in anaesthetised and conscious mice. *Eur J Neurosci* 53:1839–1854. <https://doi.org/10.1111/ejn.15072>
20. Ross JM, Hamm JP (2020) Cortical Microcircuit Mechanisms of Mismatch Negativity and Its Underlying Subcomponents. *Front Neural Circuits* 14:13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00013>
21. Bradaia A, Trube G, Stalder H, Norcross RD, Ozmen L, Wettstein JG, Pinard A, Buchy D, Gassmann M, Hoener MC, Bettler B (2009) The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20081–20086. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906522106>
22. Revel FG, Moreau J-L, Gainetdinov RR, Bradaia A, Sotnikova TD, Mory R, Durkin S, Zbinden KG, Norcross R, Meyer CA, Metzler V, Chaboz S, Ozmen L, Trube G, Pouzet B, Bettler B, Caron MG, Wettstein JG, Hoener MC (2011) TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8485–8490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103029108>
23. Espinoza S, Salahpour A, Masri B, Sotnikova TD, Messa M, Barak LS, Caron MG, Gainetdinov RR (2011) Functional Interaction between Trace Amine-Associated Receptor 1 and Dopamine D2 Receptor. *Mol Pharmacol* 80:416–425. <https://doi.org/10.1124/mol.111.073304>
24. Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, Mory R, Bradaia A, Buchy D, Metzler V, Chaboz S, Groebke Zbinden K, Galley G, Norcross RD, Tuerck D, Bruns A, Morairty SR, Kilduff TS,

- Wallace TL, Risterucci C, Wettstein JG, Hoener MC (2013) A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. *Mol Psychiatry* 18:543–556.
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.57>
25. Thorn DA, Jing L, Qiu Y, Gancarz-Kausch AM, Galuska CM, Dietz DM, Zhang Y, Li JX (2014) Effects of the trace amine-associated receptor 1 agonist RO5263397 on abuse-related effects of cocaine in rats. *Neuropsychopharmacology* 39:2309–2316.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.91>
 26. Cotter R, Pei Y, Mus L, Harmeier A, Gainetdinov RR, Hoener MC, Canales JJ (2015) The trace amine-associated receptor 1 modulates methamphetamine's neurochemical and behavioral effects. *Front Neurosci* 9:39.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00039>
 27. Liu JF, Seaman R, Siemian JN, Bhimani R, Johnson B, Zhang Y, Zhu Q, Hoener MC, Park J, Dietz DM, Li JX (2018) Role of trace amine-associated receptor 1 in nicotine's behavioral and neurochemical effects. *Neuropsychopharmacology* 43:2435–2444.
<https://doi.org/10.1038/s41386-018-0017-9>
 28. Dedic N, Dworak H, Zeni C, Rutigliano G, Howes OD (2021) Therapeutic Potential of TAAR1 Agonists in Schizophrenia: Evidence from Preclinical Models and Clinical Studies. *Int J Mol Sci* 22:13185.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413185>
 29. Adler LE, Olincy A, Waldo M, Harris JG, Griffith J, Stevens K, Flach K, Nagamoto H, Bickford P, Leonard S, Freedman R (1998) Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull* 24:189–202.
 30. Duque D, Malmierca MS, Caspary DM (2014) Modulation of stimulus-specific adaptation by GABAA receptor activation or blockade in the medial geniculate body of the anaesthetized rat. *J Physiol* 592:729–743.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261941>
 31. Nelken I (2014) Stimulus-specific adaptation and deviance detection in the auditory system: experiments and models. *Biol Cybern* 108:655–663.
<https://doi.org/10.1007/s00422-014-0585-7>
 32. Natan RG, Briguglio JJ, Mwilambwe-Tshilobo L, Jones SI, Aizenberg M, Goldberg EM, Geffen MN (2015) Complementary control of sensory adaptation by two types of cortical interneurons. *Elife* 4: e09868.
<https://doi.org/10.7554/eLife.09868>
 33. Malmierca MS, Anderson LA, Antunes FM (2015) The cortical modulation of stimulus-specific adaptation in the auditory midbrain and thalamus: A potential neuronal correlate for predictive coding. *Front Syst Neurosci* 9:19.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00019>
 34. Leo D, Mus L, Espinoza S, Hoener MC, Sotnikova TD, Gainetdinov RR (2014) Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: Role of D2 dopamine autoreceptors. *Neuropharmacology* 81:283–291.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.007>
 35. Kähkönen S, Ahveninen J, Jääskeläinen IP, Kaakkola S, Näätänen R, Huttunen J, Pekkonen E (2001) Effects of haloperidol on selective attention: A combined whole-head MEG and high-resolution EEG study. *Neuropsychopharmacology* 25:498–504.
[https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00255-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00255-X)
 36. Valdés-Baizabal C, Carbajal GV, Pérez-González D, Malmierca MS (2020) Dopamine modulates subcortical responses to surprising sounds. *PLoS Biol* 18: e3000744.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000744>
 37. Ehlers CL, Wall TL, Chaplin RI (1991) Long latency event-related potentials in rats: Effects of dopaminergic and serotonergic depletions. *Pharmacol Biochem Behav* 38:789–793.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90243-U](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90243-U)
 38. Ahveninen J, Kähkönen S, Pennanen S, Liesivuori J, Ilmoniemi RJ, Jääskeläinen IP (2002) Tryptophan depletion effects on EEG and MEG responses suggest serotonergic modulation of auditory involuntary attention in humans. *Neuroimage* 16:1052–1061.
<https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1142>
 39. Kähkönen S, Mäkinen V, Jääskeläinen IP, Pennanen S, Liesivuori J, Ahveninen J (2005) Serotonergic modulation of mismatch negativity. *Psychiatry Res – Neuroimaging* 138:61–74.
<https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2004.09.006>
 40. Pan W, Lyu K, Zhang H, Li C, Chen P, Ying M, Chen F, Tang J (2020) Attenuation of auditory mismatch negativity in serotonin transporter knockout mice with anxiety-related behaviors. *Behav Brain Res* 379:112387.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.11238741>
 41. Shen HW, Hagino Y, Kobayashi K, Shinohara-Tanaka K, Ikeda K, Yamamoto H, Yamamoto T, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS, Uhl GR, Sora I (2004) Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 29:1790–1799.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300476>

STIMULUS SPECIFIC ADAPTATION IS IMPAIRED IN TRACE AMINE-ASSOCIATED RECEPTOR 1 (TAAR1) KNOCKOUT MICE

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

^a St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

[#] e-mail: v.m.knyazeva@spbu.ru

TAAR1 is known as the neuromodulator of monoaminergic systems, providing a negative regulation of dopaminergic and serotonergic neuronal activity. The ability of TAAR1 to regulate monoaminergic systems determines its prominent role in psychiatric and neurological disorders. The present study aimed to provide further evidence for the role of TAAR1 in mismatch negativity (MMN) generation. The electroencephalogram was registered in freely moving TAAR1 knockout and wild-type mice. As the MMN response reflects a combination of stimulus-specific adaptation (SSA) and deviance detection (DD) response, we compared standard and deviant stimuli to the multi-standard control. The difference observed between the high-adapted standard and low-adapted control stimuli together with the similar response to deviant and control stimuli suggests that the MMN-like response in wild type mice most likely reflects the SSA. On the other hand, TAAR1 knockout mice show no difference between standard, deviant, and control stimuli. That possibly indicates that the SSA to repetitive stimuli is violated in TAAR-KO mice.

Keywords: trace amine associated receptors, TAAR1, mismatch negativity (MMN), stimulus specific adaptation (SSA), auditory event related potentials (ERPs), oddball paradigm

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ НОНАПЕПТИДЕРГИЧЕСКОЙ ПРЕОПТИКО-ГИПОФИЗАРНОЙ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ РЫБ В НЕРЕСТОВЫХ МИГРАЦИЯХ

© 2022 г. П. Е. Гарлов¹, В. В. Кузик^{2,*}

¹ Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

*e-mail: kuzikov@mail.ru

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

После доработки 25.03.2022 г.

Принята к публикации 15.04.2022 г.

На основе результатов эколого-гистофизиологических исследований с применением световой микроскопии, включая иммуногистохимию, электронную микроскопию с количественной морфометрией результатов, обнаружено участие преоптико-гипофизарной нейросекреторной системы (гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы, ГГНС) в инициировании миграционных процессов, подтвердив, таким образом, гипотезу проф. Н.Л. Гербильского и А.Л. Поленова о природе “миграционного импульса”. Впервые, в начале миграционного процесса у генетически отдаленных видов, но экологически сходных анадромных форм мигрантов (осетровых и лососевых) с различным сезоном размножения: весенненерестующих русского осетра, севрюги и осенненерестующей горбуши установлена активация синтеза нейросекреторных продуктов в перикарионах нейросекреторных клеток (НСК) и их транспорт в нейрогипофиз, где они аккумулируются. Одновременно показано выведение нейросекреторных продуктов из НСК в ликвор III желудочка мозга. Таким образом, ГГНС оказывает комплексный синхронный эффект, который заключается: 1) в нейротропном воздействии нонапептидных нейрогормонов на поведенческие центры центральной нервной системы (ЦНС), вызывающее доминантное состояние возбуждения ЦНС, соответствующее “миграционному импульсу”, 2) в нарушении адаптированного уровня осморегуляции морского “нагульного” периода онтогенеза и 3) в прекращении известного антигонадотропного действия нонапептидных нейрогормонов, что способствует переходу организма на энергетически тип метаболизма. Сопоставительный анализ собственных и литературных данных подтверждает общность этого метаболического механизма у рыб, что позволяет его рассматривать как важнейшую филогенетическую адаптацию типа ароморфоза, направленную на достижение биологического прогресса вида. В последующих навигационных механизмах хоминга, широко освещенных в мировой литературе, ведущую роль выполняют люлиберинергические центры гипоталамуса. Экологическое многообразие этих механизмов популяционного уровня и наличие стрейнга у рыб позволяет рассматривать их как специализации микроэволюционного происхождения. Последующий анализ функции ГГНС в процессах миграции и нереста позволит установить основную принцип интеграции процессов этого этапа онтогенеза, важнейшего для существования вида.

