СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 6, 2021

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

обзоры

Метаболическая пластичность астроцитов

| Я.В.Горина, А.Б. Салмина, А.И. Ерофеев, Чжао Цань, А.В.Большакова, П.М.Балабан, И.Б.Безпрозванный, О.Л.Власова | 453 |
|---|-----|
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ | |
| Влияние вазопрессина на коллагеназную активность клеток папиллярной зоны почек крыс | |
| С. Г. Дзгоев | 469 |
| Индикаторы устойчивости к гипоксии, определяемые по клеточным элементам крови крыс | |
| М. В. Кондашевская, К. А. Артемьева, В. В. Алексанкина, Н. Б. Тихонова, М. Н. Болтовская | 475 |
| Влияние Na ⁺ на нагруженные кальцием митохондрии сердца крысы и миокард лягушки | |
| С. М. Коротков, К. В. Соболь, И. В. Шемарова, В. П. Нестеров | 484 |
| Ультраструктура ядрышек нейронов сенсомоторной области неокортекса крыс в неонатальный период после воздействия перинатальной гипоксии и фармакологической коррекции | |
| В. А. Отеллин, Л. И. Хожай, Т. Т. Шишко, Е. А. Вершинина | 494 |
| Электрическая активность идентифицированных нейронов ЦНС моллюска Lymnaea stagnalis в условиях острой гипергликемии | |
| А. В. Сидоров, В. Н. Шаденко | 500 |
| ВлияниЕ D-серина на тревожно-подобное поведение и способность к пространственному обучению крыс линии ГК, селекционированных на предрасположенность к кататоническим реакциям | |
| О. И. Прокудина, Т. А. Алехина | 510 |
| Влияние последствий гипоксических воздействий в разные периоды эмбриогенеза, на электрическую активность слуховой коры в первый месяц постнатального развития кроликов | |
| А. Г. Гусейнов | 519 |
| Элементный состав гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф двустворчатого моллюска <i>Mytilus Galloprovincialis</i> Lam. | |
| Л. Л. Капранова, В. И. Рябушко, С. В. Капранов, В. Н. Лишаев, М. В. Нехорошев | 532 |

_

-

Vol. 57, No. 6, 2021

Metabolic Plasticity of Astrocytes

REVIEWS

| Y. V. Gorina, A. B. Salmina, A. I. Erofeev, Zhao Can, A. V. Bolshakova, P. M. Balaban, I. B. Bezprozvanny, O. L. Vlasova | 453 |
|---|-----|
| EXPERIMENTAL ARTICLES | |
| Effect of vasopressin on collagenase activity of rat renal papillary cells | |
| S. G. Dzgoev | 469 |
| Indicators of hypoxia tolerance are determined by the cells of rat blood | |
| M. V. Kondashevskaya, K. A. Artemieva, V. V. Aleksankina, N. B. Tikhonova, M. N. Boltovskaya | 475 |
| Nucleolar ultrastructure in neurons of the rat neocortical sensorimotor area during the neonatal period after perinatal hypoxia and its pharmacological correction | |
| V. A. Otellin, L. I. Khozhai, T. T. Shishko, E. A. Vershinina | 484 |
| Effect of sodium ions on calcium-loaded rat heart mitochondria and frog myocardium | |
| S. M. Korotkov, C. V. Sobol, I. V. Shemarova, V. P. Nesterov | 494 |
| Electrical Activity of Identified Neurons in the Central Nervous System of a Mollusk Lymnaea stagnalis under Acute Hyperglycemia | |
| A.V. Sidorov, V. N. Shadenko | 500 |
| Effect of D-serine on Anxiety-Like Behavior and Spatial Learning Ability of GC Rats Selected for the Predisposition to Catatonic Reactions | |
| O. I. Prokudina, T. A. Alekhina | 510 |
| The Impact of Hypoxic Exposures at Different Stages of Prenatal Development on Electrical Activity of the Rabbit Auditory Cortex in the First Month of Postnatal Life | |
| A. G. Guseynov | 519 |
| Elemental composition of gonads, gametes and larvae in the black and brown morphs of the bivalve mollusk <i>Mytilus Galloprovincialis</i> Lam. | |
| L. L. Kapranova, V. I. Ryabushko, S. V. Kapranov, V. N. Lishaev, M. V. Nekhoroshev | 532 |

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 6, с. 453-468

———— ОБЗОРЫ ————

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ АСТРОЦИТОВ

© 2021 г. Я. В. Горина^{1,2,*}, А. Б. Салмина^{1,2,3}, А. И. Ерофеев¹, Чжао Цань¹, А. В. Большакова¹, П. М. Балабан^{1,4}, И. Б. Безпрозванный^{1,5}, О. Л. Власова¹

A. D. DOJIBIIIAKOBA², II. IVI. DAJIAUAH³⁷, VI. D. DESIIPUSBAHHBIN³⁶, O. JI. DJIACOBA²

¹ Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии,

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия ³ Научный центр неврологии, Москва, Россия

паучный центр неврологии, москва, госсия

⁴ Институт высшей нервной деятельности, Москва, Россия

⁵ Отделение физиологии юго-западного медицинского центра Техасского университета, Даллас, США

*e-mail: yana_20@bk.ru

Поступила в редакцию 13.07.2021 г. После доработки 11.08.2021 г. Принята к публикации 12.08.2021 г.

Астроциты являются наиболее многочисленными глиальными клетками центральной нервной системы, расположенными между микрососудистой сетью головного мозга и синапсами нейронов, тем самым опосредуя поглощение питательных веществ из системного кровотока. Кроме того, астроциты, благодаря своему уникальному анатомическому расположению, обладают высокой ферментативной способностью к гликолизу, гликогенезу и метаболизму липидов, обеспечивая нейроны необходимыми питательными веществами в качестве источника энергии, что указывает о ключевой роли астроцитов в метаболизме мозга. Следовательно, нарушение функций астроглии может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний, при которых метаболические нарушения ускоряют повреждение нейронов. Принимая во внимание важную роль астроцитов в регуляции гомеостаза головного мозга и наличие тесной метаболической взаимосвязи с нейронами, в этом обзоре мы рассматриваем пластичность энергетического метаболизма астроцитов в физиологических условиях и ее влияние на функции мозга при развитии нейродегенеративных заболеваний. При этом понимание механизма, лежащего в основе метаболической пластичности астроцитов, даст возможность определить новые потенциальные диагностические биомаркеры и терапевтические мишени для коррекции нейродегенерации и возрастных дисфункций головного мозга.

Ключевые слова: астроциты, нейроны, пластичность, церебральный метаболизм, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S0044452921060036

Функция головного мозга зависит от сложных метаболических взаимодействий между различными типами нервных клеток, при этом астроциты и нейроны образуют комплекс, так называемые "симбиотические отношения" не только для поддержания нейрональных функций, но и метаболизма мозга в целом. За последнее десятилетие были выявлены ранее неожиданные функции астроцитов, во многом благодаря разработке новых инструментов, позволяющих их выборочное изучение in situ. Данные научные открытия дополняют большое количество доказательств, демонстрирующих, что астроциты играют центральную роль в гомеостазе головного мозга. Действительно, активность нейронов вызывает высвобождение вазоактивных веществ астроцитами, в частности, простагландинов, тем самым обеспечивая динамическую связь церебрального кровообращения с локальной потребностью в энергии [1–3].

На метаболическом уровне согласно модели "астроцит-нейрон-лактатного челнока", астроциты реагируют на глутаматергическую активацию, увеличивая скорость поглощения глюкозы и высвобождения лактата во внеклеточное пространство, что, в свою очередь, используется нейронами для поддержания энергетических потребностей [4, 5]. Также стоит отметить, что астроциты выполняют и другие гомеостатические функции, включая защиту от окислительного стресса, поддержание ионного гомеостаза, хранение энергии в виде гликогена, регенерацию тканей, модуляцию синаптической активности посредством высвобождения глиотрансмиттеров, формирование и ремоделирование синапсов [6–8]. Интересен и тот установленный факт, что астроциты помимо выше перечисленных функций, играют ранее неизвестную роль в регуляции продолжительности и глубины сна [9], консолидации памяти [10] и в регулировании дыхания [11].

В дополнение к этому, астроциты выделяют ряд веществ, а именно, аполипопротеин Е и холестерин [12], аскорбиновую кислоту [13], цитокины [14], глутатион [15], лактат [16], нейротрофические факторы и факторы роста [17], тромбоспондины [18], которые поддерживают функцию и жизнеспособность нейронов.

Важно отметить, что все эти процессы требуют затраты значительного количества энергии и зависят от связанных с энергией метаболических путей, тем самым указывая на существование прямой взаимосвязи между функциональной способностью астроцитов, энергией и метаболизмом.

Интересен и тот установленный факт, что астроциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток [19], которые имеют ряд существенных функциональных различий в зависимости от области мозга и стадии его развития, а также экспрессии различных рецепторов, переносчиков, ионных каналов и других белков [20]. Это подразумевает существование уникальной способности астроцитов в зависимости от типа участвовать в различных метаболических/гомеостатических функциях головного мозга.

Учитывая ключевую роль астроцитов в регуляции гомеостаза головного мозга и существование в этом контексте важного метаболического взаимодействия между нейронами и астроцитами, интересным для понимания является то, как метаболическая пластичность астроцитов влияет на функции мозга в физиологических условиях и при развитии нейродегенеративного заболевания.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПОТРЕБНОСТИ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

Головной мозг человека является тем уникальным органом, которому для согласованной и эффективной работы необходимо потребление значительного количества энергии. Поступление достаточного количества энергии особенно необходимо для надлежащего функционирования нейронов [21].

Ранее считалось, что более крупный головной мозг имеет более крупные нейроны, которые индивидуально потребляют больше энергии и, следовательно, окружены большим количеством глиальных клеток. Вопреки ожидаемому, было установлено, что средняя метаболическая активность нейрона среди шести видов грызунов и приматов (включая человека) относительно стабильна с незначительными вариациями, которые не коррелируют с размером и плотностью нейронов, а также размером головного мозга [22].

Важно отметить тот установленный факт, что большая часть этой энергии расходуется синапсами, поскольку изменение постсинаптического потенциала находится в прямой зависимости от наличия устойчивых ионных градиентов, в частности, высокого градиента Na⁺, который в свою очередь поддерживается активностью Na⁺/K⁺-АТФазы. Сохранение высокого градиента концентрации Na⁺ на клеточной мембране регулирует концентрацию других ионов, таких как Ca²⁺, Mg²⁺,

 H^+ , HCO_3^- и Cl^- , которые транспортируются или обмениваются с Na^+ для поддержания их физиологических уровней в клетках (или вне клеток). Высокая потребность в энергии является следствием большого количества нейронов, каждый из которых может иметь сотни или тысячи синапсов для передачи десятка или сотни нервных импульсов в секунду в заданный момент времени.

Как известно, вместе с эндотелиальными клетками и перицитами астроциты образуют гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – структуру, через которую осуществляется транспорт различных молекул и питательных веществ, а именно, глюкозы посредством переносчика GLUT [23], монокарбоксилатов (L-лактата) за счет монокарбоксилатных транспортеров (МСТ) [24] и жирных кислот через транслоказу жирных кислот [25]. Эти молекулы играют решающую роль в обмене энергетическими субстратами между кровью и паренхимой головного мозга. Таким образом, потребление энергии нейронами, которая необходима для поддержания электрических сигналов, стабильности внутриклеточной концентрации ионов и цикличности синаптических пузырьков, обеспечивается астроцитами [26].

Также необходимо отметить и тот факт, что далеко не каждая клетка головного мозга может быть обеспечена достаточным количеством энергии напрямую через капиляры [27].

Кроме того, необходимо учитывать, что между двумя кровеносными капиллярами может быть 3-6 слоев клеток, что требует других путей снабжения клеток энергией, в частности, "паренхиматозной диффузией". Однако данный процесс отличается значительной продолжительностью, чтобы обеспечить клетки достаточным количеством энергии. Как показал микроанатомический анализ, кровеносные капилляры, по которым доставляется глюкоза, в значительной степени покрыты отростками астроцитов [27], концевые расширения которых обеспечивают быстрое поглощение глюкозы. Фактически, в то время как концентрация глюкозы в кровеносных капиллярах составляет 3-6 мМ, в паренхиме головного мозга она может быть всего 0.5-1 мМ [28], это указывает на то, что значительное количество глюкозы предположительно поглошается астроцитами, прежде чем она попадает в паренхиму головного мозга. Поскольку глюкоза, эффективно поглощаемая облегченной диффузией, быстро фосфорилируется в клетках, всегда сушествует высокий градиент глюкозы в клетках, даже при внеклеточной концентрации 1 мМ и ниже. Это подразумевает, что нейроны, находящиеся на расстоянии десятков микрон от следующего кровеносного сосуда, могут поглощать глюкозу в значительных количествах. При этом важно отметить, что анатомическая особенность астроцитов, которые, как считается, требуют гораздо меньше энергии для физиологического функционирования, чем нейроны, может указывать об астроцит-нейрональном взаимодействии для поддержки энергоснабжения нейронов в условиях высокой потребности в энергии [29]. Это подразумевает, что астроциты передают часть энергетического материала, к которому они имеют исключительно прямой доступ, к нейронам и, следовательно, играют роль медиаторов для дополнительного снабжения нейронов энергией [26].

Таким образом, относительно эффективная обработка энергии головным мозгом зависит от метаболической пластичности астроцитов и типа нейроглиальных клеток, анатомически расположенных между нейронами и сложным разветвлением церебральных сосудов [30-32]. Следовательно, астроциты являются промежуточными структурными звеньями между кровеносными сосудами и нейронами, которые доставляют глюкозу из крови к нейронам, при этом выступая в качестве основных энергоемких элементов головного мозга. Поэтому вполне вероятно, возрастные или связанные с развитием заболевания, структурнофункциональные изменения астроцитов могут не только негативно повлиять на гомеостаз головного мозга, но и способствовать прогрессированию заболевания [33-35].

ЭВОЛЮЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Согласно выдвинутому предположению, высокие энергетические затраты на развитие человеческого мозга объясняются наличием такой отличительной черты человека от других приматов, как исключительно медленный и длительный рост до взрослого возраста. Для объяснения столь продолжительного жизненного этапа, который предшествует взрослому возрасту, были предложены ряд гипотез, исходя из которых головной мозг затрачивает дополнительное количество энергии и времени на процессы обучения и развитие мозга в течение жизни [36, 37]. Другие гипотезы были сосредона энергетических компромиссах точены И рассматривали замедленный рост как компенсацию высоких энергетических потребностей мозга

[38, 39], предполагая, что с точки зрения развития периоды наиболее медленного роста тела совпадают с пиковыми метаболическими потребностями мозга.

Так, установлено [40], что скорость поглощения глюкозы человеческим мозгом как в абсолютном выражении, так и по отношению к метаболическим расходам организма, достигает пика не при рождении, когда размер мозга по отношению к телу наибольший, а в детском возрасте, когда синаптическая пластичность и связанные с ней метаболические процессы максимальны, при этом потребность мозга в глюкозе обратно пропорциональна росту тела от младенчества до полового созревания. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что необычно высокие затраты на развитие человеческого мозга требуют компенсирующего замедления роста детского тела.

Наряду с указанными гипотезами было выдвинуто предположение, согласно которому человеческий род в процессе эволюции приобрел высокую скорость метаболизма, тем самым обеспечивая энергией больший мозг (по сравнению с другими приматами), а также высокую репродуктивную способность. В ходе одного исследования по проверке данной гипотезы [41] установлено, что общий расход энергии у человека превышал таковой у шимпанзе, горилл и орангутангов примерно на 400, 635 и 820 ккал/день соответственно, что в значительной степени связано с более высокой скоростью основного обмена у человека, тем самым указывая на повышенную метаболическую активность организма, которая, наряду с изменениями в распределении энергии, сыграла решаюшую роль в эволюции размера человеческого мозга и истории жизни.

Согласно недавно проведенному исследованию [42] специфический для человека ген *ARHGAP11B*, преимущественно экспрессирующийся в нейрональных клетках-предшественниках неокортекса плода человека, увеличивает количество и пролиферацию клеток-предшественников за счет активации глутаминолиза в митохондриях, что дает основание полагать, что ген *ARHGAP11B* может быть вовлечен в рост неокортекса человека в процессе эволюции.

Примечательно и то, что между головным мозгом человека и шимпанзе могут существовать важные метаболические различия, специфичные для конкретных типов клеток, а именно, нейрональных клеток-предшественников, астроцитов и нейронов [43]. Так, установлена значительная межвидовая дифференциальная экспрессия во всех трех типах клеток с наибольшей степенью различий в астроцитах. При этом существенные различия между видами для указанных типов клеток были выявлены в клеточном дыхании, в трансмембранном транспорте глюкозы и лактата, а также использовании пирувата, что демонстрирует предполагаемый специфический для клеточного типа механизм, с помощью которого астроциты могут вносить существенный вклад в адаптивную метаболическую способность человеческого мозга, а также дает основание полагать о возможном значительном вкладе астроцитов в эволюцию метаболизма глюкозы в головном мозге [43].

Важно отметить, что астроциты, являющиеся ключевыми нейроглиальными клетками, поддерживающими гомеостаз в ЦНС, эволюционировали посредством специализации и диверсификации функций. Астроглиальные клетки интегрируются в нейронные сети через синапсы, при этом наличие у них специфической морфологической и функциональной пластичности способствует реализации процессов обучения памяти. Однако при невропатологии имеют место реактивный астроглиоз и дегенерация астроцитов, что в свою очередь может в значительной степени определять патологическое прогрессирование заболевания [44].

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Как известно, глюкоза является тем обязательным источником энергии, который критически важен для реализации многих функций головного мозга, включая производство АТФ, синтез нейромедиаторов, нейромодуляторов, и структурных компонентов клетки, а также регуляцию окислительного стресса [45]. При этом механизм доставки глюкозы и ее метаболитов в паренхиму головного мозга все еще остается не до конца выясненным. Экспериментально определенное соотношение потребления глюкозы и кислорода в состоянии покоя предполагает неполное окисление глюкозы за счет значительного производства липидов и аминокислот из глюкозы, а также экскреции неокисленного метаболита, в частности, L-лактата [46]. Неполное окисление глюкозы и накопление Lлактата в процессе нейрональной активности [47] указывает на преобладание гликолиза над окислительным метаболизмом. Относительно высокая гликолитическая способность ткани головного мозга может быть обусловлена активностью астроцитов [48], при которой процесс гликолиза проявляет большую ферментативную способность, чем окислительный метаболизм [48], в то время как гликолиз нейронов весьма ограничен [49]. Важно отметить и то, что астроцитарный гликолиз выраженно усиливается за счет нейротрансмиттеров глутамата и норадреналина [50].

Следовательно, согласно гипотезе "астроцитарно-нейронального лактатного челнока" L-лактат в основном продуцируется астроцитами, а затем передается посредством МСТ к нейронам, где он превращается в пируват для производства аэробной энергии в митохондриях (рис. 1) [51]. При этом предполагается, что согласованные действия между астроцитами и нейронами в контексте астроцитарно-нейронального лактатного челнока может иметь важное значение для реализации когнитивных функций, тогда как энергетическая рассогласованность, напротив, способствовать развитию когнитивных нарушений [52].

Стоит отметить и тот важный момент. что гипотеза "астроцитарно-нейронального лактатного челнока", хотя и подкреплена многочисленными доказательствами, по-прежнему остается весьма противоречивой [53, 54]. Так, согласно результатам нескольких исследований при стимуляции в нейронах также может протекать весьма активный гликолиз и даже экскреция лактата [55, 56]. Следует также иметь в виду, что при разных метаболических условиях может реализовываться та или иная стратегия, касающаяся транспорта глюкозы и лактата в нейронах и астроцитах, а также между ними. Это прямо указывает на то, что "астроцитарнонейрональный лактатный челнок" может быть только одним из нескольких способов удовлетворения энергетических потребностей нервных клеток [57].

Деятельность головного мозга в физиологических условиях находится в прямой зависимости от активного поступления глюкозы из крови, а также в процессе распада гликогена, локализованного в основном в астроцитах. Так, установлено, что содержание гликогена в культивируемых астроцитах в значительной мере возрастает при инкубации с глутаматом [58], в то время как ингибирование гликогенолиза подавляет поглощение глутамата [59] и ионов калия [60]. Кроме того, в отсутствие глюкозы астроцитарный гликоген может расщепляться до лактата, который в свою очередь транспортируется к аксонам в качестве источника энергии для повышения их активности [61]. Таким образом, гликоген астроцитов, вероятно, может повысить выживаемость и функциональную активность нейронов головного мозга в условиях ограничения глюкозы. Это дает основание предполагать, что истощение астроцитарного гликогена способствует снижению активности мозга, ведущее к когнитивной дисфункции и нейродегенерации [62].

Стоит отметить и тот факт, что в астроцитах протекает липидный обмен, при этом липиды, продуцируемые астроцитами, доставляются к нейронам и олигодендроцитам в качестве компонентов синаптических и миелиновых мембран [63, 64]. Примечательно, что регуляция окислительного метаболизма липидов находится в прямой зависимости от слаженного взаимодействия между астроцитами и нейронами [64]. Кетоновые тела, вырабатываемые печенью во время голодания или у пациентов с диабетом, транспортируются в головной мозг посредством МСТ, где используются как энергетический субстрат [65]. Также было проде-



Рис. 1. Модель астроцитарно-нейронального лактатного челнока. GLUT1, GLUT3 — переносчики глюкозы; LDH5 — изоформы 5-лактатдегидрогеназы; MCT1, MCT2, MCT4 — монокарбоксилатные транспортеры; LDH1 — изоформа 1-лактатдегидрогеназы.

монстрировано, что активация церебрального метаболизма альтернативных субстратов (кетонов) на фоне выраженного нарушения метаболизма глюкозы при черепно-мозговых травмах оказывает выраженное нейропротекторное действие [66, 67], что дает основание использовать это в клинической практике в качестве кетогенной диеты при эпилепсии и травмах головного мозга.

Установлено, что при ишемии *in vitro* астроциты за счет AMP-активированной протеинкиназы (AMPK) увеличивают продукцию кетоновых тел, которые в свою очередь выступают в качестве энергетического субстрата (вместо L-лактата) нейронам для осуществления цикла трикарбоновых кислот [68].

Энергетический метаболизм астроцитов регулируется рядом физиологических и патологических факторов, включая гормоны, нейротрансмиттеры, цитокины, активные формы кислорода, ионы, кислород и питательные вещества, при этом способность к метаболической адаптации у астроцитов влияет на активность нейронов за счет обмена метаболитами между астроцитами и нейронами.

МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА В АСТРОЦИТАХ

Глюкоза является основным и обязательным источником энергии для всех клеток головного мозга, поскольку это единственный субстрат, который присутствует в системном кровотоке, быстро транспортируется через гематоэнцефалический барьер и концентрация которого регулируется гормонами. Считается, что астроциты характеризуются низкой потребностью в энергии и соответственно имеют незначительную скорость производства АТФ. Itoh и соавт. [69] сообщили о чрезвычайно низкой скорости окислительного метаболизма в культуре астроцитов in vitro, это может быть связано с использованием очень высокой концентрации глюкозы в культуральной среде, что в свою очередь снижает окислительную способность примерно на 50% [70]. Напротив, результаты исследования метаболизма головного мозга in situ в условиях покоя с помощью ЯМР-спектроскопии показали, что окислительный метаболизм в кортикальных астроцитах составляет около 30% от общего потребления кислорода тканями в коре головного мозга [71]. Это дает возможность предположить, что относительный вклад астроцитов в потребление цереброкортикального кислорода соответствует относительному объему астроцитов в коре головного мозга.

Как известно, астроциты и нейроны метаболизируют глюкозу через гликолитический, пентозный шунт и окислительные пути, при этом только астроциты обладают способностью накапливать глюкозу в виде гликогена [72]. Постоянная концентрация астроцитарного гликогена, определяемая динамическим равновесием между синтезом и гликогенолизом [73], относительно низка по сравнению с таковой в скелетных мышцах и печени. Однако он вносит существенный важный вклад в функциональную активность нейронов [74]. Стоит отметить, что в условиях гипогликемии распад гликогена в астроцитах может поддерживать нейрональную активность [74]. В дополнение к этому гликогенолизу способствует недостаток энергетических субстратов [75], а также повышенная нейрональная активность, как в случае депривации сна, во время которой содержание гликогена значительно снижается [76]. Следовательно, гликоген может являться кратковременным энергетическим буфером, который существенно сокращает временные потребности в энергии, при этом не играя роль в устойчивом обеспечении энергией [77].

Кроме того, был идентифицирован ряд нейроактивных молекул, а именно, аденозин, норадреналин и некоторые цитокины, регулирующие экспрессию ключевых генов, участвующих в метаболизме астроцитарного гликогена, в частности, PTG (protein targeting to glycogen) [50, 78]. При этом воздействие вышеупомянутых трансмиттеров приводило к циклической АМР-зависимой индукции экспрессии фактора транскрипции С /ЕВР, гликогенсинтазы и PTG. Также было показано, что экспрессия генов, связанных с метаболизмом гликогена в головном мозге, изменяется на протяжении цикла сна-бодрствования или отдыха-активности, и с учетом почти избирательной локализации гликогена именно в астроцитах, эти клетки вполне могут участвовать в регуляции сна [79].

Необходимо отметить, что норадреналин – нейроактивная молекула, высвобождаемая из норадренергических нейронов голубого пятна, связывается с α - и β -адренергическими рецепторами, которые экспрессируются в клетках головного мозга, включая астроциты [80]. Это вызывает увеличение уровня цитоплазматических вторичных мессенджеров, в частности, ионов Ca²⁺ и цАМФ, которые в свою очередь запускают ряд клеточных процессов, включая транскрипцию генов [81], морфологическое изменение формы клеток [82] и аэробный гликолиз [83].

Также установлено, что β-адренергические рецепторы астроцитов участвуют через изменения формы астроцитов в формировании памяти – процессе, требующем значительных затрат энергии [84]. Действительно, для консолидации памяти у мышей необходим гликогенолиз [85]. Кроме того, консолидация памяти, от краткосрочной до долгосрочной, требует высвобождения нейронального норадреналина [86]. При этом астроциты, которые хранят энергию в виде гликогена, после активации норадреналина генерируют метаболиты, включая L-лактат, действующие как источник энергии для активных нейронов [87], а также координируют соседние астроциты для дальнейшего усиления аэробного гликолиза астроцитов [83].

Учитывая тот факт, что нейродегенерация сопровождается нарушением норадренергических нейронов, вклад астроцитов в прогрессирование заболевания может быть весьма значительным, что в свою очередь коррелирует со снижением норадреналина [88].

МЕТАБОЛИЗМ ЛАКТАТА В АСТРОЦИТАХ

Как показали исследования *ex vivo* и *in vivo*, во время нейрональной активности циркулирующая глюкоза поглощается преимущественно астроцитами, в которых за счет аэробного гликолиза образуется лактат [89], передающийся в нейроны с помощью специфических транспортеров МСТ [90].

С помощью методов, позволяющих визуализировать функции головного мозга (МРТ и ПЭТ), продемонстрировано, что во время нейрональной активации происходит усиление аэробного гликолиза с последующим производством лактата [91].

Интересен и тот недавно установленный факт [92], что циркулирующий в кровотоке лактат является одним из основных субстратов цикла трикарбоновых кислот и источником энергии для большинства тканей, тогда как первоначально предполагалось преобразование его из глюкозы в астроцитах и использование только нейронами.

Долгое время считалась, что лактат, синтезируемый в результате астроцитарного гликолиза, может выступать только в качестве источника энергии для нейронов [93]. Однако согласно данным ряда недавно проведенных исследований, лактат может являться сигнальной молекулой для реализации пластичности нейронов. Действительно, по результатам нескольких поведенческих тестов перенос лактата от астроцитов к нейронам необходим для консолидации памяти [94, 95], что согласуется с индукцией лактатом нескольких генов пластичности в нейронах, таких как *Arc*, *c-fos* и *zif* 268 [96, 97]. При этом данный эффект лактата опосредуется модуляцией активности рецептора NMDA и нижестоящим сигнальным каскадом Erk1/2 [98].