Ключевые слова: гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система рыб, нейроэндокринная регуляция миграции рыб

DOI: 10.31857/S0044452922030081

Изучение процессов становления и функционирования гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС) у рыб представляет большой интерес в плане понимания эволюционного развития нейросекреторной регуляции в ряду позвоночных. Именно у рыб наиболее ярко представлены анцестральные для всего ряда позвоночных признаки, а также четко выражены адаптивные реакции, характерные для пойкилотермных животных, определяющие большое разнообразие экологических форм, способствующих достиже-

нию биологического прогресса вида [1–3]. По многим морфогенетическим признакам: по типу дробления яйца, характеру формирования аденогипофиза, структуре нейросекреторных центров и др. осетровые рыбы наиболее близки к основному стволу эволюционного древа позвоночных [4]. Изучение механизмов нейроэндокринной регуляции размножения рыб ограничивалось лишь анализом влияния нейроэндокринного комплекса на тропные функции аденогипофиза и на эндокринную и генеративную функции гонад в процессе не-

реста [5–8], однако размножение у проходных рыб включает в себя нерестовые миграции и нерест. Исследование функциональной роли ГГНС имеет особое значение в связи с многофункциональной ролью нонапептидных нейрогормонов в адаптациях организма позвоночных к воздействию стресса, особенно в период размножения [9]. Предполагалось исходно, что у костистых рыб ведущую роль в определении миграционного поведения выполняют нонапептидные нейрогормоны – аргинин-8-вазотонин и изотонин [4]. В начале нерестовой миграции, перед сменой среды обитания, у первично моноциклических форм – анадромных миног и катадромных угрей, а также у скатывающихся смолтов лосося исходно были установлены изменения в осмотической и ионной регуляции [10, 11]. Однако повышение функциональной активности ГГНС в период миграций было установлено только после смены среды обитания в связи с изменением солености [9, 12], либо с сезонными изменениями температур [13]. Поскольку во всех предшествующих исследованиях не были использованы количественные методы оценки функциональной активности ГГНС, либо изучен только один из ее отделов, степень участия системы в репродуктивных процессах не была определена. Однако большинством авторов была отмечена обратная зависимость в содержании нейросекреторного материала в центральном и дистальном отделах ГГНС в преоптическом ядре и в нейрогипофизе у рыб в период нерестовых миграций и в сезон размножения. В преоптическом ядре наблюдалось опустошение нейросекреторных клеток (НСК) от нейросекреторного материала, а в нейрогипофизе отмечалось его значительное накопление. Лишь незначительное уменьшение его в гигантских нейросекреторных терминалях – телах Герринга (до 50 мкм) в нейрогипофизе, было отмечено у осетровых во время нерестовых миграций в различные сезоны [14]. Также некоторое снижение содержания нейросекреторного материала в разных отделах ГГНС было отмечено у скатывающихся смолтов атлантического лосося. Однако четких закономерностей изменения функционального состояния ГГНС в период миграций рыб не было обнаружено, и вопрос о природе “миграционного импульса” до настоящего времени остается открытым [14]. Поэтому в качестве единственного ведущего механизма осуществления миграции рыб принято рассматривать чисто навигационные процессы: воздействия геомагнитных полей на рецепторные системы организма [15, 16] и обонятельного импринтинга и хоминга [7, 17, 18].

Участие ГГНС в осуществлении процесса нереста было установлено на промысловых видах осетровых и костистых рыб благодаря применению эколого-гистофизиологического подхода, который заключается в анализе участия клеточных и тканевых структур в становлении и реализации фи-

логенетических видовых адаптаций в онтогенезе [3, 4, 14]. Эколого-гистофизиологический подход или метод в эволюционной морфологии позволяет вскрыть механизмы важнейших биологических явлений и процессов и, намечая пути к их управлению, выяснять функциональные механизмы микроэволюционного процесса. Рассматривая их как результат “эксперимента, поставленного самой природой”, этот подход позволил нам успешно применить в работе также и метод сопоставительного анализа (“cross-analysis” из области оценки новизны изобретений) [3].

Цель нашего исследования заключалась в выяснении функциональной роли ГГНС в осуществлении нерестовой миграции рыб. Основной задачей исследования явилось определение степени участия ГГНС в процессе анадромной миграции на основе применения эколого-гистофизиологического подхода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены согласно дизайну, одобренному Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН, European Communities council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС), согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. При планировании и проведении исследований на животных соблюдаются “принципы 3R” Replacement (использование альтернативных методов), Reduction (минимизация количества животных в исследованиях), Refinement (минимизация факторов безосновательного стрессирования (боль, дискомфорт и др.) животных до, во время и после проведения исследований).

Состояние ГГНС изучено у половозрелых производителей проходных анадромных рыб из неводных уловов: весенненерестующих русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii Brandt* (Linne, 1833), севрюги *A. stellatus* (Pallas, 1771) из низовьев Волги и осенненерестующей моноциклической горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum, 1792) из низовьев и нерестилищ рек Найбы и Умбы (Южный Сахалин, Кольский полуостров). Для светооптических исследований использовано 17 самок осетра и севрюги и 23 особи горбуши обоего пола. На электронномикроскопическом уровне изучено 9 самок осетра и севрюги и 12 особей горбуши обоего пола.

Для световой микроскопии ткань мозга с гипофизом фиксировали в жидкости Буэна и заключали в парафин. Депарафинизированные гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали паральдегид-фуксином (ПАФ) по методике Гомори-Габа с докраской азаном по Гейденгайну [19]. Степень функциональной активности ГГНС определяли морфометрическими количественными методиками оценки степени содержания нейросекре-

торного материала в перикарионах НСК и в нейросекреторных терминалях их аксонов (в преоптическом ядре и в нейрогипофизе). На анализаторах микроизображений “Морфоквант” и “Видеотест” проводили цитоспектрофотометрию гистологических препаратов с использованием программы “Видеотест”.

Иммуногистохимические исследования выполнены с целью установления эргичности НСК. Иммуногистохимический метод с использованием немеченых антител и иммуногистохимические реакции проводили по общепринятой методике [20]. Депарафинизированные срезы промывали в нескольких порциях PBSS и PBS с 0.1% TRITON X-100 (PBST). Затем проводили 30-минутную блокировку эндогенной пероксидазы 0.3%-ным раствором перекиси водорода на PBST. После нескольких промывок в PBST была проведена блокировка неспецифического связывания при комнатной температуре в течение 1 ч в 5%-ном блокирующем растворе, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина и 3% нормальной сыворотки козы, разведенные на PBST. Затем при 4°C в течение 48 ч были проведены инкубации с первичными антителами к вазотоцину (кролик, 1:1000, Sigma, США) и изотоцину (кролик, 1:1000, Sigma, США). После инкубации и тщательной промывки в PBST в течение 1 ч срезы инкубировали при комнатной температуре во вторичных антителах (овца-против-кролика, конъюгированная с биотином 1:300; VectorLabs., Великобритания).

После промывки в PBS срезы на 1 ч при комнатной температуре помещали в раствор стрептовидин-пероксидазы (BioLegend, США), разведенной на PBS 1:700. Во всех случаях для визуализации пероксидазы использовали 0.05%-ный раствор диаминобензидина с 0.3%-ной перекисью водорода на PBS. Далее стекла подвергали стандартной гистологической обработке, заключали в прозрачную среду (Bio-Optika, Италия) и высушивали. Специфичность окраски проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител). Позитивным контролем считали выявление белков в структурах, ранее описанных в литературе.

Электронно микроскопическое исследование проведено на материале (область преоптического ядра гипоталамического отдела головного мозга), фиксированном в глутаральдегиде (по Сабатини), осмии (по Колфилду) и заключенном в аралдит и эпон [21]. Ультратонкие срезы (50–70 нм) контрастировали в уранилацетате и цитрате свинца по Рейнольдсу. Проводили анализ процентного соотношения НСК, находящихся в различных фазах их секреторного цикла и экструзионного цикла нейросекреторных терминалей аксонов [9]. Результаты представлены в виде таблиц, гистограмм и схем.

Для конструктивного исследования механизмов участия ГНС в осуществлении этапов размноже-

ния проходных рыб, представленных в формализованной графической форме, использован метод сопоставительного анализа [14].

Статистический анализ гистоморфологических и иммуногистохимических исследований ГНС осетровых и горбуши проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и последующего апостериорного анализа межгрупповых различий по критерию Тьюки. Результаты исследований представлены как среднее \pm стандартная ошибка, данные по количественной морфометрии структур и ультраструктур ГНС обработаны статистически с использованием пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У объектов нашего исследования – русского осетра, севрюги и горбуши представлены основные типы строения ГНС рыб (рис. 1). В ГНС осетровых в отличие от костистых рыб четко выражен передний нейрогипофиз или проксимальная нейросекреторная контактная область, гомологичная срединному возвышению наземных позвоночных [9]. В ней осуществляется гипоталамическая регуляция тропных функций аденогипофиза транс-аденогипофизарным путем (рис. 1а: II), по которому нонапептидергические нейрогормоны через сеть порталных сосудов поступают в аденогипофиз. В нейрогипофизе осетровых, имеющем трубчатое строение, наиболее выражены аксо-вазальные нейросекреторные контакты с капиллярами общего кровотока, по которым нонапептидные нейрогормоны поступают к висцеральным органам-мишеням пара-аденогипофизарным путем (рис. 1а: III) и участвуют в регуляции вегетативных функций организма [14]. Наиболее древние, менее развитые, аксо-вентрикулярные контакты тел Герринга с полостями гипофизарных бухт (*recessus hypophyseus* как продолжение *recessus infundibulum*) осуществляют транспорт нонапептидных нейрогормонов в спинномозговую жидкость (ликвор) транс-вентрикулярным путем (рис. 1а: I), откуда нейрогормоны воздействуют на центры поведения в ЦНС [23].

У горбуши, как и у большинства костистых рыб, корни нейрогипофиза пронизывают все три отдела гипофиза (про-, мезо и мета-аденогипофиз) [3, 24]. В мета-аденогипофизе нейросекреторные терминали образуют не прямые аксо-вазальные контакты, формируя здесь компактную нейропромежточную долю гипофиза (рис. 1б).

Характерные морфологические особенности строения ГНС у осетровых согласуются с представлением об их близости к основному стволу эволюционного древа позвоночных. Наличие в нейрогипофизе прямых аксо-вентрикулярных нейросекреторных контактов с полостями гипофизарных бухт, откуда нонапептидные нейрогормоны посту-

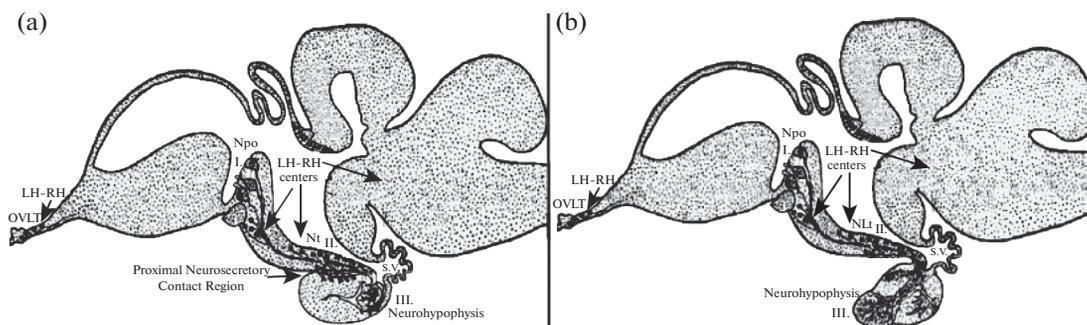


Рис. 1. Схемы локализации нонапептидергических НСК из преоптического ядра (Npo) и люлиберинергических НСК (LH-RH, мелкие черные кружки) нейросекреторных центров в гипоталамусе рыб и пути выведения нонапептидергических нейрогормонов у осетровых (а) и у костистых рыб (б): I. Транс-вентрикулярный путь: нейротропный эффект нонапептидных нейрогормонов, II. Транс-аденогипофизарный путь: аденогипофизотропный эффект нонапептидных нейрогормонов, III. Пара-аденогипофизарный путь: висцеротропный эффект нонапептидных нейрогормонов. Обозначения: Npo – Nucleus preopticus (преоптическое ядро), малые черные кружки – люлиберинергические (LH-RH) НСК, OVLt – Organum vasculosum laminae terminalis, сосудистый орган концевой пластинки, NLt – Nucleus Lateralis tuberis, латеральное ядро серого бура гипоталамуса, Nt – Nucleus tuberis, туберальное ядро, S.V. – Saccus Vasculosus, сосу­дистый мешок.

пают в ликвор мозга, свидетельствует о нейротропном пути их влияния на ЦНС [18]. Таким образом, нонапептидные нейрогормоны вызывают нейротропный эффект (в областях сомато-, дендро- и аксо-вентрикулярных нейросекретных контактов), аденогипофизотропный (в зонах аксо-аденарных контактов) и висцеротропный (в области аксо-вазальных контактов).

У осетра и у горбуши в начале нерестовой миграции отмечены повышение секреторной активности НСК, гипертрофия (активация) нейроглии и сосудов в области преоптического ядра. Большинство НСК в наиболее дифференцированной дорзальной крупноклеточной части преоптического ядра представлены гипертрофированными активными “светлыми” формами в секреторных фазах “выведения” и “опустошения” от нейросекреторного материала (рис. 2а).

Иммуноцитохимическим исследованием морфофункционального состояния преоптического ядра горбуши было выявлено значительное преобладание вазотоцинергических НСК (рис. 2б, черные стрелки) по сравнению с изотоцинергическими НСК (светлые стрелки). В симметричных частях преоптического ядра многие вазотоцинергические НСК тесно при­мыкают к полости III желудочка мозга, где их апикальные поверхности тесно контактируют с ликвором, формируя сеть сомато-вентрикулярных и дендро-вентрикулярных контактов. Контакты, образованные изотоцинергическими НСК, малочисленны по сравнению с численностью вазотоцинергических НСК контактов, их примерное соотношение составляет 1:5. На электронно микроскопическом уровне в комплексе Гольджи в большинстве нонапептидергических-НСК наблюдаются картины массового формирования элементарных нейросекреторных гранул и

направления их в дендриты и аксоны, что указывает на активацию транспорта синтезируемых нонапептидных нейрогормонов (рис. 2б). Анализ процентного соотношения нонапептидных-НСК в разных фазах секреторной активности (рис. 3а) показал, что 51% из них находятся в функциональном состоянии высокой секреторной активности (фазы 2, 4) и к началу нереста их количество достигает 80% (табл. 1).

В начале речной миграции при активном синтезе нейросекреторных продуктов и их выведении из перикарионов НСК, в нейрогипофизе у всех изученных видов рыб происходит массовая аккумуляция нейросекреторного материала (рис. 4, табл. 2).

Как следует из табл. 2, все клеточно-тканевые элементы нейрогипофиза: нейросекреторные терминали, синусоидные капилляры и питуициты находятся в неактивном функциональном состоянии, однонаправлено свидетельствующем о низком уровне выведения нонапептидных нейрогормонов в общий кровоток (рис. 4).

На ультраструктурном уровне у проходных осетровых рыб в области аксо-вентрикулярных нейросекреторных контактов выявляются картины распада нейросекреторных гранул, разрушение фрагмента тела Герринга по типу макроапокриновой секреции и выход мелкозернистого продукта в полость гипофизарных бухт, что свидетельствует о выведении нейросекреторного продукта в спинномозговую жидкость (рис. 1а, 2д: стрелки). В период активной речной нерестовой миграции транспорт нейросекреторного материала заметно выражен в преоптико-гипофизарном нейросекреторном тракте у горбуши, по результатам цитоспектрофотометрии уровень его содержания в аксонах достигает 0.24 ± 0.05 (ед. оптической плотности) по сравнению с его последующим снижени-

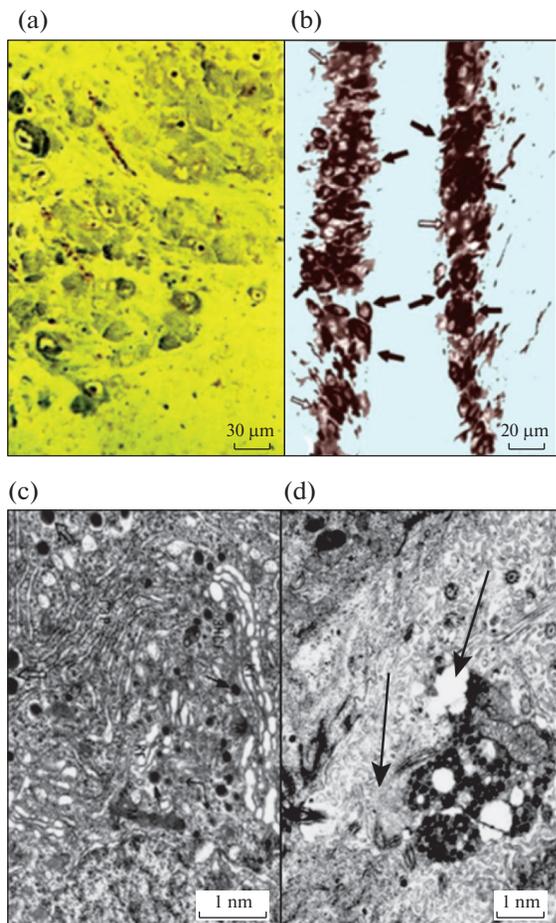


Рис. 2. Перикарионы НСК из преоптического ядра горбуши (а–с) и нейросекреторные терминалы в нейрогипофизе осетра (d) в период миграций и размножения: а–с – в начале нерестовой речной миграции в преоптическом ядре преобладают активные светлые НСК, б – вазотоцинергические НСК контактируют с полостью III желудочка мозга, с – оформление нейросекреторных гранул в комплексе Гольджи НСК, d – разрушение фрагмента тела Герринга вблизи реснички (киноцилии) и выход мелкозернистого содержимого в полость гипофизарной бухты (стрелки). Световая микроскопия: а – окраска паральдегид-фуксин по Гомори-Габу, б – иммуноцитохимическая реакция на выявление вазотоцинергических НСК (ок. $\times 10$, об. $\times 20$). Электронная микроскопия: с, d.