Более того, выявлена роль астроцитарного лактата в обработке информации, необходимой для обучения и памяти, а именно, в CA1 области гиппокампа, участвующей в обучении, зафиксировано выраженное увеличение внеклеточного уровня лактата, который используется в качестве источника энергии для нейронов [99].

Примечательно, что лактат оказывает и пролиферативное действие на нейрональные клеткипредшественники гиппокампа *in vitro*, тем самым регулируя нейрогенез в гиппокампе [100].

Как известно, источником лактата в головном мозге, помимо глюкозы, является гликоген [101], который локализован исключительно в астроцитах и активируется ограниченным числом нейротрансмиттеров, таких как вазоактивный кишечный пептид [102] и норадреналин [103], что является еще одним показательным примером метаболического взаимодействия нейронов и глии. Кроме того, в недавнем исследовании [104] была продемонстрирована роль гликогенолиза с участием норадреналина в пластичности нейронов и консолидации памяти. При этом норадренергические рецепторы астроцитов принимают непосредственное участие в высвобождении лактата из астроцитов в процессе обучения, что в свою очередь необходимо для поддержания молекулярных изменений в нейронах и формирования долговременной памяти в гиппокампе.

В другом исследовании [105] влияние лактата на пластичность и консолидацию памяти оценивали путем фармакологического блокирования гликогенолиза с помощью внутригиппокампальных инъекций ингибитора гликогенфосфорилазы — 1,4-дидезокси-1,4-имино-D-арабинитола, который вызывал амнезию после процесса обучения, что нивелировалось действием лактата. Аналогичные наблюдения были выявлены и в ряде других исследований с участием префронтальной коры и базолатерального миндалевидного тела [94, 95].

Примечательно и то, что блокирование экспрессии МСТ приводило к ингибированию переноса лактата от астроцитов к нейронам, тем самым способствуя развитию амнезии, тогда как введение лактата выраженно снижало негативное влияние амнезии, вызванной ингибированием специфичных для астроцитов МСТ1 и 4, но не блокированием нейрон-специфического транспортера МСТ2 [106]. Такой положительный эффект от введения лактата в полной мере согласуется с данными, согласно которым лактат индуцирует экспрессию генов пластичности в нейронах [98].

Стоит отметить, что долговременная потенциация, которая обычно считается электрофизиологическим механизмом, лежащим в основе формирования памяти, также нарушается под действием 1,4-дидезокси-1,4-имино-D-арабинитола, однако внутригиппокампальное введение лактата нивелирует данный негативный эффект [106].

Важен и тот недавно установленный факт, что лактат, продуцируемый астроцитами, оказывает положительное влияние на динамические процессы в синапсах, такие как изменения поверхности, объема и плотности, которые, как известно, лежат в основе пластичности и памяти [107].

МЕТАБОЛИЗМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В АСТРОЦИТАХ

Астроциты являются единственным типом нервных клеток, в которых активно осуществляется β -окисление жирных кислот [108], при этом генерируя около 20% от общего количества энергии, необходимой для функционирования головного мозга [109]. Важно и то, что скорость β -окисления четко регулируется АМРК — белком, обеспечиваю-



Рис. 2. Метаболизм жирных кислот в астроцитах. GLUT1 – переносчик глюкозы; LDH5 – изоформа 5 лактатдегидрогеназы; MCT1 – монокарбоксилатный транспортер; CPT1 – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1; ACS – ацил-СоА-синтаза; TCA – цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса); ADP – аденозиндифосфат; ATP – аденозинтрифосфат.

щим согласованную регуляцию многих путей энергетического метаболизма [110]. Интересно, что АМРК может быть активирована 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотидом [111] и метформином [112], что дает возможность использовать это в качестве фармакологической коррекции при нарушении активации или экспрессии АМРК. Также активированный АМРК кетогенез в астроцитах стимулируется как в условиях гипоксии [111], так и при гипогликемии [113].

Астроциты также используют жирные кислоты в качестве предшественников для синтеза кетоновых тел, которые в свою очередь используются нейронами в качестве источника энергии в определенных условиях (рис. 2) [114].

Действительно, способность эффективно использовать альтернативные субстраты, помимо глюкозы, может повысить устойчивость и сохранить функциональные способности головного мозга в условиях дефицита глюкозы, ингибирования гликолиза и пируватдегидрогеназного комплекса [115], а также при ишемии [116]. Как известно, окисление кетоновых тел и жирных кислот производит ацетил-КоА, ФАДН2 и НАДН, Н⁺, которые могут напрямую включаться в цикл трикарбоновых кислот и митохондриальную цепь переноса электронов, минуя гликолиз и пируватдегидрокомплекс. При этом окисление геназный кетоновых тел может быть более эффективным, чем гликолиз, поскольку осуществляется в результате протекания 3 быстрых реакций в митохондриях, тогда как гликолиз требует протекания 10 цитоплазматических реакций и поглощения митохондриями НАДН, Н⁺, пирувата, лактата [117], а также АТФ, что в условиях нарушения энергетического метаболизма весьма проблематично [118].

Необходимо отметить, что транспорт кетоновых тел через ГЭБ зависит от переносчика и в отличие от транспорта глюкозы не увеличивается в условиях нейрональной активности, а напрямую зависит от концентрации кетоновых тел в кровотоке [119]. МСТ, являющиеся одними из известных идентифицированных транспортеров кетоновых тел, распределены по всему головному мозгу [120]. Как показало исследование на грызунах, экспрессия МСТ между различными типами нервных клеток выраженно отличается, при этом изоформа МСТ1 локализуется в ГЭБ на эндотелиальных клетках и астроглии, МСТ4 в астроглии, а МСТ2 в нейронах [120].

Примечательно, что транспортная способность кетоновых тел через ГЭБ у грызунов повышается при голодании [121], что также наблюдается и у человека [122]. Это может быть обусловлено повышенной экспрессией МСТ, которое обнаруживается у грызунов как после кетогенной диеты [123, 124], так и после физических упражнений [125].

Кроме того, в ходе одного из исследований [126] установлено, что цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) активирует окисление жирных кислот в астроцитах как in vitro, так и in vivo. Вместе с тем CNTF увеличивает астроцитарную экспрессию MCT1, SCOT и BDH - трех ключевых транспортеров кетоновых тел, это указывает на то, что СNTF-активированные астроциты действительно используют кетоновые тела и жирные кислоты в качестве альтернативных энергетических субстратов. Необходимо отметить и тот установленный факт, что активация астроцитов с помощью CNTF откладывает свой отпечаток на реорганизацию их метаболического профиля. Так, астроциты, активированные CNTF, были полностью устойчивы к продолжительному токсическому воздействию пальмитата in vitro, что свидетельствует о защитном действии CNTF за счет уже существующего ремоделирования метаболического статуса астроцитов.

Важно отметить, что наиболее активное высвобождение свободных жирных кислот из фосфолипидов в плазматической мембране происходит как при острых патологических состояниях, таких как травма мозга и ишемия, так и при хронических нейродегенеративных заболеваниях, в частности, болезни Альцгеймера [127, 128]. Данные патологические состояния сопровождаются выраженными метаболическими нарушениями и, как следствие, активацией атроцитов [129], что, по-видимому, является эффективным адаптационным ответом в условиях дефицита энергии и накопления токсичных метаболитов.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ АСТРОЦИТОВ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

По результатам одного из исследований было высказано предположение, что метаболическая дисфункция астроцитов является тем пусковым фактором, который провоцирует отложение бетаамилоида [130]. Несмотря на то что формирование амилоидных бляшек в основном обусловлено снижением клиренса бета-амилоида, интенсивной продукцией олигомеров бета-амилоида за счет нарушения метаболической регуляции уровней β - и у-секретазы [131], а также аберрантной посттрансляционной модификацией белка-предшественника бета-амилоида (АРР) [132], было продемонстрировано, что воздействие бета-амилоида на культивируемые астроциты не только изменяет поглощение ими глюкозы, но и ее последующий метаболизм параллельно с повышением высвобождения гидропероксида и глутатиона [133]. Нейровоспаление, которое, как правило, отчетливо наблюдается при прогрессировании болезни Альцгеймера, может изменять метаболизм астроцитов, вызывая повышенное высвобождение глутамата и $AT\Phi$ через полуканалы коннексина 43, что в свою очередь может приводить к активации микроглии и дисфункции нейронов [134].

Интересно, что несмотря на воспаление как острую реакцию клеток, участвующих в астроглиозе, уменьшение хронического нейровоспаления агонистом рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR), может представлять собой одну из стратегий защиты нейрональных клеток, пораженных нейродегенеративными заболеваниями. Кроме того, хорошо известны метаболические свойства PPAR, в частности, PPARу стимулирует поглощение глюкозы и глутамата, а также высвобождение лактата, тем самым защищая нейроны от депривации глюкозы и эксайтотоксичности. Аналогичным образом PPAR индуцирует β-окисление жирных кислот при развитии нарушения метаболизма глюкозы. При этом основным продуктом данного процесса являются кетоновые тела, которые экспортируются в нейроны для снабжения энергией [135].

Необходимо отметить, что пораженные области головного мозга при болезни Паркинсона, в част-

ности, черная субстанция, содержат относительно меньшее количество астроцитов, чем другие области мозга, что делает дофаминергические нейроны потенциально более чувствительными к метаболическим и энергетическим нарушениям [136]. При этом было продемонстрировано, что депривация глюкозы [137], а также повышенное поступление лактата способствуют накоплению и олигомеризации α-синуклеина [138], это указывает на существенный вклад астроцитарной метаболической дисфункции в патогенез болезни Паркинсона. Более того, в астроцитах, выделенных из ткани головного мозга животных с экспериментальной моделью болезни Паркинсона, экспрессирующих мутантный α-синуклеин, выявлены как функциональные нарушения, так и выраженные морфологические повреждения митохондрий, что в свою очередь обусловливает низкую способность астроцитов обеспечивать дифференцировку нейронов [139]. Кроме того, установлено, что экспрессия мутантного α-синуклеина А53Т в астроцитах приводит к подавлению регуляции транспортеров глутамата и коррелирует с развитием реактивного астроглиоза [140].

Важен и тот момент, что в контексте лечения болезни Паркинсона астроциты, как известно, превращают L-DOPA в дофамин [141], при этом в полосатом теле астроциты выступают в качестве хранилища для L-DOPA [142], это может указывать на то, что метаболические и энергетические нарушения в астроцитах не только способствуют развитию болезни Паркинсона, но и в значительной мере снижают эффективность лечения заболевания.

Ряд исследований указывает на вклад астроцитов в патогенез болезни Хантингтона. Так, у мышей с моделью болезни Хантингтона снижение высвобождения астроцитарной ГАМК с помощью транспортера GAT-3 вызывает заметное нарушение синаптической пластичности нейронов в полосатом теле [143]. В дополнение к этому у астроцитов выявлена способность усиливать Са²⁺-зависимое высвобождение внеклеточного глутамата, что коррелирует с повышением биосинтеза глутамата за счет увеличения уровня специфического для астроцитов митохондриального фермента пируваткарбоксилазы, что, в конечном итоге, может способствовать развитию эксайтотоксичности по мере прогрессирования болезни Хантингтона [144].

Экспериментальные данные, полученные в ходе исследования животных с моделью бокового амиотрофического склероза, экспрессирующих мутантную супероксиддисмутазу-1 (SOD1), указывают на наличие выраженных нарушений регуляции метаболизма пурина, пиримидина, лизина и глицерофосфолипидов в астроцитах, совместно культивируемых с нейронами. Более того, воздействие глутамата вызывало значительные патологические метаболические изменения в астроцитах и ассоциировалось со снижением уровня лактата, тем самым ингибируя его транспорт из астроцитов к нейронам [145]. Важно и то, что эти результаты коррелировали с данными анализа спинномозговой жидкости пациентов с боковым амиотрофическим склерозом [146], у которых к тому же наблюдались нарушения метаболических функций митохондрий в астроцитах [147]. Последнее было выявлено и у экспериментальных животных уже на ранней стадии заболевания, что дает основание полагать о ключевой роли астроцитарных метаболических нарушений в патогенезе бокового амиотрофического склероза [148].

В целом это демонстрирует, что метаболическая дисфункция астроцитов и связанные с ней изменения в экспрессии генов играют центральную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, а идентификация молекул-мишеней в астроцитах может служить для разработки эффективной терапии, чтобы предотвратить или замедлить прогрессирование заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Астроциты играют центральную роль в нейрометаболическом взаимодействии, основанном на таком ключевом механизме, как аэробный гликолиз, продукты которого вносят существенный вклад в удовлетворение энергетических потребностей нейронов в процессе нейротрансмиссии. При этом метаболическое взаимодействие нейронов и глии может претерпевать пластические адаптации, сопряженные с синаптической пластичностью.