ем до 0.15 ± 0.06 на нерестилищах (V стадия зрелости гонад).

Таким образом, впервые установлено, что в начале нерестовой миграции в ГГНС происходит активный синтез, транспорт и выведение нонапептидных нейрогормонов в полость III желудочка мозга трансвентрикулярным путем, что может свидетельствовать о возможности нейротропного действия нонапептидных нейрогормонов на ЦНС (на рис. 1а, 1б, 2а–2d). Динамика синтетической активности вазотоцин- и изотоцинергических НСК из преоптического ядра впервые была показана в

начале нерестовой миграции и перед нерестом у производителей кеты [25]. У самок в начале речного периода нерестовой миграции уровень синтеза и вазотоцина и изотоцина в НСК из преоптического ядра был значительно выше, чем перед нерестом [26]. У самцов в начале речного периода нерестовой миграции уровень синтеза и иммунореактивности изотоцина в ростровентральной части преоптического ядра был ниже, чем непосредственно перед нерестом, но заметных изменений в активности синтеза вазотоцина отмечено не было [17]. В НСК из преоптического ядра было показано снижение уровня синтеза вазотоцина только у самок кеты в реке по сравнению с предустьевым морским пространством (авандельтой), при отсутствии изменений уровня синтеза изотоцина [27]. Однако морфофункциональное состояние нейрогипофиза в этих работах не рассматривалось, и поэтому механизмы участия нонапептидных нейрогормонов в миграциях остались неясны. Аккумуляция нейросекреторного материала в нейрогипофизе в период нерестовой миграции осетра, севрюги и горбуши указывает на значительное замедление процессов выведения нонапептидных нейрогормонов в кровоток и, как следствие, ослабление висцеротропной активности ГГНС, обеспечивающей регуляцию водно-солевого обмена [28, 29] (рис. 4, табл. 2).

Для выяснения функциональной роли ГГНС в миграции рыб применен метод формализованного количественного сопоставительного анализа, который позволил установить принцип структурной и функциональной организации центров интеграции биологических систем – “триады равновесной системы” [3]. Результаты сопоставления данных, полученных в настоящей работе, с основными литературными данными позволили представить динамику изменений функционального состояния ГГНС на различных этапах онтогенеза проходных рыб [3, 7, 12, 26–29]. Состояния функциональной активности ГГНС четко проявляются либо в обратной зависимости содержания нейросекреторного материала в перикарионах НСК и в нейрогипофизе (рис. 2а, 4), либо в опустошении нейрогипофиза от нейросекреторного материала (рис. 1а, 1б III, табл. 2). Таким образом, можно выделить 2 основных морфофункциональных состояния ГГНС, обеспечивающих регуляцию процессов размножения представленных видов рыб:

1. Состояние нейротропной активности ГГНС, исключаяющее висцеротропное действие нонапептидных нейрогормонов на органы-мишени. Характеризуется опустошением НСК из преоптического ядра от нейросекреторного материала (процессы транспорта и выведения нонапептидных нейрогормонов в ликвор III желудочка мозга соответствуют процессу активного синтеза нейросекреторного материала в перикарионах НСК). Происходит накопление (аккумуляция) нейросекреторного материала в нейрогипофизе.

Таблица 1. Морфометрическая характеристика НСК из преоптического ядра горбуши в процессе нерестовой миграции и к началу нереста

Количественные соотношения НСК в различных функциональных состояниях и фазах секреторного цикла в дорзальной части преоптического ядра (%) и степень гиперемии области преоптического ядра *

		Стадии зрелости гонад (IV, V)			
		Световая микроскопия (n = 23)		Электронная микроскопия (n = 12)	
		IV Нерестовая миграция (в низовье реки)	V В начале нереста (на нерестилище)	IV Нерестовая миграция	V В начале нереста
Функциональные состояния НСК (% соотношения НСК в 4-х фазах активности (фазы активации: 3, 4)	Фазы секреторного цикла НСК				
1. Покой (умеренное содержание нейросекреторного материала)	1. Низкая или умеренная активность	8.2 ± 1.7	5.8 ± 1.8	8 ± 0.8	3 ± 0.2
2. Накопление нейросекреторного материала	2. Высокая активность	34.6 ± 8.0	12.8 ± 5.4	42 ± 5.4	59 ± 8.5
3. Выведение нейросекреторного материала	3. Делонирование нейросекреторного материала	45.8 ± 9.4	57.7 ± 3.1	30 ± 4.9	10 ± 4.0
4. Опустошение от нейросекреторного материала (гиперактивация)	4. Гиперактивность	11.4 ± 4.7	23.8 ± 7.3	9 ± 1.9	21 ± 3.5
Ширина просвета сосудов (степень гиперемии ПЯ, мкм)	5. Репарация органоидов	7.6 ± 0.6	8.7 ± 0.9	4 ± 0.8	1 ± 0.2
	6. Массовая деградация органоидов			—	—
	7. Покой или глубокое торможение функций			7 ± 1.2	6 ± 1.3

*Различия между рядами статистически достоверны ($p < 0.05$), за исключением таковых в 2-х колонках нижнего ряда таблицы: “Ширина просвета сосудов” и “7. Покой или глубокое торможение функций”.

Таблица 2. Характеристики структур дистальных отделов нейрогипофиза горбуши в процессе нерестовой миграции и в начале нереста

Содержание нейросекреторного материала в нейрогипофизе, количественные соотношения нейросекреторных терминалей в различных фазах экстрозионного цикла (рис. 3б), степень активности питуицитов и степень гиперемии нейрогипофиза

Световая микроскопия ($n = 23$)		Стадии зрелости гонад (IV, V)					
		IV Нерестовая миграция (в низовье реки)	V В начале нереста	Электронная микроскопия ($n = 12$)*			
Содержание нейросекреторного материала в нейрогипофизе, состояние его структур			Фазы экстрозионного цикла нейросекреторных терминалей (%)	IV Нерестовая миграция		V В начале нереста	
Нейросекреторный материал (баллы): ♀	4.0 ± 0.12	2.4 ± 0.26	1. Депонирование нейросекреторных гранул	A ₁	A ₂	A ₁	
Нейросекреторный материал (баллы): ♂	3.8 ± 0.13	2.8 ± 0.28	2. Начало выведения нонапептидных нейрогормонов	17 ± 2.35	70 ± 1.45	7 ± 2.86	2 ± 1.05
♀ + ♂ (среднее, баллы)	3.9 ± 0.09	2.6 ± 0.18	3. Активное выведение нонапептидных нейрогормонов	58 ± 4.62	20 ± 1.94	54 ± 3.97	45 ± 1.70
Диаметр ядер питуицитов (мкм)	4.73 ± 0.10	6.24 ± 0.17	4. Истощение после выведения нонапептидных нейрогормонов	20 ± 3.58	2 ± 0.38	33 ± 8.44	47 ± 2.87
Ширина просвета капилляров (мкм)	15.94 ± 0.45	16.64 ± 1.51	5. Накопление нейросекреторных гранул	4 ± 1.20	1 ± 0.22	4 ± 1.56	6 ± 0.17

* Нонапептидергические нейросекреторные терминали вида A₁ с наиболее крупными нейросекреторными гранулами (160–250 нм) являются носителями изотопина, а вида A₂ (с гранулами 110–160 нм) — вазотопина (рис. 2с, 2d; 4б, 4d).

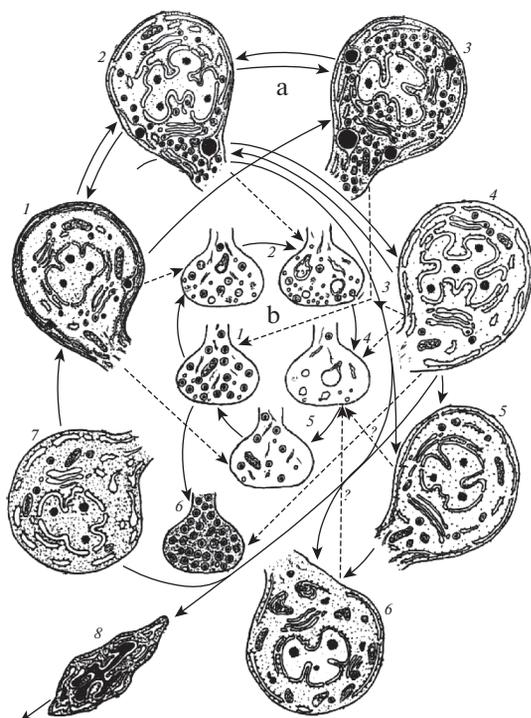


Рис. 3. Схема секреторного цикла НСК в дольчатой части преоптического ядра (а) и экстракционного цикла нейросекреторных терминалей в нейрогипофизе рыб (б) [14]. Фазы секреторного цикла: I типа НСК: 1 – низкая или умеренная активность, 2 – высокая активность, 3 – депонирование нейросекреторного материала, 4 – гиперактивность, 5 – репарация органоидов, 6 – массовая деградация органоидов; II типа НСК: 7 – покой или глубокое торможение функций; III типа НСК: 8 – дегенерация (у горбуши не выявлено). Фазы экстракционного цикла нейросекреторных терминалей: 1 – депонирование элементарных нейросекреторных гранул; 2 – начало выведения нейрогормонов; 3 – активное выведение нейрогормонов; 4 – истощение после выведения нейрогормонов; 5 – накопление нейросекреторных гранул; 6 – переполнение полиморфными секреторными гранулами – темные нейросекреторные терминали. Прерывистыми стрелками соединены перикарионы НСК с терминалями их аксонов.

2. Состояние висцеротропной активности ГГНС отражает активное действие нонапептидных нейрогормонов на висцеральные органы-мишени. Такая активация функций ГГНС на уровне организма характеризуется опустошением нейрогипофиза от нейросекреторного материала, происходит активное выведение нейросекреторных продуктов из нейрогипофиза в общий кровоток (рис. 1: III).

Показано, что исходным определяющим (детерминирующим) звеном, общим для разных сезонов миграций, является состояние нейротропной активности ГГНС. Ведущим морфофункциональным механизмом такого состояния ГГНС в начале миграций является продолжительная активация синтеза нейросекреторных продуктов в НСК из преоптического ядра и их транспорт в ликвор моз-

га. Транспорт осуществляется: 1) из апикальной части перикарионов НСК в области их сомато-вентрикулярных нейросекреторных контактов (рис. 1: I, 2b), 2) в нейрогипофизе из тел Герринга в области аксо-вентрикулярных нейросекреторных контактов (рис. 2d), 3) из дендритов НСК в области дендро-вентрикулярных нейросекреторных контактов.

В начале речного периода нерестовой миграции в нейрогипофизе из терминалей аксонов нонапептидные нейрогормоны выводятся только трансовентрикулярным путем (рис. 1: I). Это может свидетельствовать о “переключении” воздействия нонапептидных нейрогормонов с висцеротропного на нейротропное, эволюционно более древнее воздействие на ЦНС (на рис 1: с III на I) [23]. Показано, что вазотоцин и в меньшей степени изотоцин в виде “нерестового рефлекса” вызывают эффект возбуждения ЦНС у костистых рыб в момент нереста [11, 30–32]. Нонапептидные нейрогормоны активно воздействуют на центры регуляции поведения лимбической системы мозга, расположенные в амигдальных и гиппокампальных областях [11, 31–36]. Рецепторы вазотоцина (у *Teleostei* и *Tetrapods*) обнаружены в отделах мозга, ответственных за проявления социальных и сексуальных форм поведения, включая некоторые “критические области”, обозначенные как “сеть социального поведения” или “социальная сеть принятия решений” (“*Social Behavior Network*”, “*Social Decision-Making Network*”) (26, 31–33]. Общей основой этих разнообразных нейротропных эффектов воздействия нонапептидных нейрогормонов, по-видимому, является доминирующее состояние возбуждения ЦНС [36–38].

Синхронный (с нейротропным) эффект нарушения участия нонапептидных нейрогормонов в обеспечении нормального (для среды нагула), длительно адаптированного уровня водно-солевого баланса организма является второй важной частью комплексного механизма миграционного импульса. Важную роль в механизме изменения водно-солевого гомеостаза (с гипоосмотического типа осморегуляции на гиперосмотический) в период анадромных нерестовых миграций выполняет вазотоцин [10, 11, 42]. Экспериментально установлена температурная зависимость осмотически индуцированной активации синтеза вазотоцина в НСК из преоптического ядра у кеты в морской период нерестовой миграции [43]. В процессе нерестовых миграций и нереста у проходных рыб, особенно у лососевых, в связи с изменениями солёности внешней среды происходит оводнение мышц, свидетельствующее о нарушении механизмов водно-солевого обмена [10, 17, 42]. Установлено также наличие двух различных рецепторов (типа V_1) на хлорид-секретирующих клетках респираторного эпителия жабр костистых рыб, и сделано заключение об участии вазотоцина и изотоцина в регуляции

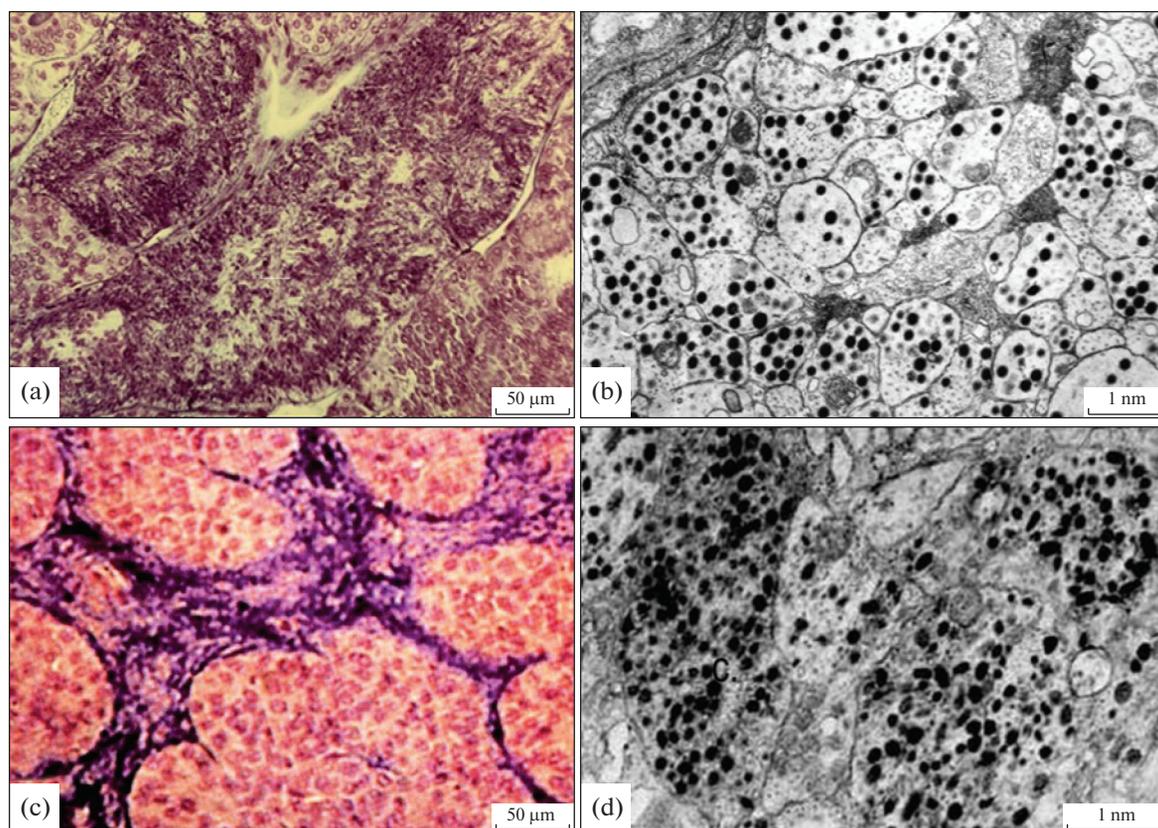


Рис. 4. Состояние нейрогипофиза севрюги (а), осетра (б) и горбуши (с, d) в начале речной нерестовой миграции (IV стадия зрелости гонад) характеризуется накоплением нейросекреторного материала. На светооптическом уровне (а, с) в корнях нейрогипофиза наблюдаются скопления гомори-положительного нейросекреторного материала, капилляры спавшиеся (окраска паральдегид фуксин + азан по Гейденгайну (ок. $\times 10$, об. $\times 20$). На электронно микроскопическом уровне (б, d) в нейросекреторных терминалах преобладают элементарные нейросекреторные гранулы, содержание остаточных гранул и синаптических пузырьков минимально. Темные нейросекреторные терминалы, переполненные полиморфными нейросекреторными гранулами (тип б), наблюдаются вблизи перикапиллярного пространства (d).