Нормальная деятельность головного мозга находится в прямой зависимости от метаболической пластичности астроцитов, и даже небольшое ее нарушение может вызвать значительное снижение функций мозга. Поэтому детальное изучение ключевых клеточных и молекулярных факторов энергетического метаболизма головного мозга чрезвычайно важно не только для понимания основных механизмов физиологии мозга, но и патофизиологических механизмов различных неврологических и психических расстройств. Кроме того, учитывая решающую роль астроцитов в гомеостазе мозга, эти клетки представляют собой интересную терапевтическую мишень при лечении нейродегенеративных заболеваний.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) (проект № 20-65-46004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАЛ АВТОРОВ

Концепция (А.Б. Салмина, О.Л. Власова), написание текста (Я.В. Горина), оформление рисунков (Чжао Цань), редактирование рукописи (А.И. Ерофеев, А.В. Большакова), критический пересмотр на предмет интеллектуального солержания (П.М. Балабан. И.Б Безпрозванный), утверждение окончательного варианта статьи для публикации (А.Б. Салмина, О.Л. Власова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jakovcevic D., Harder D.R. (2007) Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. Curr Top Dev Biol 79:75-97.

https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)79004-4

2. Marina N., Christie I.N., Korsak A., Doronin M., Brazhe A., Hosford P.S., Wells J.A., Sheikhbahaei S., Humoud I., Pa-ton J.F.R., Lythgoe M.F., Semyanov A., Kasparov S., Gourine A.V. (2020) Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. Nat Commun 11: 131. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13956-v

- 3. Kim K.J., Iddings J.A., Stern J.E., Blanco V.M., Croom D., Kirov S.A., Filosa J.A. (2015) Astrocyte Contributions to Flow/Pressure-Evoked Parenchymal Arteriole Vasoconstriction. J Neurosci 35: 8245-8257. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-14.2015
- 4. Magistretti P.J. (2011) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. Exp Physiol 96: 407–410. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.053157
- 5. Ioannou M.S., Jackson J., Sheu S.-H., Chang C.-L., Weigel A.V., Liu H., Pasolli H.A., Xu C.S., Pang S., Matthies D., Hess H.F., Lippincott-Schwartz J., Liu Z. (2019) Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. Cell 177: 1522-1535.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.001
- 6. (2009) The role of astroglia in neuroprotection. Dialogues Clin Neurosci 11: 281–295. https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.3/mbelanger
- 7. Paixão S., Klein R. (2010) Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. Current Opin Neurobiol 20:466-473.
- https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.04.008
- 8. Papouin T., Dunphy J., Tolman M., Foley J.C., Haydon P.G. (2017) Astrocytic control of synaptic function. Phil Trans R Soc B 372: 20160154. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0154
- 9. Vaidyanathan T.V., Collard M., Yokoyama S., Reitman M.E., Poskanzer K.E. (2021) Cortical astrocytes independently regulate sleep depth and duration via separate GPCR pathways. eLife 10: e63329. https://doi.org/10.7554/eLife.63329
- 10. Santello M., Toni N., Volterra A. (2019) Astrocyte function from information processing to cognition and cogni-

tive impairment. Nat Neurosci 22: 154-166. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8

11. Gourine A.V., Kasymov V., Marina N., Tang F., Figueiredo M.F., Lane S., Teschemacher A.G., Spyer K.M., Deisseroth K., Kasparov S. (2010) Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. Science 329: 571-575. https://doi.org/10.1126/science.1190721

- 12. Pfrieger F.W., Ungerer N. (2011) Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. Progr Lipid Res 50:357-371. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.002
- 13. García-Krauss A., Ferrada L., Astuya A., Salazar K., Cisternas P., Martínez F., Ramírez E., Nualart F. (2016) Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. Mol Neurobiol 53:5847-5863. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9497-3
- 14. Velasco-Estevez M., Rolle S.O., Mampay M., Dev K.K., Sheridan G.K. (2020) Piezo1 regulates calcium oscillations and cytokine release from astrocytes. Glia 68: 145-160.

https://doi.org/10.1002/glia.23709

- 15. Mahan V. (2019) Neurointegrity and europhysiology: astrocyte, glutamate, and carbon monoxide interactions. Med Gas Res 9: 0. https://doi.org/10.4103/2045-9912.254639
- 16. Alberini C.M., Cruz E., Descalzi G., Bessières B., Gao V. (2018) Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. Glia 66: 1244–1262. https://doi.org/10.1002/glia.23250
- 17. Bali P., Banik A., Nehru B., Anand A. (2019) Neurotrophic Factors Mediated Activation of Astrocytes Ameliorate Memory Loss by Amyloid Clearance after Transplantation of Lineage Negative Stem Cells. Mol Neurobiol 56: 8420-8434.

https://doi.org/10.1007/s12035-019-01680-z

- 18. Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C.C.A., Mullowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein P., Barres B.A. (2005) Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. Cell 120: 421-433. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020
- 19. Bavraktar O.A., Fuentealba L.C., Alvarez-Buvlla A., Rowitch D.H. (2015) Astrocyte Development and Heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Biol 7: a020362. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020362
- 20. Zhou B., Zuo Y., Jiang R. (2019) Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. CNS Neurosci Ther 25: 665-673. https://doi.org/10.1111/cns.13123
- 21. Waterson M.J., Horvath T.L. (2015) Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. Cell Metabolism 22: 962–970. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026
- 22. Herculano-Houzel S. (2011) Scaling of Brain Metabolism with a Fixed Energy Budget per Neuron: Implications for Neuronal Activity, Plasticity and Evolution. PLoS ONE 6: e17514.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017514

23. Arluison M., Quignon M., Nguyen P., Thorens B., Leloup C., Penicaud L. (2004) Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain—an immunohistochemical study. J Chem Neuroanat 28: 117–136.

https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.009

24. Moreira T.J., Pierre K., Maekawa F., Repond C., Cebere A., Liljequist S., Pellerin L. (2009) Enhanced Cerebral Expression of MCT1 and MCT2 in a Rat Ischemia Model Occurs in Activated Microglial Cells. J Cereb Blood Flow Metab 29: 1273–1283.

https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.50

25. Coraci I.S., Husemann J., Berman J.W., Hulette C., Dufour J.H., Campanella G.K., Luster A.D., Silverstein S.C., El Khoury J.B. (2002) CD36, a Class B Scavenger Receptor, Is Expressed on Microglia in Alzheimer's Disease Brains and Can Mediate Production of Reactive Oxygen Species in Response to β-Amyloid Fibrils. Am J Pathol 160: 101–112.

https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64354-4

- Bélanger M., Allaman I., Magistretti P.J. (2011) Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. Cell Metabolism 14: 724–738. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016
- Mathiisen T.M., Lehre K.P., Danbolt N.C., Ottersen O.P. (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. Glia 58: 1094–1103. https://doi.org/10.1002/glia.20990
- 28. *Dienel G.A.* (2019) Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. Physiol Rev 99: 949– 1045.

https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017

 Sonnay S., Poirot J., Just N., Clerc A.-C., Gruetter R., Rainer G., Duarte J.M.N. (2018) Astrocytic and neuronal oxidative metabolism are coupled to the rate of glutamate-glutamine cycle in the tree shrew visual cortex. Glia 66: 477–491.

https://doi.org/10.1002/glia.23259

 Kubotera H., Ikeshima-Kataoka H., Hatashita Y., Allegra Mascaro A.L., Pavone F.S., Inoue T. (2019) Astrocytic endfect re-cover blood vessels after removal by laser ablation. Sci Rep 9: 1263.

https://doi.org/10.1038/s41598-018-37419-4

 Pascual O., Ben Achour S., Rostaing P., Triller A., Bessis A. (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. Proc Natl Acad Sci U S A 109: E197–E205. https://doi.org/10.1073/pnas.1111098109

 Chen S.-H., Oyarzabal E.A., Sung Y.-F., Chu C.-H., Wang Q., Chen S.-L., Lu R.-B., Hong J.-S. (2015) Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia: Microglia Regulate Astroglia in Inflammation. Glia 63: 118–131.

https://doi.org/10.1002/glia.22738

- 33. Anderson K.M., Collins M.A., Kong R., Fang K., Li J., He T., Chekroud A.M., Yeo B.T.T., Holmes A.J. (2020) Convergent molecular, cellular, and cortical neuroimaging signatures of major depressive disorder. Proc Natl Acad Sci U S A 117: 25138–25149. https://doi.org/10.1073/pnas.2008004117
- 34. di Domenico A., Carola G., Calatayud C., Pons-Espinal M., Muñoz J.P., Richaud-Patin Y., Fernandez-Carasa I., Gut M., Faella A., Parameswaran J., Soriano J., Ferrer I., Tolosa E., Zorzano A., Cuervo A.M., Raya A., Consiglio A. (2019) Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in

Parkinson's Disease. Stem Cell Rep 12: 213–229. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.011

- Chung W.-S., Verghese P.B., Chakraborty C., Joung J., Hyman B.T., Ulrich J.D., Holtzman D.M., Barres B.A. (2016) Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 113: 10186–10191. https://doi.org/10.1073/pnas.1609896113
- 36. Gurven M., Walker R. (2006) Energetic demand of multiple dependents and the evolution of slow human growth. Proc R Soc B 273: 835–841. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3380
- Bock J., Sellen D.W. (2002) Childhood and the evolution of the human life course: An introduction. Hum Nat 13: 153–159. https://doi.org/10.1007/s12110-002-1006-5

 Navarrete A., van Schaik C.P., Isler K. (2011) Energetics and the evolution of human brain size. Nature 480: 91–

https://doi.org/10.1038/nature10629

93.

- Schuppli C., Isler K., van Schaik C.P. (2012) How to explain the unusually late age at skill competence among humans. J Human Evolut 63: 843–850. https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2012.08.009
- Kuzawa C.W., Chugani H.T., Grossman L.I., Lipovich L., Muzik O., Hof P.R., Wildman D.E., Sherwood C.C., Leonard W.R., Lange N. (2014) Metabolic costs and evolutionary implications of human brain development. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 13010–13015. https://doi.org/10.1073/pnas.1323099111
- Pontzer H., Brown M.H., Raichlen D.A., Dunsworth H., Hare B., Walker K., Luke A., Dugas L.R., Durazo-Arvizu R., Schoeller D., Plange-Rhule J., Bovet P., Forrester T.E., Lambert E.V., Thompson M.E., Shumaker R.W., Ross S.R. (2016) Metabolic acceleration and the evolution of human brain size and life history. Nature 533: 390–392. https://doi.org/10.1038/nature17654
- Namba T., Dóczi J., Pinson A., Xing L., Kalebic N., Wilsch-Bräuninger M., Long K.R., Vaid S., Lauer J., Bogdanova A., Borgonovo B., Shevchenko A., Keller P., Drechsel D., Kurzchalia T., Wimberger P., Chinopoulos C., Huttner W.B. (2020) Human-Specific ARHGAP11B Acts in Mitochondria to Expand Neocortical Progenitors by Glutaminolysis. Neuron 105: 867–881.e9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.027
- Zintel T.M., Pizzollo J., Claypool C.G., Babbitt C.C. (2020) Astrocytes drive divergent metabolic gene expression in humans and chimpanzees. Evolut Biol. https://doi.org/10.1101/2020.11.09.374835
- 44. *Verkhratsky A., Nedergaard M.* (2016) The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells. Phil Trans R Soc B 371: 20150428. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0428
- Dienel G.A., Rothman D.L. (2019) Glycogenolysis in Cerebral Cortex During Sensory Stimulation, Acute Hypoglycemia, and Exercise: Impact on Astrocytic Energetics, Aerobic Glycolysis, and Astrocyte-Neuron Interactions. In: DiNuzzo M, Schousboe A (eds) Brain Glycogen Metabolism. Springer Int Publ, Cham 209–267.
- 46. Falkowska A., Gutowska I., Goschorska M., Nowacki P., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. (2015) Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

of Glycogen Metabolism. IJMS 16: 25959–25981. https://doi.org/10.3390/ijms161125939

- 47. *Li B., Freeman R.D.* (2015) Neurometabolic coupling between neural activity, glucose, and lactate in activated visual cortex. J Neurochem 135: 742–754. https://doi.org/10.1111/jnc.13143
- Goyal M.S., Hawrylycz M., Miller J.A., Snyder A.Z., Raichle M.E. (2014) Aerobic Glycolysis in the Human Brain Is Associated with Development and Neotenous Gene Expression. Cell Metabolism 19: 49–57. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.020
- 49. *Almeida A., Moncada S., Bolaños J.P.* (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. Nat Cell Biol 6: 45–51.

https://doi.org/10.1038/ncb1080

- Allaman I., Pellerin L., Magistretti P.J. (2000) Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. Glia 30: 382–391.
- 51. Drulis-Fajdasz D., Gizak A., Wójtowicz T., Wiśniewski J.R., Rakus D. (2018) Aging-associated changes in hippocampal glycogen metabolism in mice. Evidence for and against astrocyte-to-neuron lactate shuttle. Glia 66: 1481–1495.

https://doi.org/10.1002/glia.23319

- 52. Gómez-Gonzalo M., Martin-Fernandez M., Martínez-Murillo R., Mederos S., Hernández-Vivanco A., Jamison S., Fernandez A.P., Serrano J., Calero P., Futch H.S., Corpas R., Sanfeliu C., Perea G., Araque A. (2017) Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain: Neuron-Astrocyte Signaling in Aging Brain. Glia 65: 569–580. https://doi.org/10.1002/glia.23112
- Yellen G. (2018) Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. J Cell Biol 217: 2235–2246. https://doi.org/10.1083/jcb.201803152
- 54. Patel A.B., Lai J.C.K., Chowdhury G.M.I., Hyder F., Rothman D.L., Shulman R.G., Behar K.L. (2014) Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 5385– 5390.

https://doi.org/10.1073/pnas.1403576111

55. *Díaz-García C.M., Mongeon R., Lahmann C., Koveal D., Zucker H., Yellen G.* (2017) Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. Cell Metabol 26: 361–374.

https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.021

- 56. Ivanov A.I., Malkov A.E., Waseem T., Mukhtarov M., Buldakova S., Gubkina O., Zilberter M., Zilberter Y. (2014) Glycolysis and Oxidative Phosphorylation in Neurons and Astrocytes during Network Activity in Hippocampal Slices. J Cereb Blood Flow Metab 34: 397–407. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.222
- 57. *Tang B.L.* (2018) Brain activity-induced neuronal glucose uptake/glycolysis: Is the lactate shuttle not required? Brain Res Bull 137: 225–228. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.010
- 58. Swanson R.A., Yu A.C.H., Chan P.H., Sharp F.R. (1990) Glutamate Increases Glycogen Content and Reduces Glucose Utilization in Primary Astrocyte Culture. J Neurochem 54: 490–496. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb01898.x

- 59. Sickmann H.M., Walls A.B., Schousboe A., Bouman S.D., Waagepetersen H.S. (2009) Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. J Neurochem 109: 80–86. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05915.x
- Xu J., Song D., Xue Z., Gu L., Hertz L., Peng L. (2013) Requirement of Glycogenolysis for Uptake of Increased Extracellular K+ in Astrocytes: Potential Implications for K+ Homeostasis and Glycogen Usage in Brain. Neurochem Res 38: 472–485. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0938-3
- Tekkök S.B., Brown A.M., Westenbroek R., Pellerin L., Ransom B.R. (2005) Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. J Neurosci Res 81: 644–652. https://doi.org/10.1002/jnr.20573
- Bak L.K., Walls A.B., Schousboe A., Waagepetersen H.S. (2018) Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. J Biol Chem 293: 7108–7116. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803239
- 63. van Deijk A.-L.F., Camargo N., Timmerman J., Heistek T., Brouwers J.F., Mogavero F., Mansvelder H.D., Smit A.B., Verheijen M.H.G. (2017) Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. Glia 65: 670–682.