ионного баланса организма через жаберный кровоток [44–46]. Таким образом, физиологическим стимулом, определяющим необходимость смены среды обитания, оказывается вызванный ГГНС двойной синхронный эффект, который заключается в иницировании стойкого возбуждения “поведенческих” центров ЦНС в форме “миграционного импульса” и в нарушении длительно адаптированного водно-минерального обмена – “нагульного” гипотонического типа осморегуляции и ионного баланса.

Третьим синхронным эффектом, вызванным снижением висцеротропной активности ГГНС в период нерестовой миграции рыб, является прекращение антигонадотропного действия нонапептидных нейрогормонов. Это действие у костистых рыб осуществляется путем: 1) прямого ингибирования секреции гонадолиберина или люлиберина при синергизме нонапептидных нейрогормонов с дофамином, 2) стимуляции секреции адренокортикотропина в аденогипофизе (при синергизме с кортиколиберином), 3) путем тормозящего влия-

ния на эндокринные и генеративные функции гонад, т.е. на всех уровнях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси нейроэндокринных взаимоотношений [5, 11, 33, 47]. В некоторых гонадолиберинергических НСК из вентральной мелкоклеточной части преоптического ядра у костистых рыб показано наличие двух форм гонадолиберина (лосося и цыпленка) и установлено, что они модулируют электрическую активность вазотоцинергических НСК [5, 48, 49]. Предполагается, что секреторная активность нонапептидных нейрогормонов (преимущественно вазотоцина) с тропными гормонами аденогипофиза обеспечивают сложные механизмы их влияния на репродуктивные процессы, стресс и “метаболические регуляторные пути” [6, 11]. Более того, многолетними сравнительными испытаниями эффективности гонадостимулирующего действия препаратов гипофиза и его изолированных передней и задней долей на половое созревание самок осетра, севрюги и ротана-головешки (*Perccottus glenii*) было установлено, что нонапептидные нейрогормоны в

дозах, близких к физиологическим, тормозят, либо нарушают процесс овуляции, а их повышенные и запредельные дозы вызывают четкий антигонадо-тропный эффект. При этом длительная задержка процессов овуляции и резорбции половых продуктов производителей рыб в солоноватой среде “критической” солености (4–8‰) при нерестовых температурах также является эффектом повышенного содержания нонапептидных нейрогормонов в крови. Таким образом, ГГНС одновременно с пусковым нейротропным действием нонапептидных нейрогормонов в форме “миграционного импульса” участвует в запуске активации функций всех звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси нейроэндокринных взаимоотношений.

Вазотоцин- и изотоцинергические рецепторы (типа V_1) выявлены во многих органах рыб: гипофизе, почке, печени, яичнике, жабрах, сердце, мышцах, селезенке, боковой линии, мочевом пузыре, кишечнике [34, 41, 50]. Вазотоцин может напрямую участвовать в регуляции углеводного обмена, поскольку в гепатоцитах рыб имеются его рецепторы (V_1), и было установлено, что нонапептидные нейрогормоны стимулируют гликогенолиз в печени форели и угря [11, 51]. Поэтому мы предполагаем, что именно этот (третий) метаболический эффект, генерализованный и пролонгированный, является ведущим физиологическим механизмом смены пластического “нагульного” обмена на энергетический репродукционный: миграционный и нерестовый [52].

Дальнейшие навигационные механизмы миграций обеспечиваются тесным взаимодействием ГГНС и люлиберинергических нейросекреторных центров, и ведущее значение каждого из них динамично меняется соответственно их функциональной роли в разные периоды этапа размножения [33, 53]. При этом эффект доминантного состояния возбуждения ЦНС “миграционный импульс” возможно и является триггером, включающим филогенетические навигационные механизмы видоспецифического воздействия геомагнитных полей на рецепторные системы и ЦНС, которые еще мало изучены [7, 15, 16]. В осуществлении чисто навигационных процессов: “ольфакторных” импринтинга и хоминга основную роль выполняют люлиберинергические (или гонадолиберинергические) нейросекреторные формации [5, 54, 55] (рис. 1). У рыб они представлены диффузными мелкоклеточными нейросекреторными скоплениями, которые локализованы вблизи обонятельных и зрительных структур мозга [24, 56] (рис. 1b): 1) – в ганглии терминального нерва между обонятельными луковицами и передним мозгом (*Nucleus olfactorius*) вблизи сосудистого органа концевой пластинки (СОКП, *organum vasculosum laminae terminalis*) – “NOR”; 2) – в переднем перивентрикулярном ядре (*N. anterior periventricularis*) в преоптической обла-

сти – “NAP”; 3) – в области латерального ядра серого бугра гипоталамуса, в его передней части (*N. lateralis tuberis anterior*) – “NLT”, а также в области покрышки среднего мозга (*tegmentum*) у костистых рыб – “T”. Дифференцированное участие люлиберина установлено в разные периоды развития и размножения позвоночных [46, 58, 59]. Предполагается, что уже при переходе на активное питание у личинок рыб (кижуча и осетра) формируется импринтинг [7, 57]. Различия в динамике синтетической активности люлиберинергических НСК выявлены у мигрирующих на нерест нерки и кеты. Усиление синтеза в НСК из области обонятельного нерва (в NOR) происходит во время миграции рыб в низовьях рек, а смещение пика активности синтеза в преоптическую область (NAP) наблюдается в период нереста на нерестилищах [7, 55]. Установлено, что в соответствии с биологической значимостью хемо- и фоторецепции гонадолиберин, синтезируемый НСК в области обонятельного нерва, участвует в “навигационных” процессах импринтинга и хоминга, а синтезируемый в преоптической области обеспечивает процессы полового созревания и нереста (III–V стадии зрелости гонад).

Таким образом, нонапептидергическая ГГНС выполняет ключевую роль в детерминации миграционного (социального) поведения, вызывая физиологический эффект, инициирующий нерестовые миграции рыб в форме “миграционного импульса”. Этот комплексный генерализованный и пролонгированный (“целенаправленный”) эффект – нейротропный, висцеротропный и метаболический – заключается в синхронном возбуждении поведенческих центров ЦНС, нарушении длительно адаптированного “нагульного” типа осмотической и ионной регуляции и перевода организма на энергетический, энергозатратный обмен путем снижения или прекращения антигонадо-тропного действия нонапептидных нейрогормонов. Причем доминантное состояние возбуждения ЦНС определяет последующие специализированные навигационные механизмы хоминга, геомагнитной и ольфакторной природы.

Одна из ведущих функций ГГНС заключается в генерализованном и пролонгированном действии ее нонапептидных нейрогормонов на органы-мишени, на которые они в малых дозах оказывают стимулирующее действие, а в больших – тормозящее [9]. Физиологически дозированная секреция нонапептидных нейрогормонов и их функционально дифференцированные, специализированные пути выведения определяют их альтернативные влияния – нейротропное и висцеротропное, особенно метаболическое, генерализованное и пролонгированное [3, 11]. Таким образом, функциональная роль ГГНС в осуществлении процесса миграции рыб заключается в инициировании (запуске стартовых) миграционных механизмов в

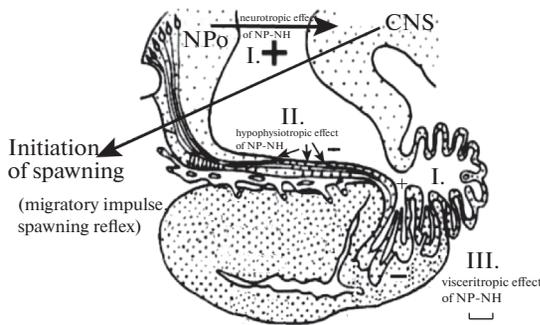


Рис. 5. Основные пути нейроэндокринной регуляции процесса нерестовой миграции и принцип участия гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы в иницировании размножения рыб. Пути выведения нонапептидных нейрогормонов:

I – трансвентрикулярный путь (нейротропный эффект), **II** – трансаденогипофизарный путь (аденогипофизотропный эффект), **III** – парааденогипофизарный путь: (висцеротропный эффект). Обозначения: NPo – преоптическое ядро, CNS – центральная нервная система, NP-NH – нонапептидные нейрогормоны.

форме “миграционного импульса”, комплексным синхронным эффектом возбуждения поведенческих центров в ЦНС, изменением осмотического равновесия, сменой пластического обмена на энергетический. В детерминации специализированных навигационных форм миграционного поведения важную роль играет сочетание поведенческих эффектов нонапептидных нейрогормонов, люлиберина, половых гормонов и комплекса энергозатратных нейротропных процессов, составляющих “сексуальную доминанту” [9]. Весь указанный механизм является основной причиной прогрессивного снижения степени эврибионтности проходных рыб в процессе нерестовых миграций и нереста как формы проявления биоэнергетического закона [4, 14].