https://doi.org/10.1002/glia.23120

- 64. Camargo N., Goudriaan A., van Deijk A.-L.F., Otte W.M., Brouwers J.F., Lodder H., Gutmann D.H., Nave K.-A., Dijkhuizen R.M., Mansvelder H.D., Chrast R., Smit A.B., Verheijen M.H.G. (2017) Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids. PLoS Biol 15:e1002605. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002605
- Martin P.M., Gopal E., Ananth S., Zhuang L., Itagaki S., Prasad B.M., Smith S.B., Prasad P.D., Ganapathy V. (2006) Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na+-coupled transporter for active uptake of 1-lactate and ketone bodies in the brain. J Neurochem 98: 279– 288.

https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03878.x

- 66. Brunner B., Rauch E., Ari C., D'Agostino D.P., Kovács Z. (2021) Enhancement of Ketone Supplements-Evoked Effect on Absence Epileptic Activity by Co-Administration of Uridine in Wistar Albino jGlaxo Riswijk Rats. Nutrients 13: 234. https://doi.org/10.3390/nu13010234
- 67. Deng-Bryant Y., Prins M.L., Hovda D.A., Harris N.G. (2011) Ketogenic Diet Prevents Alterations in Brain Metabolism in Young but not Adult Rats after Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma 28: 1813–1825.
- https://doi.org/10.1089/neu.2011.1822
 68. *Takahashi S., Iizumi T., Mashima K., Abe T., Suzuki N.* (2014) Roles and Regulation of Ketogenesis in Cultured Astroglia and Neurons Under Hypoxia and Hypoglycemia. ASN Neuro 6: 175909141455099.
 - https://doi.org/10.1177/1759091414550997
- 69. Itoh Y., Esaki T., Shimoji K., Cook M., Law M.J., Kaufman E., Sokoloff L. (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 4879–4884. https://doi.org/10.1073/pnas.0831078100
- 70. *Abe T., Takahashi S., Suzuki N.* (2006) Oxidative Metabolism in Cultured Rat Astroglia: Effects of Reducing the

Glucose Concentration in the Culture Medium and of D-Aspartate or Potassium Stimulation. J Cereb Blood Flow Metab 26: 153–160.

https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600175

 Lebon V., Petersen K.F., Cline G.W., Shen J., Mason G.F., Dufour S., Behar K.L., Shulman G.I., Rothman D.L. (2002) Astroglial Contribution to Brain Energy Metabolism in Humans Revealed by ¹³ C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Elucidation of the Dominant Pathway for Neurotransmitter Glutamate Repletion and Measurement of Astrocytic Oxidative Metabolism. J Neurosci 22: 1523–1531. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-

 Takado Y., Knott G., Humbel B.M., Escrig S., Masoodi M., Meibom A., Comment A. (2015) Imaging liver and brain glycogen metabolism at the nanometer scale. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 11: 239– 245.

https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.007

- Walls A.B., Heimbürger C.M., Bouman S.D., Schousboe A., Waagepetersen H.S. (2009) Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents. Neuroscience 158: 284–292. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.058
- 74. Suh S.W., Bergher J.P., Anderson C.M., Treadway J.L., Fosgerau K., Swanson R.A. (2007) Astrocyte Glycogen Sustains Neuronal Activity during Hypoglycemia: Studies with the Glycogen Phosphorylase Inhibitor CP-316,819 ([R - R *, S *]-5-Chloro- N -[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1 H-indole-2-carboxamide). J Pharmacol Exp Ther 321: 45-50. https://doi.org/10.1124/inst106.115550

https://doi.org/10.1124/jpet.106.115550

- Choi I.-Y., Seaquist E.R., Gruetter R. (2003) Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. J Neurosci Res 72: 25–32. https://doi.org/10.1002/jnr.10574
- 76. Kong J., Shepel P.N., Holden C.P., Mackiewicz M.,
- *Pack A.I., Geiger J.D.* (2002) Brain Glycogen Decreases with Increased Periods of Wakefulness: Implications for Homeostatic Drive to Sleep. J Neurosci 22: 5581–5587. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-13-05581.2002
- 77. Brown A.M., Tekkök S.B., Ransom B.R. (2003) Glycogen Regulation and Functional Role in Mouse White Matter. J Physiol 549: 501–512. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.042416
- Cardinaux J.R., Allaman I., Magistretti P.J. (2000) Proinflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. Glia 29: 91– 97.
- Petit J.-M., Tobler I., Allaman I., Borbély A.A., Magistretti P.J. (2002) Sleep deprivation modulates brain mRNAs encoding genes of glycogen metabolism: Sleep and brain glycogen metabolism. Eur J Neurosci 16: 1163–1167.

https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02145.x

 Wahis J., Holt M.G. (2021) Astrocytes, Noradrenaline, α1-Adrenoreceptors, and Neuromodulation: Evidence and Unanswered Questions. Front Cell Neurosci 15:645691.

https://doi.org/10.3389/fncel.2021.645691

 Hertz L., Lovatt D., Goldman S.A., Nedergaard M. (2010) Adrenoceptors in brain: Cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca2+]i. Neurochem Int 57: 411–420.

https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.03.019

- Vardjan N., Horvat A., Anderson J.E., Yu D., Croom D., Zeng X., Lužnik Z., Kreft M., Teng Y.D., Kirov S.A., Zorec R. (2016) Adrenergic activation attenuates astrocyte swelling induced by hypotonicity and neurotrauma: Adrenergic Activation Reduces Astrocyte Swelling. Glia 64 (6): 1034–1049. https://doi.org/10.1002/glia.22981
- 83. Vardjan N., Chowdhury H.H., Horvat A., Velebit J., Malnar M., Muhič M, Kreft M, Krivec ŠG, Bobnar ST, Miš K, Pirkmajer S, Offermanns S, Henriksen G, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, Zorec R (2018) Enhancement of Astroglial Aerobic Glycolysis by Extracellular Lactate-Mediated Increase in cAMP. Front Mol Neurosci 11:148. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00148
- 84. Chalermpalanupap T., Schroeder J.P., Rorabaugh J.M., Liles L.C., Lah J.J., Levey A.I., Weinshenker D. (2018) Locus Coeruleus Ablation Exacerbates Cognitive Deficits, Neuropathology, and Lethality in P301S Tau Transgenic Mice. J Neurosci 38: 74–92. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1483-17.2017
- Harris R.A., Lone A., Lim H., Martinez F., Frame A.K., Scholl T.J., Cumming RC (2019) Aerobic Glycolysis Is Required for Spatial Memory Acquisition But Not Memory Retrieval in Mice. eNeuro 6: ENEURO.0389-18.2019.

https://doi.org/10.1523/ENEURO.0389-18.2019

- 86. Gibbs M.E., Hutchinson D.S., Summers R.J. (2010) Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for α- and βadrenergic receptors. Neuroscience 170: 1209–1222. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.07.052
- Rothman D.L., Dienel G.A. (2019) Development of a Model to Test Whether Glycogenolysis Can Support Astrocytic Energy Demands of Na+, K+-ATPase and Glutamate-Glutamine Cycling, Sparing an Equivalent Amount of Glucose for Neurons. In: DiNuzzo M, Schousboe A (eds) Brain Glycogen Metabolism. Springer Int Publ, Cham 385–433.
- Bolton C.J., Tam J.W. (2020) Differential Involvement of the Locus Coeruleus in Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease: A Potential Mechanism of Clinical Differences? Neurology. https://doi.org/10.1101/2020.11.01.20224139
- Chuquet J., Quilichini P., Nimchinsky E.A., Buzsaki G. (2010) Predominant Enhancement of Glucose Uptake in Astrocytes versus Neurons during Activation of the Somatosensory Cortex. J Neurosci 30: 15298–15303. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010
- 90. Wang Q., Hu Y., Wan J., Dong B., Sun J. (2019) Lactate: A Novel Signaling Molecule in Synaptic Plasticity and Drug Addiction. BioEssays 41: 1900008. https://doi.org/10.1002/bies.201900008
- Magistretti P.J., Allaman I. (2015) A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. Neuron 86: 883–901. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035
- 92. Hui S., Ghergurovich J.M., Morscher R.J., Jang C., Teng X., Lu W., Esparza L.A., Reya T., Le Zhan, Yanxiang Guo J., White E., Rabinowitz J.D. (2017) Glu-

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

^{01523.2002}

cose feeds the TCA cycle via circulating lactate. Nature 551: 115–118.

https://doi.org/10.1038/nature24057

93. DiNuzzo M., Giove F., Maraviglia B., Mangia S. (2017) Computational Flux Balance Analysis Predicts that Stimulation of Energy Metabolism in Astrocytes and their Metabolic Interactions with Neurons Depend on Uptake of K+ Rather than Glutamate. Neurochem Res 42: 202–216.

https://doi.org/10.1007/s11064-016-2048-0

- 94. Boury-Jamot B., Carrard A., Martin J.L., Halfon O., Magistretti P.J., Boutrel B. (2016) Disrupting astrocyte-neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine. Mol Psychiatry 21: 1070–1076. https://doi.org/10.1038/mp.2015.157
- 95. Newman L.A., Korol D.L., Gold P.E. (2011) Lactate Produced by Glycogenolysis in Astrocytes Regulates Memory Processing. PLoS ONE 6: e28427. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028427
- Margineanu M.B., Mahmood H., Fiumelli H., Magistretti P.J. (2018) L-Lactate Regulates the Expression of Synaptic Plasticity and Neuroprotection Genes in Cortical Neurons: A Transcriptome Analysis. Front Mol Neurosci 11: 375.

https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00375

- 97. *Herrera-López G., Griego E., Galván E.J.* (2020) Lactate induces synapse-specific potentiation on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. PLoS ONE 15: e0242309. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242309
- Yang J., Ruchti E., Petit J.-M., Jourdain P., Grenningloh G., Allaman I., Magistretti P.J. (2014) Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 12228–12233.

https://doi.org/10.1073/pnas.1322912111

99. Newman L.A., Scavuzzo C.J., Gold P.E., Korol D.L. (2017) Training-induced elevations in extracellular lactate in hippocampus and striatum: Dissociations by cognitive strategy and type of reward. Neurobiol Learning and Memory 137: 142–153.

https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.001

100. Pötzsch A., Zocher S., Bernas S.N., Leiter O., Rünker A.E., Kempermann G. (2021) L-lactate exerts a pro-proliferative effect on adult hippocampal precursor cells in vitro. Science 24: 102126.

https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102126

101. Ruchti E., Roach P.J., De Paoli-Roach A.A., Magistretti P.J., Allaman I. (2016) Protein targeting to glycogen is a master regulator of glycogen synthesis in astrocytes. IBRO Reports 1: 46–53.

https://doi.org/10.1016/j.ibror.2016.10.002

- 102. Magistretti P.J., Dietl M.M., Hof P.R., Martin J.-L., Palacios J.M., Schaad N., Schorderet M. (1988) Vasoactive Intestinal Peptide as a Mediator of Intercellular Communication in the Cerebral Cortex. Release, Receptors, Actions, and Interactions with Norepinephrine. Ann NY Acad Sci 527: 110–129. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb26977.x
- 103. Coggan J.S., Keller D., Cali C., Lehväslaiho H., Markram H., Schürmann F., Magistretti P.J. (2018) Norepinephrine stimulates glycogenolysis in astrocytes to fuel neurons with lactate. PLoS Comput Biol 14: e1006392. https://doi.org/10.1271/journal.pshi 1006202

https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006392

104. Gao V., Suzuki A., Magistretti P.J., Lengacher S., Pollonini G., Steinman M.Q., Alberini C.M. (2016) Astrocytic β_2 -adrenergic receptors mediate hippocampal longterm memory consolidation. Proc Natl Acad Sci U S A 113: 8526–8531.

https://doi.org/10.1073/pnas.1605063113

- 105. Walls A.B., Sickmann H.M., Brown A., Bouman S.D., Ransom B., Schousboe A., Waagepetersen H.S. (2008) Characterization of 1,4-dideoxy-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) as an inhibitor of brain glycogen shunt activity. J Neurochem 105: 1462–1470. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05250.x
- 106. Suzuki A., Stern S.A., Bozdagi O., Huntley G.W., Walker R.H., Magistretti P.J., Alberini C.M. (2011) Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. Cell 144: 810–823. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018
- 107. Vezzoli E., Cali C., De Roo M., Ponzoni L., Sogne E., Gagnon N., Francolini M., Braida D., Sala M., Muller D., Falqui A., Magistretti P.J. (2020) Ultrastructural Evidence for a Role of Astrocytes and Glycogen-Derived Lactate in Learning-Dependent Synaptic Stabilization. Cerebr Cortex 30: 2114–2127. https://doi.org/10.1093/cercor/bhz226
- 108. Edmond J., Robbins R.A., Bergstrom J.D., Cole R.A., de Vellis J. (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. J Neurosci Res 18: 551–561. https://doi.org/10.1002/jnr.490180407
- 109. Ebert D., Haller R.G., Walton M.E. (2003) Energy Contribution of Octanoate to Intact Rat Brain Metabolism Measured by ¹³ C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. J Neurosci 23: 5928–5935. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05928.2003
- 110. Hardie D.G. (2008) AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. Int J Obes 32: S7–S12. https://doi.org/10.1038/ijo.2008.116
- 111. Blázquez C., Woods A., De Ceballos M.L., Carling D., Guzmán M. (2002) The AMP-Activated Protein Kinase Is Involved in the Regulation of Ketone Body Production by Astrocytes. J Neurochem 73: 1674–1682. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.731674.x
- 112. Westhaus A., Blumrich E.M., Dringen R. (2017) The Antidiabetic Drug Metformin Stimulates Glycolytic Lactate Production in Cultured Primary Rat Astrocytes. Neurochem Res 42: 294–305. https://doi.org/10.1007/s11064-015-1733-8
- 113. *Takahashi S.* (2020) Metabolic compartmentalization between astroglia and neurons in physiological and pathophysiological conditions of the neurovascular unit. Neuropathology 40: 121–137. https://doi.org/10.1111/neup.12639
- 114. Le Foll C., Levin B.E. (2016) Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. Am J Physiol Regulat, Integrativ and Compar Physiol 310: R1186–R1192. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2016