Следует подчеркнуть, что важнейшие защитно-приспособительные реакции организма в целом направлены на сохранение постоянства его внутренней среды и в этом механизме функциональная роль ГГНС в поддержании водно-солевого гомеостаза имеет важнейшее значение. В эволюционно-морфологическом и эколого-физиологическом аспектах изучения миграционных механизмов особую важность имеют результаты опытов с “критической” соленостью 4–8‰ как пороговой среды важнейшего филогенетического значения. Критическая соленость является границей для созревания гамет морских и пресноводных организмов и, разделяя эти фауны, она определяет пределы физиологической устойчивости, важнейшие пороги, границы и градиенты их взаимоотношений с внешней средой [60]. Анализ состояния ГГНС у производителей рыб в этой среде, пороговой при миграциях, показал ее умеренную активацию, что в ре-

зультате стимулирующего влияния малых количеств нонапептидергических нейрогормонов на функциональную активность эндокринных желез, вызывает эустресс с целым рядом положительных биостимулирующих эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ГГНС в миграции рыб выполняет ведущую роль в качестве центрального нейроэндокринного звена механизма реверсии метаболизма – переводе организма с пластического типа обмена на энергетический. На основе применения метода “перекрестного” сопоставления экологически сходных, но генетически отдаленных форм (и наоборот), для выявления микро- и макроэволюционных механизмов и сопоставительного анализа собственных и литературных данных мы установили общность этого пускового адаптационного механизма у осетровых и лососевых. Его генерализованное действие имеет пролонгированный характер и выполняет детерминирующую роль в осуществлении процесса миграции рыб. Это позволяет рассматривать его как важнейшую филогенетическую адаптацию на уровне ароморфоза, направленную на достижение биологического прогресса вида [4]. Следствием этого основного механизма является последующий навигационный механизм хоминга высокой популяционной пластичности и, с учетом наличия стрейнга у проходных рыб, его можно рассматривать как специализацию микроэволюционного происхождения. Ведущий механизм участия ГГНС в осуществлении нерестовых миграций рыб представлен на рис. 5.

Таким образом, участие ГГНС в иницировании и регуляции миграционных процессов подтверждает гипотезу профессоров Н.Л. Гербильского и А.Л. Поленова о природе “миграционного импульса”.

Основной механизм участия и функциональная роль ГГНС в осуществлении размножения рыб как важнейшего для вида этапа онтогенеза могут быть раскрыты на основе эколого-гистофизиологического анализа ее участия также и в процессе нереста. Последующее обобщение результатов позволит представить их эволюционную значимость, определить перспективы и пути управления всеми этапами размножения и, в итоге, разработать их конкретные биотехнологические решения как завершение полносистемного исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Постановка и проведение экспериментов, сбор материала – П.Е.Г., В.В.К., электронная микроскопия – П.Е.Г., световая микроскопия – В.В.К., написание текста рукописи и редактирование – П.Е.Г., В.В.К., обзор публикаций по теме статьи – П.Е.Г., В.В.К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blazquez M, Bosma PT, Frazer EJ, Van Look KJW, Trudeau VL* (1998) Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Compar Biochem Physiol* 119: 345–364. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00023-1)
2. *Bolis CL, Piccolella M, Dalla Valle AZ, Rankin JC* (2001) Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacol Res* 44: 265–280. <https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0845>
3. *Garlov PE* (2005) Plasticity of nonapeptidergic neurosecretory cells in fish hypothalamus and neurohypophysis. *Int Rev Cytol* 245: 123–170. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)45005-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)45005-6)
4. Гербильский НЛ (1965) Биологическое значение и функциональная детерминация миграционного поведения рыб. В сб Биологическое значение и функциональная детерминация миграционного поведения животных. Наука 23–32. [Gerbil'sky NL (1965) Biological significance and functional determination of migratory behavior of fish. In *Biological significance and functional determination of fish migratory behavior*. Nauka 23–32. (In Russ). https://www.alib.ru/au/-nm-biologicheskoe_znachenie_funkcionalnaya_determinatsiya_migr
5. *Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O* (2010) Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165 (3): 438–455. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.017>
6. *Zohar Y* (2020) Fish reproductive biology – Reflecting on five decades of fundamental and translational research. *Gen Comp Endocrinol* 300: 113544. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113544>
7. *Ueda H* (2012) Physiological mechanisms of imprinting and homing migration in Pacific salmon *Oncorhynchus* spp. *J Fish Biol* 81 (2): 543–558. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03354.x>
8. *Blanco AM* (2020) Hypothalamic- and pituitary-derived growth and reproductive hormones and the control of energy balance in fish. *Gen Comp Endocrinol* 287: 113322. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113322>
9. *Поленов АЛ, Константинова МС, Гарлов ПЕ* (1993) Гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс. Основы современной физиологии (нейроэндокринология). Наука кн. 1 ч. 1: 139–187. [Polenov AL, Konstantinova MS, Garlov PE (1993) Hypothalamic-hypophysial neuroendocrine complex. *Fundamentals of modern physiology (neuroendocrinology)*. Nauka K1 C 1: 139–187. (In Russ)].
10. *Warne JM, Harding KE, Balment RJ* (2002) Neurohypophysial hormones and renal function in fish and mammals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132: 231–237. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00527-9](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00527-9)
11. *Balment RJ, Lu W, Weybourne E, Warne JM* (2006) Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: a review with insights from mammalian models. *Gen Comp Endocr* 147(1): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.022>
12. *Яковлева ИВ* (2000) Нейроэндокринологические аспекты раннего онтогенеза круглоротых и рыб. СПб. ООО Петрополис. [Yakovleva IV (2000) Neuroendocrinological aspects of early ontogenesis of cyclostomata and fish. SPb. ООО Petropolis. (In Russ)]. <https://www.libex.ru/detail/book444313.html>
13. *Баранникова ИА* (1975) Функциональные основы миграций рыб. Наука. СПб. [Barannikova IA (1975) Functional bases of fish migrations. Nauka. Spb]. (In Russ)].
14. *Гарлов ПЕ, Кузик ВВ* (2008) Нейроэндокринная регуляция размножения рыб. Аграф. СПб. [Garlov PE, Kuzik VV (2008) Neuroendocrine regulation of fish reproduction. Agraf. SPb. (In Russ)].
15. *Lohmann KJ, Putman NF, Lohmann CM* (2008) Geomagnetic imprinting: A unifying hypothesis of long-distance natal homing in salmon and sea turtles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (49): 19096–19101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801859105>
16. *Putman NF, Jenkins ES, Michielsens CG, Noakes DL* (2014) Geomagnetic imprinting predicts spatio-temporal variation in homing migration of pink and sockeye salmon. *J Royal Soc Interf* 11 (99): 1–10. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0542>
17. *Makino K, Onuma TA, Kitahashi T, Ando H, Ban M, Ura-no A* (2007) Expression of hormone genes and osmoregulation in homing chum salmon: a minireview. *Gen Comp Endocr* 152 (2): 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.010>
18. *Ueda H* (2019) Sensory mechanisms of natal stream imprinting and homing in *Oncorhynchus* spp. *J Fish Biol* 95: 293–303. <https://doi.org/10.1111/jfbb.13775>
19. *Микодина ЕВ, Седова МА, Чмилевский ДА, Микулин АЕ, Пьянова СВ, Полуэктова ОГ* (2009) Гистология для ихтиологов. Опыт и советы ВНИРО: 112. [Mikodina EV, Sedova MA, Chmilevsky DA, Mikulin AE, Pyanova SV, Poluektova OG (2009) Histology for ichthyologists. Experience and advice. VNIRO: 112. (In Russ)].
20. *Херуэт ЭР, Гаттер КС* (1999) Молекулярная клиническая диагностика. М. Мир. 20–65. [Heriot ER, Gutter KS (1999) Molecular clinical diagnostics. M. Mir. 20–65. (In Russ)].
21. *Миронов АА, Комиссарчик ЯЮ, Миронов ВА* (1994) Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Наука. [Mironov AA, Komissarchik YU, Mironov VA (1994) Methods of electron microscopy in biology and medicine. Nauka. (In Russ)].