 115. Youssef F.F. (2015) Ketone bodies attenuate excitotoxic cell injury in the rat hippocampal slice under conditions of reduced glucose availability. Neurol Res 37: 211–216. https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000430

- 116. Prins M.L. (2008) Cerebral Metabolic Adaptation and Ketone Metabolism after Brain Injury. J Cereb Blood Flow Metab 28: 1–16. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600543
- 117. Samoilova M., Weisspapir M., Abdelmalik P., Velumian A.A., Carlen P.L. (2010) Chronic in vitro ketosis is neuroprotective but not anti-convulsant. J Neurochem 113: 826–835.

https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06645.x

- 118. Błaszczyk J.W. (2020) Energy Metabolism Decline in the Aging Brain–Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. Metabolites 10: 450. https://doi.org/10.3390/metabo10110450
- 119. Cunnane S.C., Courchesne-Loyer A., Vandenberghe C., St-Pierre V., Fortier M., Hennebelle M., Croteau E., Bocti C., Fulop T., Castellano C.-A. (2016) Can Ketones Help Rescue Brain Fuel Supply in Later Life? Implications for Cognitive Health during Aging and the Treatment of Alzheimer's Disease. Front Mol Neurosci 9. https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00053
- 120. Pellerin L., Halestrap A.P., Pierre K. (2005) Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. J Neurosci Res 79: 55–64. https://doi.org/10.1002/jnr.20307

121. *Hawkins R.A., Mans A.M., Davis D.W.* (1986) Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metabol 250: E169–E178.

https://doi.org/10.1152/ajpendo.1986.250.2.E169

122. Pan J.W., Telang F.W., Lee J.H., De Graaf R.A., Rothman D.L., Stein DT, Hetherington HP (2008) Measurement of β-hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain: Cerebral BHB in acute hyperketonemia. J Neurochem 79: 539–544. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00575.x

 123. Hargrave S.L., Davidson T.L., Lee T.-J., Kinzig K.P. (2015) Brain and behavioral perturbations in rats follow-

ing Western diet access. Appetite 93: 35–43. https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.03.037

124. Leino R.L., Gerhart D.Z., Duelli R., Enerson B.E., Drewes L.R. (2001) Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. Neurochem Int 38: 519–527.

https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00102-9

125. *Takimoto M., Hamada T.* (2014) Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins. J Appl Physiol 116: 1238–1250.

https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01288.2013

126. Escartin C., Pierre K., Colin A., Brouillet E., Delzescaux T., Guillermier M., Dhenain M., Deglon N., Hantraye P., Pellerin L., Bonvento G. (2007) Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults. J Neurosci 27: 7094– 7104.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-07.2007

127. *Phillis J.W., O'Regan M.H.* (2004) A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. Brain Res Rev 44: 13–47.

https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.10.002

128. Sun G.Y., Xu J., Jensen M.D., Simonyi A. (2004) Phospholipase A2 in the central nervous system. J Lipid Res 45: 205-213.

https://doi.org/10.1194/jlr.R300016-JLR200

129. *Dhillon V.S., Fenech M.* (2014) Mutations that affect mitochondrial functions and their association with neurodegenerative diseases. Mutation Res/Rev in Mutation Res 759: 1–13.

https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.09.001

- 130. Yan L.-J., Xiao M., Chen R., Cai Z. (2013) Metabolic Dysfunction of Astrocyte: An Initiating Factor in Betaamyloid Pathology? Aging Neurodegener 1: 7–14.
- 131. Nadler Y., Alexandrovich A., Grigoriadis N., Hartmann T., Rao K.S.J., Shohami E., Stein R. (2008) Increased expression of the γ-secretase components presenilin-1 and nicastrin in activated astrocytes and microglia following traumatic brain injury. Glia 56: 552–567. https://doi.org/10.1002/glia.20638
- 132. Perdivara I., Petrovich R., Allinquant B., Deterding L.J., Tomer K.B., Przybylski M. (2009) Elucidation of O-Glycosylation Structures of the β-Amyloid Precursor Protein by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Using Electron Transfer Dissociation and Collision Induced Dissociation. J Proteome Res 8: 631–642. https://doi.org/10.1021/pr800758g
- 133. Allaman I., Gavillet M., Belanger M., Laroche T., Viertl D., Lashuel H.A., Magistretti P.J. (2010) Amyloid- Aggregates Cause Alterations of Astrocytic Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability. J Neurosci 30: 3326–3338.

https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010

134. Yin X., Feng L., Ma D., Yin P., Wang X., Hou S., Hao Y., Zhang J., Xin M., Feng J. (2018) Roles of astrocytic connexin-43, hemichannels, and gap junctions in oxygenglucose deprivation/reperfusion injury induced neuroinflammation and the possible regulatory mechanisms of salvianolic acid B and carbenoxolone. J Neuroinflammat 15: 97.

https://doi.org/10.1186/s12974-018-1127-3

- 135. Iglesias J., Morales L., Barreto G.E. (2017) Metabolic and Inflammatory Adaptation of Reactive Astrocytes: Role of PPARs. Mol Neurobiol 54: 2518–2538. https://doi.org/10.1007/s12035-016-9833-2
- 136. Zecca L., Wilms H., Geick S., Claasen J.-H., Brandenburg L.-O., Holzknecht C., Panizza M.L., Zucca F.A., Deuschl G., Sievers J., Lucius R. (2008) Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. Acta Neuropathol 116: 47–55. https://doi.org/10.1007/s00401-008-0361-7
- 137. Bellucci A., Collo G., Sarnico I., Battistin L., Missale C., Spano P. (2008) Alpha-synuclein aggregation and cell death triggered by energy deprivation and dopamine overload are counteracted by D₂ D₃ receptor activation. J Neurochem 106: 560–577. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05406.x
- 138. Jiang P., Gan M., Ebrahim A.S., Castanedes-Casey M., Dickson D.W., Yen S.-H.C. (2013) Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of α-synuclein oligomers and decrease of neurites. Neurobiol Aging 34: 1504–1515. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.001
- 139. Schmidt S., Linnartz B., Mendritzki S., Sczepan T., Lubbert M., Stichel C.C., Lubbert H. (2011) Genetic mouse models for Parkinson's disease display severe pathology in glial cell mitochondria. Human Mol Genetics 20:

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

468

1197-1211.

https://doi.org/10.1093/hmg/ddq564

140. Gu X.-L., Long C.-X., Sun L., Xie C., Lin X., Cai H. (2010) Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α-synuclein causes neurodegeneration in mice. Mol Brain 3: 12. https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-12

141. Tsai M.J., Lee E.H. (1996) Characterization of L-DOPA transport in cultured rat and mouse astrocytes. J Neurosci Res 43: 490–495. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960215)43:4<490::AID-JNR10>3.0.CO;2-6

- 142. Asanuma M., Miyazaki I., Murakami S., Diaz-Corrales F.J., Ogawa N. (2014) Striatal Astrocytes Act as a Reservoir for L-DOPA. PLoS ONE 9: e106362. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106362
- 143. Wójtowicz A.M., Dvorzhak A., Semtner M., Grantyn R. (2013) Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. Front Neural Circuits 7. https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00188
- 144. Lee W., Reyes R.C., Gottipati M.K., Lewis K., Lesort M., Parpura V., Gray M. (2013) Enhanced Ca2+-dependent glutamate release from astrocytes of the BACHD Huntington's disease mouse model. Neurobiol Disease 58: 192–199.

https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.002

- 145. Madji Hounoum B., Mavel S., Coque E., Patin F., Vourc'h P., Marouillat S., Nadal-Desbarats L., Emond P., Corcia P., Andres C.R., Raoul C., Blasco H. (2017) Wildtype motoneurons, ALS-Linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocyte metabolism and lactate shuttling: Astrocyte Metabolism in ALS-Associated Conditions. Glia 65: 592–605. https://doi.org/10.1002/glia.23114
- 146. Mitropoulos K., Katsila T., Patrinos G.P., Pampalakis G. (2018) Multi-Omics for Biomarker Discovery and Target Validation in Biofluids for Amyotrophic Lateral Sclerosis Diagnosis. OMICS: J Integr Biol 22: 52–64. https://doi.org/10.1089/omi.2017.0183
- 147. Cistaro A., Valentini M.C., Chiò A., Nobili F., Calvo A., Moglia C., Montuschi A., Morbelli S., Salmaso D., Fania P., Carrara G., Pagani M. (2012) Brain hypermetabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a FDG PET study in ALS of spinal and bulbar onset. Eur J Nucl Med Mol Imaging 39: 251–259. https://doi.org/10.1007/s00259-011-1979-6
- 148. Ferraiuolo L., Higginbottom A., Heath P.R., Barber S., Greenald D., Kirby J., Shaw P.J. (2011) Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. Brain 134: 2627–2641. https://doi.org/10.1093/brain/awr193

METABOLIC PLASTICITY OF ASTROCYTES

Y. V. Gorina^{*a,b,#*}, A. B. Salmina^{*a,b,c*}, A. I. Erofeev^{*a*}, Zhao Can^{*a*}, A. V. Bolshakova^{*a*}, P. M. Balaban^{*a,d*}, I. B. Bezprozvanny^{*a,e*}, and O. L. Vlasova^{*a*}

^a Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

^b Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

^c Research Center of Neurology, Moscow, Russia

^d Institute of Higher Nervous Activity, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^e Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA

[#]e-mail: yana_20@bk.ru

Astrocytes are most abundant glial cells in the central nervous system that reside between the microvascular network of the brain and neuronal synapses, thus mediating the absorption of nutrients from the systemic circulation. In addition, due to their unique anatomical location, astrocytes have a high enzymatic capacity for glycolysis, glycogenesis and lipid metabolism. This makes it possible to provide neurons with necessary nutrients as a source of energy, indicating a pivotal role of astrocytes in brain metabolism. Therefore, dysfunction of astroglia can lead to the development of neurodegenerative diseases in which metabolic disturbances speed up neuronal damage. Given the important role of astrocytes in the regulation of brain homeostasis and their close metabolic relationship with neurons, we address here the plasticity of astrocyte energy metabolism in physiological conditions and its effect on brain functions during the development of neurodegenerative diseases. A deeper insight into the mechanism underlying astrocyte metabolic plasticity will help identify novel potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets to correct neurodegeneration and age-related brain dysfunctions.

Keywords: astrocytes, neurons, plasticity, cerebral metabolism, neurodegenerative diseases

ВЛИЯНИЕ ВАЗОПРЕССИНА НА КОЛЛАГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПАПИЛЛЯРНОЙ ЗОНЫ ПОЧЕК КРЫС

© 2021 г. С. Г. Дзгоев

Институт биомедицинских исследований Владикавказского Научного центра Российской академии наук, г. Владикавказ, Россия

> *e-mail: stanislavdzgoev@yandex.ru* Поступила в редакцию 14.05.2021 г. После доработки 20.06.2021 г. Принята к публикации 21.06.2021 г.

Для того чтобы выяснить, могут ли матриксные металлопротеиназы участвовать в реализации антидиуретического эффекта вазопрессина, методом зимографии исследовано влияние гормона на желатиназную активность клеток почечного сосочка крыс линии Вистар. Показано, что добавление гормона к суспензии клеток почечного сосочка вызывало увеличение желатиназной активности белков с молекулярной массой 52, 57 и 89 кДа. Данный эффект имитировался V₂-агонистом вазопрессина десмопрессином. Вазопрессин, но не десмопрессин, вызывал увеличение секреции клетками почечного сосочка 57 и 89 кДа-белка в среду инкубации. Обсуждается роль матриксных металлопротеиназ в увеличении водной проницаемости межклеточного матрикса почечного сосочка под влиянием вазопрессина.

Ключевые слова: вазопрессин, десмопрессин, почечная папилла, желатиназа А и Б, антидиуретический эффект

DOI: 10.31857/S0044452921060024

ВВЕДЕНИЕ

Состояние межклеточного матрикса почечной медуллы может оказывать существенное влияние на транспорт воды из собирательных трубок нефронов в кровеносные сосуды, создавая сопротивление осмотическому току жидкости. Как известно, главным гормоном, обеспечивающим реабсорбцию воды в почках млекопитающих и человека, является вазопрессин [1, 2]. Гормон, связываясь с V₂-рецепторами, запускает процесс встраивания в мембраны клеток собирательных трубок нефронов аквапорины, в результате чего вода поступает из просвета собирательных трубок в межклеточное пространство почечной медуллы, а затем с током крови возвращается в организм [3]. Помимо увеличения водной проницаемости стенки собирательных трубок вазопрессин стимулирует деполимеризацию основного компонента межклеточного матрикса – гиалуроновой кислоты [4]. Этот эффект гормона связан с регуляцией ферментов почечной медуллы, участвующих в синтезе и распаде гиалуроновой кислоты [5, 6]. Помимо гиалуроновой кислоты еще одним важнейшим компонентом, формирующим структуру соединительной ткани, являются коллагеновые белки, центральную роль в обмене которых играют коллагеназы матриксные металлопротеиназы (ММП), относяшиеся к семейству внеклеточных протеиназ. Известно, что ММП участвуют в процессах нормального развития и ремоделирования внеклеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, неоангиогенезе, а также в ряде почечных и других патологий [7]. В нашем недавнем исследовании было обнаружено, что коллагеназы могут оказывать дозозависимое влияние на гиалуронидазную активность почечного сосочка крыс, и было высказано предположение, что увеличение водной проницаемости межклеточного матрикса между собирательными трубками и кровеносными сосудами под регулирующим влиянием вазопрессина осушествляется за счет не только деполимеризации гиалуроновой кислоты, но и деградации коллагеновых волокон [8]. В этой связи представляло интерес выяснить, может ли вазопрессин влиять на активность коллагеназ клеток почечного сосочка.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар массой 250–300 г, которые содержались на стандартной диете в условиях вивария. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета Института биомедицинских исследований Владикавказского Научного центра Российской академии наук. В одном эксперименте использовали одну-две крысы, которых декапитировали, извлекали почки, выделяли сосочковые зоны и измельчали их до кусочков объемом 1-3 мм³. Затем измельченные кусочки помещали в буфер (pH 7.4), содержащий 135 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1.2 мМ MgSO₄, 2 мМ NaH₂ РО₄, 10 мМ глюкозу, 10 мМ трис-HCl ("Serva", Германия), 10 мМ HEPES ("Serva", Германия), и использовали для получения клеток почечного сосочка по описанному нами ранее методу, но с некоторыми изменениями [9]. Измельченные кусочки почечных сосочков, находящиеся в охлажденном буфере объемом 2 мл, помещали в устройство, состоящее из двух шприцов объемом 5 мл, соединенных друг с другом через иглу с внутренним диаметром 0.5 мм, и дезинтегрировали, прогоняя буфер с кусочками ткани из одного шприца в другой. Обычно 8-10 раз было достаточно для образования однородной суспензии. Затем суспензию фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 0.2 мм и центрифугировали 5 мин при 100 g и 4°С. Полученный осадок переосаждали 3 раза в 1 мл буфера. Осадок, состоящий из клеточных конгломератов и канальцевых фрагментов, ресуспендировали в буфере до концентрации 3-5 мг/мл. Аликвоты по 50 мкл суспензии разносили в 3 пробирки с физраствором (контроль), аргинин-вазопрессином (10^{-7} M, AVP, "Sigma" США), десмопрессином (10^{-7} M, dDAVP, "Sigma" США) и инкубировали 60 мин при 37°С. После инкубации пробирки центрифугировали 5 мин при 200 g, надосадочную жидкость отбирали и переносили в другие пробирки, а к осадку добавляли по 50 мкл буфера. Затем во все пробирки добавляли эквивалентный объем буфера (рН 7.5), содержащего 20 мМ Трис-НСІ, 4%-й додецилсульфат натрия ("Serva", Германия), и оставляли при комнатной температуре, как минимум, на один час. После чего образцы исследовали при помощи зимографии.

Зимография. Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле с сополимеризованным желатином (1 мг/мл). Дискэлектрофорез белков проводили в системе Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия, но без редуцирующего агента [10]. Концентрация полиакриламида верхнего и разделяющего геля была 4% и 7.5%. Электрофорез проводили при 150 В (20-25 мА) и температуре 4°С в течение 70-90 мин. После электрофореза гель инкубировали с неионным детергентом Тритоном X-100 (2.5%) при комнатной температуре в течение 80 минут. Затем гель промывали в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, 5 мМ CaCl₂, pH 7.5 и инкубировали в этом же буфере в течение 18-24 ч при температуре 37°С. Для выявления областей, свободных от желатина,

гель сначала инкубировали 1-2 часа при комнатной температуре в растворе (25% этанол, 10% уксусная кислота), содержащем белковый краситель кумасси бриллиантовый синий R-250 (0.1%). Затем гель открашивали этим же раствором, только без красителя. Определение молекулярной массы белков, обладающих желатиназной активностью, делали, сканируя окрашенный гель на денситометре GS-900 с программным обеспечением Image Lab ("Bio-Rad", США). В качестве стандартов для определения молекулярной массы белков применялся набор рекомбинантных белков ("Bio-Rad", США).

Реактивы, у которых не указаны фирмы и страна-производитель, были отечественного производства и имели градацию не ниже "чда".

Концентрацию белка определяли по методу М. Брэдфорд [11].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе STA-TISTICA. Анализ выборок на нормальность распределения проводили методом Шапиро-Уилка. Достоверность отличий между группами оценивали по критерию Ньюмена-Кейлса. Данные выражали как средние значения ± ошибка среднего (M±m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как видно из рис. 1, в клетках почечного сосочка крыс линии Вистар наиболее четко выявлялись 4 белковые зоны с молекулярной массой 52, 57, 89 и 250 кДа, обладающие желатиназной активностью. При этом максимальная желатиназная активность была характерна для двух белков с молекулярной массой 57 и 89 кДа.

Добавление в среду инкубации клеток вазопрессина в концентрации 10⁻⁷ М вызывало рост желатиназной активности в клетках. Использование данной концентрации гормона было обусловлено тем, что в предварительных экспериментах было установлено, что данный эффект гормона начинал проявляться с концентрации 10⁻⁹ М и усиливался по мере увеличения концентрации вазопрессина вплоть до 10⁻⁷-10⁻⁶ М. Несмотря на то что при получении клеточной суспензии не использовали какие-либо гидролитические ферменты, способные повредить мембранные рецепторы вазопрессина, тем не менее, очевидно, что механическая дезинтеграция канальцевых структур нефронов и компонентов межклеточного матрикса также снижает реактивность клеток на физиологические концентрации гормона.

В присутствии вазопрессина желатиназная активность белков с молекулярной массой 52, 57 и 89 кДа возрастала, в среднем, на 25–45% (рис. 2).



Рис. 1. Зимограмма клеток почечного сосочка в присутствии вазопрессина (AVP) и десмопрессина (dDAVP). Справа указаны молекулярные массы белков, проявляющих желатиназную активность. Желатиназные спектры, показанные на рисунке, являются результатом одного из 7 отдельных экспериментов.

Данный эффект гормона имитировался V₂-агонистом вазопрессина десмопрессином.

Для того, чтобы выяснить, какие белки, обладающие желатиназной активностью, могут секретировать клетки почечного сосочка, а также установить, влияют ли на этот процесс вазопрессин и его V_2 -агонист десмопрессин, после инкубации с реагентами и осаждения клеток, надосадочную жидкость от каждого образца анализировали при помощи желатиновой зимографии, как это описано в "Материалах и методах".

Как видно на рис. 3, в отсутствие гормона среда инкубации клеток почечного сосочка содержала две наиболее четко выраженные белковые зоны в районе 52 и 57 кДа, проявляющие желатиназную активность. Также минорная желатиназная активность прослеживалась в районе 89 кДа, а также вверху геля. В присутствии вазопрессина желатиназная активность белков с молекулярной массой 57 и 89 кДа возрастала в несколько раз по сравнению с контролем, в то время как десмопрессин не оказывал никакого влияния на активность желатиназ (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Центральную роль в обмене коллагеновых белков выполняют внеклеточные протеиназы, относящиеся к семейству матриксных металлопротеиназ. Они синтезируются разными типами клеток, включая клетки соединительной ткани и эпители-



Рис. 2. Желатиназная активность белков клеток почечного сосочка в присутствии вазопрессина (AVP) и десмопрессина (dDAVP). Результаты, представленные на рисунке, являются средними значениями 7 отдельных экспериментов. Звездочками указана достоверность отличий при p < 0.05 по сравнению с контролем.



Рис. 3. Зимограмма среды инкубации клеток почечного сосочка в присутствии вазопрессина (AVP) и десмо-прессина (dDAVP). Справа указаны молекулярные массы белков, проявляющих желатиназную активность. Желатиназные спектры, показанные на рисунке, являются результатом одного из 7 отдельных экспериментов.

альные клетки. На сегодняшний день известно около 30 ММП, на основании субстратной специфичности и гомологии которых они подразделяются на шесть групп: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, ММП мембранного типа и другие ММП [12]. Следует отметить, что гидролизовать желатин способны не только желатиназы, но и некоторые представители других групп ММП [13].



Рис. 4. Желатиназная активность среды инкубации клеток почечного сосочка в присутствии вазопрессина (AVP) и десмопрессина (dDAVP). Результаты, представленные на рисунке, являются средними значениями 7 отдельных экспериментов. Звездочками указана достоверность отличий при p < 0.05 по сравнению с контролем.

Как видно из результатов данной работы, клетки папиллярной зоны почек крыс содержали ряд белков, способных гидролизовать желатин. Вазопрессин вызывал рост желатиназной активности 52, 57 и 89 кДа-белков на 25-45%. Этот эффект имитировался V₂-агонистом десмопрессином, что доказывает участие V2-рецепторов в регуляции активности этих белков. В почках различные отделы нефрона и собирательные трубки содержат как V₁, так и V₂-рецепторы вазопрессина. V₂-рецепторы располагаются, главным образом, в дистальных отделах нефронов и собирательных трубках. Кроме того, V1a-рецепторы находятся в кровеносных сосудах и клетках соединительной ткани почечной медуллы [14, 15]. Если учесть, что почечная папилла, в основном, состоит из собирательных трубок [16], в которых присутствуют V₂-рецепторы вазопрессина, а интерстициальные клетки содержат только V1a-рецепторы, то рост желатиназной активности под влиянием гормона, продемонстрированный в данном исследовании, может происходить в клетках собирательных трубок. Но, с другой стороны, увеличение секреции клетками почечного сосочка гидролизующих желатин белков наблюдалось только в присутствии вазопрессина, но не десмопрессина. Это указывает на то, что в этом процессе участвуют V₁-рецепторы вазопрессина, которые присутствуют и в интерстициальных клетках.

Полученные нами результаты согласуются с имеющимися в литературе единичными данными, предполагающими особую физиологическую роль желатиназ в собирательных трубках нефронов. На культуре главных клеток собирательных трубок нефронов кроликов авторами было продемонстрировано, что добавление вазопрессина в среду инкубашии клеток подавляло секрешию желатиназы Б. не оказывая никакого влияния на желатиназу А [17]. В настоящем исследовании вазопрессин, наоборот, вызывал рост секреции 57 и 89 кДа-белков, обладающих желатиназной активностью. Данное противоречие можно объяснить как видовыми особенностями, так и тем, что интерстициальные клетки, окружающие собирательные трубки в интактной папилле, могут сами при участии V1-рецепторов вазопрессина секретировать желатиназы, а также оказывать модулирующее влияние на синтез и секрецию собирательными трубками желатиназ. Кроме того, следует отметить, что папиллярные собирательные трубки состоят из клеток, структурно и функционально отличающихся от главных клеток, расположенных в верхней части собирательных трубок [18].

Желатиназы являются одной из групп матриксных металлопротеиназ, включающих два фермента: ММП-2 (желатиназа-А) и ММП-9 (желатиназа-Б). Экспрессия желатиназы А и Б, наряду с другими металлопротеиназами, продемонстрирована для разных отделов нефронов млекопитающих [19]. Субстратом желатиназ являются желатин, коллаген IV типа и целый ряд других интерстициальных белков. Как и все ММП, желатиназы секретируются в межклеточный матрикс в латентной форме, где затем активируются за счет ограниченного протеолиза [7].

Согласно разным литературным источникам молекулярная масса ММП-2 и ММП-9 в латентной форме у крыс находится в районе 68 и 90– 95 кДа, а в активированной – в районе 57–62 и 82– 88 кДа соответственно [17, 20, 21]. Выявленные в данном исследовании белки с молекулярной массой 57 и 52 кДа могут представлять ММП-2 в латентной и активированной форме. Хотя нельзя исключить и того, что это могут быть стромелизины ММП-3 и ММП-10, с молекулярной массой в районе 54 и 62 кДа, субстратом которых также является желатин [13]. К какой группе ММП относятся белки с молекулярной массой 52 и 57 кДа, точно можно будет выяснить в исследованиях с использованием соответствующих антител.

Что касается белка с молекулярной массой в районе 89 кДа, то он, очевидно, представляет собой ММП-9, секреция которого клетками почечного сосочка, также как и секреция 57 кДа-белка, значительно возрастала под влиянием вазопрессина.

Полученные результаты демонстрируют, что вазопрессин может оказывать регулирующее влияние на желатиназную активность клеток почечного сосочка и вызывать секрецию белков, обладающих желатиназной активностью, в межклеточное пространство. Насколько важен данный этап в молекулярном механизме действия гормона, можно будет определить после того, как будет выяснено, какие ММП регулируются вазопрессином. Что, в свою очередь, даст возможность в экспериментах in vivo с использованием соответствующих ингибиторов ММП оценить работу почек при реализации антидиуретического эффекта гормона.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках госзадания ИБМИ ВНШ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией ланной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Ivanova L.N. (2012) Vasopressin: molecular mechanisms of its antidiuretic effect. Neuroscience and Behavioral Physiology 42 (7): 661-677. https://doi.org/10.1007/s11055-012-9618-7
- 2. Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G. (2017) Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. J Intern Med 282 (4): 284-297. https://doi.org/10.1111/joim.12645
- 3. Su W., Cao R., Zhang X.Y., Guan Y. (2020) Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. Am J Physiol Renal Physiol 318 (1): F193-F203. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00304.2019
- 4. Stridh S., Palm F., Takahashi T., Ikegami-Kawai M., Friederich-Persson M., Hansell P. (2017) Hyaluronan Production by Renomedullary Interstitial Cells: Influence of Endothelin, Angiotensin II and Vasopressin. Int. J. Mol. Sci 18 (12): 2701. https://doi.org/10.3390/ijms18122701

5. Ginetzinsky A.G. (1958) Role of hyaluronidase in the reabsorption of water in renal tubules: the mechanism of action of the antidiuretic hormone. Nature 182: 1218-1219.

https://doi.org/10.1038/1821218a0

- 6. Ivanova L.N., Babina A.V., Baturina G.S., Katkova L.E. (2017) The effect of vasopressin on the expression of genes of key enzymes of the interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys. Russian Journal of Genetics: Applied Research 7 (3): 249-257. https://doi.org/10.1134/S2079059717030066
- 7. Tan R.J. and Liu Y. (2012) Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. Am J Physiol Renal Physiol 302 (11): F1351-F1361. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00037

- 8. Дзгоев С.Г. (2020) Влияние коллагеназы на активность гиалуронидазы 1-го типа в почечном сосочке и сыворотке крови белых крыс. Рос физиол журн им И.М. Сеченова 106 (1):78-83. [Dzgoev S.G. (2020) Еffect of Collagenase on Type 1 Hyaluronidase Activity in Renal Papilla and Serum of White Rats. Russ J Physiol 106 (1): 78-83. (In Russ)]. https://doi.org/10.31857/S0869813920010057
- 9. Дзгоев С.Г. (2019) Активность гиалуронидазы 1-го типа в клетках собирательных трубок и интерстиция папиллярной зоны почек крыс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 105 (3): 295-302. [Dzgoev S.G. (2019) Hyaluronidase activity of the 1-st type in the cells of the collecting ducts and interstitium of the papillary zone of rat kidney. Russ J Physiol 105 (3): 295–302. (In Russ)]. https://doi.org/10.1134/S0869813919030038
- 10. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 277:680-685. https://doi.org/10.1038/227680a0
- 11. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

- 12. Kapoor C., Vaidya S., Wadhwan V., Hitesh K.G., Pathak A. (2016) Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). Journal of cancer research and therapeutics 12: 28–35. https://doi.org/10.4103/0973-1482.157337
- 13. Garcia-Fernandez, N., Jacobs-Cachá C., Mora-Gutiérrez, J.M., Vergara A., Orbe J., and Soler M.J. (2020) Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. J Clin Med 9: 472.