22. Griffiths (2004) The Use of Electron Microscopy in Cell Biology. MCB: 68.
23. Polenov AL, Garlov PE (1971) The hypothalamo-hypophysial system in Acipenseridae. I. Ultrastructural organization of large neurosecretory terminals (Herring bodies) and axoventricular contacts. *Z Zellforsch* 116: 349–374.
24. Parhar IS, Satoshi O, Tomohiro H, Yasuo S (2003) Single-Cell Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction of Immunofluorescently Identified Neurons of Gonadotropin-Releasing Hormone Subtypes in Cichlid Fish. *Endocrinology* 144 (8): 3297–3300. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0386>
25. Ota Y, Ando H, Ban M, Urano A (1996) Sexually different expression of neurohypophysial hormone genes in the preoptic nucleus of pre-spawning chum salmon. *Zool Sci* 13 (4): 593–601. <https://doi.org/10.2108/zsj.13.593>
26. Urano A, Ando H (2003) Quantitative analyses of the levels of hormonal mRNAs in the salmon neuroendocrine system. *Aquatic Genomics*. Springer. Tokyo. 225–235. https://doi.org/10.1007/978-4-431-65938-9_20
27. Hiraoka S, Ando H, Ban M, Ueda H, Urano A (1997) Changes in expression of neurohypophysial hormone genes during spawning migration in chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *J Mol Endocrinol* 18: 49–55. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0180049>
28. Гарлов ПЕ, Поленов АЛ (1996) Функциональная цитоморфология преоптико-гипофизарной нейросекреторной системы рыб. *Цитология* 38 (3): 275–299. [Garlov PE, Polenov AL (1996) Functional cytomorphology of the preoptico-hypophysial neurosecretory system of fish. *Cytology* 38 (3): 275–299. (In Russ)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=14933591>
29. Polenov AL, Pavlovich M, Garlov PE (1972) Preoptic Nucleus and Neurohypophysis in Sturgeons (*Acipenser güldenstädti* Brandt) at Different stages of their Life Cycle and in experiments. *Gen Compar Endocrinol* 18: 617. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(72\)90040-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(72)90040-8)
30. Goodson JL, Bass AH (2001) Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res Rev* 35: 246–265. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00043-1)
31. Godwin J, Thompson R (2012) Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm Behav* 61: 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.12.016>
32. Munakata A, Kobayashi M (2010) Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165(3):456–468. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.011>
33. Foran CM, Bass AH (1999) Preoptic GnRH and AVT: axes for sexual plasticity in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 116: 141–152. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7357>
34. Gozdowska M, Kleszczyńska A, Sokołowska E, Kulczykowska E (2006) Arginine vasotocin (AVT) and isotocin (IT) in fish brain: diurnal and seasonal variations. *Comp Biochem Physiol* 143: 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.12.004>
35. Maximino C, Lima MG, Oliveira KR, Batista E de J, Herculano AM (2013) “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: a review of the evidence. *J Chem Neuroanat* 48–49: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.10.001>
36. Rodriguez-Santiago M, Nguyen J, Winton LS, Weitekamp CA, Hofmann HA (2017) Arginine Vasotocin Preprohormone Is Expressed in Surprising Regions of the Teleost Forebrain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14(8):195. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00195>
37. Almeida O, Oliveira RF (2015) Social Status and Arginine Vasotocin Neuronal Phenotypes in a Cichlid Fish. *Brain Behav Evol* 85(3):203–213. <https://doi.org/10.1159/000381251>
38. Greenwood AK, Wark AR, Fernald RD, Hofmann HA (2008) Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proc Biol Sci* 275(1649):2393–2402. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0622>
39. Newman SW (1999) The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann NY Acad Sci* 877: 242–257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>
40. Lema SC (2010) Identification of multiple vasotocin receptor cDNAs in teleost fish: sequences, phylogenetic analysis, sites of expression, and regulation in the hypothalamus and gill in response to hyperosmotic challenge. *Mol Cell Endocrinol* 321(2): 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.02.015>
41. O’Connell LA, Hofmann HA (2012) Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science* 336(6085): 1154–1157. <https://doi.org/10.1126/science.1218889>
42. Kulczykowska E (2007) Arginine vasotocin and isotocin: towards their role in fish osmoregulation. *Fish Osmoregulation* (Enfield, NH: Sci Publ): 151–176. <https://doi.org/10.1201/9780429063909-6>
43. Saito D, Ota Y, Hiraoka S, Hyodo S, Ando H, an Urano K (2001) Effect of Oceanographic Environments on Sexual Maturation, Salinity Tolerance, and Vasotocin Gene Expression in Homing Chum Salmon. *Zool Sci* 18 (3): 389–396. <https://doi.org/10.2108/zsj.18.389>
44. Olson KR (2002) Gill circulation: regulation of perfusion distribution and metabolism of regulatory molecules. *J Exp Zool* 293: 320–335. <https://doi.org/10.1002/jez.10126>
45. Marshall WS (2003) Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration fresh water exposures. *Biochim Biophys Acta (BBA)—Biomembranes* 1618: 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.015>
46. Guibbolini ME, Avella M (2003) Neurohypophysial hormone regulation of Cl⁻ secretion: evidence for V receptors in sea bass gill respiratory cells in culture. *J Endocrinol* 176(1): 111–119. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1760111>

47. *Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Fasano S* (2002) Evolutionary aspects of cellular communication in the vertebrate hypothalamo-hypophysio-gonadal axis. *Internat Rev Cytol* 218: 69–141. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(02\)18012-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(02)18012-0)
48. *Saito D, Hasegawa Y, Urano K* (2003) Gonadotropin-releasing hormone modulate electrical activity of vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout. *Neurosci Lett* 351: 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.08.017>
49. *Hasunuma I, Toyoda F, Okada R, Yamamoto K, Kadono Y, Kikuyama S* (2013) Roles of arginine vasotocin receptors in the brain and pituitary of submammalian vertebrate. *Int Rev Cell Mol Biol* 304: 191–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407696-9.00004-X>
50. *Gozdowska M, Ślebioda M, Kulezykowska E* (2013) Neuropeptides isotocin and arginine vasotocin in urophysis of three fish species. *Fish Physiol Biochem* 39: 863–869. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-012-9746-6>
51. *Guibbolini ME, Pierson PM, Lahlou B* (2000) Neurohypophysial hormone receptors and second messengers in trout hepatocytes. *J Endocrinol* 167: 137–144. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1670137>
52. *Shahjahan Md, Kitahashi T, Parhar IS* (2014) Central pathways integrating metabolism and reproduction in teleosts. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:36. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00036>
53. *Rose JD, Moore FL* (2002) Behavioral neuroendocrinology of vasotocin and vasopressin and the sensorimotor processing hypothesis. *Neuroendocrinology* 23: 317–341. [https://doi.org/10.1016/S0091-3022\(02\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0091-3022(02)00004-3)
54. *Soma KK, Francis RC, Wingfield JC, Fernald RD* (1996) Androgen regulation of hypothalamic neurons containing gonadotropin-releasing hormone in a cichlid fish – integration with social cues. *Horm Behav* 30 (3): 216–226. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0026>
55. *Kudo H, Hyodo S, Ueda H, Hiroi O, Aida K, Urano A, Yamauchi K* (1996) Cytophysiology of gonadotropin-releasing-hormone neurons in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) forebrain before and after upstream migration. *Cell Tiss Res* 284 (2): 261–267. <https://doi.org/10.1007/s004410050586>
56. *Anglade J, Landbergen T, Kah O* (1993) Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273 (2): 345–355. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23885385>
57. *Ueda H* (2011) Physiological mechanism of homing migration in Pacific salmon from behavioral to molecular biological approaches. *Gen Comp Endocrinol* 170(2):222–232. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.02.003>
58. *Onuma TA, Makino K, Ando H, Ban M, Fukuwaka MA, Azumaya T, Urano A* (2010) Expression of GnRH genes is elevated in discrete brain loci of chum salmon before initiation of homing behavior and during spawning migration. *Gen Comp Endocrinol* 168(3): 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.05.001>
59. *Boiko NE* (2003) Hexachloran and oil contaminations alters memorisation of odors in sturgeon, *Acipenser güldenstädtii* Brandt. *J Envir Protect Ecol* 4 (1): 134–140.
60. *Хлебович ВВ* (1974) Критическая соленость биологических процессов. Наука. [Khlebovich VV (1974) Critical salinity of biological processes. Nauka. (In Russ)].

THE INVOLVEMENT AND FUNCTIONAL ROLE OF THE FISH NONAPEPTIDERGIC PREOPTICO-HYPOPHYSEAL NEUROSECRETORY SYSTEM IN SPAWNING MIGRATIONS

P. E. Garlov^a and V. V. Kuzik^{b,#}

^a *St. Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg, Russia*

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

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

The involvement of the preoptico- or hypothalamo-hypophyseal neurosecretory system (HHNS) in the initiation of migration processes in fish has been discovered, based on the results of ecologo-histophysiological studies using light microscopy, immunohistochemistry, electron microscopy and morphometry, thus confirming the hypothesis proposed by N.L. Gerbilsy and A.L. Polenov about the nature of the “migratory impulse” in fish. It has been demonstrated for the first time that in genetically distant but ecologically similar anadromous migratory fish species with different breeding seasons (spring-spawning Russian sturgeon, stellate sturgeon, and fall-spawning pink salmon), the synthesis of neurosecretory products is activated in neurosecretory cells at the beginning of the migration process, followed by their transport and accumulation in the neurohypophysis. At the same time, neurosecretory products have been shown to be secreted into the cerebrospinal liquid of the 3rd ventricle. Thus, the HHNS has a complex synchronous effect, which consists in (1) the neurotropic action of nonapeptide neurohormones on behavioral centers of the central nervous system (CNS), causing a dominant state of CNS excitation originally called “the migratory impulse”, (2) osmoregulatory disadaptation during the marine feeding period, and (3) the cessation of the known antagonotropic action of nonapeptide neurohormones, thus promoting the transition of an organism to an energy-intensive type of energy metabolism. A comparative anal-

ysis of our own and literature data confirms the community of this metabolic mechanism in fish, thus allowing it to be considered as the most important phylogenetic adaptation (aromorphosis) aimed at achieving biological progress of species. A leading role in the subsequent navigational mechanisms of homing, widely covered in the world literature, is played by the luberinernergic centers of the hypothalamus. The ecological diversity of these mechanisms at the population level and the presence of straying in fish allow considering them as microevolutionary specializations. Further analysis of HHNS functions during fish migration and spawning will help establish the basic principle of integration of these processes at the given ontogenetic stage, which is of prime importance for the existence of species.

Keywords: fish, hypothalamo-hypophyseal neurosecretory system, neuroendocrine regulation, fish migration