https://doi.org/10.3390/jcm9020472

- 14. Natochin Y.V., Golosova D.V. (2020) Vasopressin receptors subtypes and renal sodium transport. Vitamins & Hormones 113: 239-258. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.08.013
- 15. Zhuo J.L. (2000) Renomedullary interstitial cells: a target for endocrine and paracrine actions of vasoactive peptides in the renal medulla. Clin Exp Pharmacol Physiol 27 (7): 465-473.

https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03277.x

- 16. Pannabecker T.L., Dantzler W.H., Layton H.E., and Layton A.T. (2008) Role of three-dimensional architecture in the urine concentrating mechanism of the rat renal inner medulla. Am J Physiol Renal Physiol 295: F1271-F1285. https://doi.org/10.1152/ajprenal.90252.2008
- 17. Piedagnel R., Murphy G., Ronco P.M., and Lelongt B. (1999) Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Are Produced by Kidney Collecting Duct Principal Cells but Are Differentially Regulated by SV40 Large-T, Arginine Vasopressin, and Epidermal Growth Factor. J Biol Chem 274 (3): 1614–1620. https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1614
- 18. Christensen E.I., Wagner C.A., Kaissling B. (2012) Uriniferous tubule: structural and functional organization. Compr Physiol 2: 805-861. https://doi.org/10.1002/cphy.c100073
- 19. Ailenberg M. and Silverman M. (1996) Cellular activation of mesangial gelatinase A by cytochalasin D is accompanied by enhanced mRNA expression of both gelatinase A and its membrane-associated gelatinase

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 **№** 6 2021 A activator (MT-MMP). Biochem J 313 (Pt3): 879–884.

https://doi.org/10.1042/bj3130879

20. Cui N., Hu M., Khalil R.A. (2017) Chapter One-Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol and Transl Sci 147: 1–73. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005

21. *Catania J.M., Chen G., and Parrish A.R.* (2007) Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. Am J Physiol Renal Physiol 292 (3): F905–F911. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00421.2006.

EFFECT OF VASOPRESSIN ON COLLAGENASE ACTIVITY OF RAT RENAL PAPILLARY CELLS

S. G. Dzgoev

Institute of Biomedical Investigations, Vladikavkaz Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia e-mail: stanislavdzgoev@vandex.ru

To find out whether matrix metalloproteinases can be involved in the implementation of the antidiuretic effect of vasopressin, the effect of this hormone on the gelatinase activity of renal papillary cells in Wistar rats was studied by zymography. It was shown that the addition of the hormone to the suspension of renal papillary cells caused an increase in the gelatinase activity of proteins with a molecular weight of 52, 57 and 89 kDa. This effect was imitated by desmopressin, a vasopressin V₂ receptor agonist. Vasopressin, but not desmopressin, caused an increase in the secretion of 57 and 89 kDa proteins by renal papillary cells in the incubation medium. The role of matrix metalloproteinases in vasopressin-induced increasing the water permeability of the intercellular matrix in the rat renal papilla is discussed.

Keywords: vasopressin, desmopressin, renal papilla, gelatinase A and B, antidiuretic effect

—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

ИНДИКАТОРЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПО КЛЕТОЧНЫМ ЭЛЕМЕНТАМ КРОВИ КРЫС

© 2021 г. М. В. Кондашевская^{1,*}, К. А. Артемьева¹, В. В. Алексанкина¹, Н. Б. Тихонова¹, М. Н. Болтовская¹

¹ ФГБНУ "Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына", Москва, Россия

*e-mail: marinavladi2177@yandex.ru Поступила в редакцию 25.03.2021 г. После доработки 10.06.2021 г. Принята к публикации 28.06.2021 г.

Несмотря на то что толерантность к гипоксии во многом определяется генетическими факторами, актуальным является изучение индивидуальных особенностей организма для выявления факторов устойчивости животных к гипоксическому воздействию. Для идентификации показателей как предикторов, позволяющих разделить популяцию животных по признаку толерантности к гипоксии, в работе исследовали клеточный состав и коагуляционную систему периферической крови крыс Вистар. Доказательством обоснованности выбора предикторов служило совпадение разделения популяции по идентифицированным персонифицированным показателям и результатов тестирования животных в барокамере, где создавали разрежение воздуха, соответствующее "подъему на высоту" 11 500 м над уровнем моря. До и после гипоксического воздействия проводили количественное определение форменных элементов периферической крови по восемнадцати параметрам. Выявлены отличия между низкоустойчивыми (НУ), высокоустойчивыми (ВУ) и среднеустойчивыми (СУ) к гипоксии животными по пяти параметрам: абсолютному количеству лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, проценту ретикулоцитов от общего числа эритроцитов и среднему содержанию гемоглобина в эритроците. Значения абсолютного количества эритроцитов, процента ретикулоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците у ВУ крыс были значимо выше, чем у НУ животных (в 1.4, 1.9 и 1.1 раза соответственно). Показатели абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов у ВУ особей оказались ниже, чем у НУ крыс. По оригинальной формуле вычисляли индекс устойчивости к гипоксии (ИУГ). Установлено, что ИУГ НУ крыс ≤0.203, ВУ ≥0.335, а СУ <0.335, но >0.203. Значения активированного частичного тромбопластинового (АЧТВ), тромбинового (ТВ) и протромбинового (ПВ) времени снижались, а уровня фибриногена – повышались после тестирования в барокамере. НУ животные характеризовались наименьшими значениями АЧТВ, ТВ и ПВ и наибольшими – уровня фибриногена. В результате проведенной работы определено, что одним из важнейших механизмов, обусловливающих высокую толерантность к гипоксии, является механизм поддержания реципрокных взаимоотношений между комплексом показателей эритроидного ряда, которым при гипоксии свойственно повышаться, и показателей гранулоцитарного ряда, для которых характерно понижение.

Ключевые слова: устойчивость к гипоксии, клеточные элементы крови, крысы Вистар, коагулограмма **DOI:** 10.31857/S0044452921060061

введение

Достаточно давно известно, что практически при всех заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы, а также в экстремальных стрессовых состояниях формируется патологическая эндогенная гипоксия (низкий уровень содержания кислорода) [1, 2]. В частности, гипоксия является одним из патогенетических механизмов, а также фактором, обусловливающим устойчивость к стандартным методам лечения онкологических заболеваний [3]. Снижение по тем или иным причинам эффективности подачи кислорода тканям обусловливает нарушение регуляции микроциркуляторного русла, экстравазации и активации лейкоцитов в зоне гипоксической микросреды. Многие разновидности инфильтрирующих эту зону иммунных и провоспалительных резидентных клеток в состоянии активации продуцируют значительные количества активных форм кислорода, что приводит к окислительному повреждению и окислительному стрессу, способствующему развитию митохондриальной дисфункции бо́льшей части окружающих клеток. Бо́льшую часть инфильтрирующих зону гипоксии клеток составляют активированные нейтрофилы, высвобождающие во внеклеточное пространство прокоагулянтные биологически активные вещества [4]. В целом все процессы, вызвангипоксией, окислительным стрессом ные нарушением функций митохондрий, провоцируют секрецию сигнальных молекул, дополнительно стимулирующих воспалительную реакцию [5, 6]. Такая ситуация часто сопровождается повреждением эндотелиального гликокаликса, выполняюшего антикоагулянтную функцию, в результате происходит высвобождение таких прокоагулянтных эндотелиальных продуктов, как эндотелин-1, супероксидных анионов, тромбоксана А2, а также снижение биодоступности оксида азота (NO) [6, 7]. В результате консолидации протромботических эффектов нейтрофилов и эндотелия формируется "порочный круг" процессов, усиливающих дисфункцию противосвертывающей системы, обусловливающих доминирование коагуляционной системы крови и возможность перехода местной воспалительной реакции на системный уровень [4].

Продолжительность и тяжесть заболеваний во многом определяются индивидуальным порогом чувствительности к недостатку кислорода, который непосредственно связан с генетическими факторами [8, 9]. Изучение связи устойчивости к гипоксии с особенностями биохимических, клеточных, органных и фенотипических свойств организма животных с целью экстраполяции полученных сведений на человека важно для решения проблемы старения, а также повышения резистентности к гипоксии при различных заболеваниях и работоспособности людей, занятых в профессиях, связанных с большими психофизиологическими и экологическими нагрузками. Экологические нагрузки чаще всего обусловлены антропогенными воздействиями, связанными с загрязнением воздуха, одним из эффектов которого является снижение концентрации кислорода.

В настоящее время приоритетным направлением в экспериментальной биологии и медицине является поиск биомаркеров, устойчивых к гипоксии животных, с целью определения терапевтических мишеней при моделировании различных заболеваний человека и реализации персонифицированного подхода к лечению. В большинстве случаев до начала экспериментов возникает необходимость разделить популяцию лабораторных животных на низкоустойчивых (НУ), среднеустойчивых (СУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии особей. Чаще всего исследователи работают с группами резко отличающихся по всем параметрам животных, т.е. с НУ и ВУ. В настоящее время известно, что НУ особи характеризуются неэкономичным расходованием кислорода – на единицу массы ткани в единицу времени они тратят кислорода значительно больше, чем ВУ особи. Тогда как у ВУ животных развиты механизмы более эффективной адаптации к гипоксии, поэтому они способны переносить длительное воздействие дефицита кислорода [10]. Для

разделения популяции лабораторных животных применяют тестирование по одиночке в барокамере, где создаются условия острой гипоксии. В биомедицинских исследованиях воспроизводится несколько различных видов гипоксии, среди которых наиболее часто используется имитация экзогенной гипобарической гипоксии [11]. Эту ситуацию искусственно воспроизводят путем управляемого откачивания воздуха из барокамеры, при этом снижение содержания кислорода в окружающей среде приводит к уменьшению напряжения кислорода (рО₂) в альвеолярном воздухе и артериальной крови. Последнее обусловливает падение напряжения кислорода в крови и тканях до уровней ниже критических, т.е. таких, при которых начинает снижаться скорость утилизации (потребления) кислорода тканями, в результате у животных развивается вторичная тканевая гипоксия. Если сила и/или длительность гипоксического воздействия превышают адаптационные возможности организма, в органах и тканях происходят необратимые изменения и животные гибнут.

Выявление взаимосвязи тех или иных физиологических показателей в предгипоксическом периоде с уровнем гипоксической устойчивости позволило бы прогнозировать индивидуальную резистентность лабораторных животных к гипоксии без использования тестирования в барокамере, при котором происходит повреждение ШНС, возможна гибель животных, а для выживших особей при проведении дальнейших исследований требуется длительное (не менее 1 мес) восстановление организма [9, 12]. Любое гипоксическое состояние индуцирует сложный комплекс ответных реакций, в который включены все функциональные системы организма. Основным и наиболее хорошо изученным фактором, опосредующим этот ответ, является транскрипционный комплекс HIF-1 (HIF-1α и HIF-1β субъединицы), вырабатываемый большинством клеток в ответ на недостаток кислорода. HIF-1β — это конститутивно экспрессируемая субъединица, тогда как HIF-1а – регулируемая кислородом субъединица [13]. Показано, что уровень экспрессии HIF-1α в лейкоцитах у людей и животных значительно варьирует, что свидетельствует о фенотипических различиях его регуляции [14, 15]. Однако HIF-1α сложно использовать в качестве предиктора устойчивости к гипоксии в связи с изменением его уровня в зависимости от множества факторов. Даже вопрос о таргетном фармакологическом воздействии на HIF-1а с целью направленного регулирования процессов срочной и долговременной адаптации животных и человека к гипоксии рассматривается неоднозначно, так как вклад HIF-1α в патогенез любого заболевания, как правило, постоянно меняется [16]. Это же правило касается многих нейроиммуноэндокринных показателей.

Бесспорно наиболее привлекательным объектом исследований, направленных на обнаружение предикторов гипоксии, представляется кровь, являющаяся основным путем переноса кислорода от легких к тканям и транспорта углекислого газа в обратном направлении. При любых вызовах внешней среды, в том числе и при гипоксии, клетки эритроидного ряда, изменяясь в числе, размерах, содержании кислорода и др., продолжают выполнять свои специфические функции. В условиях гипоксии лейкоциты, большую часть которых у мелких лабораторных грызунов составляют нейтрофилы, активизируются. Определено, что одним из активаторов лейкоцитов является HIF-1α, который играет решающую роль в регуляции клеточных ответов на гипоксию. Активированные лейкоциты могут влиять на коагуляцию напрямую, продуцируя прокоагулянтные и антикоагулянтные молекулы, и/или косвенно, воздействуя на тромбоциты и эндотелиальные клетки. Появление большого количества активированных лейкоцитов способно замедлять движение эритроцитов, стать непосредственной причиной закупорки микрососудов и снижения эффективности транспортировки кислорода кровью, что провоцирует гипоксию в микроциркуляции [17, 18].

Мы предположили, что анализ показателей клеточных элементов крови в предгипоксическом периоде позволит установить предикторы устойчивости к острой гипоксической гипоксии. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение клеточного состава и коагуляционной системы периферической крови крыс Вистар до и после тестирования в барокамере с последующим выделением ряда показателей в виде предикторов, позволяющих разделить популяцию животных по признаку толерантности к гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 40 крысах-самцах Вистар (филиал "Столбовая" Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России) с массой тела 180–200 г.

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

Животных, прошедших карантин не менее 14 дней, содержали в стандартных условиях вивария, рассаживая в клетки по 10 особей случайным образом, при естественном освещении, температуре 20–22°С. Доступ к воде и полноценному гранулированному корму (ГОСТ 34566-2019) был свободным.

Персонифицированную устойчивость животных к гипоксии определяли, моделируя острую гипоксическую гипоксию при помощи барокамеры. Для достижения сходства условий регистрации, ее проводили в утренние часы (с 9 до 11 ч), а также учитывали фазу инфрадианных биоритмов — многодневных периодически повторяющихся изменений характера и интенсивности биологических процессов, колебаний различных показателей животных и человека, по нашим данным, в основном 4-суточных, проводя тестирование между акрофазой и батифазой — наибольшими и наименьшими значениями показателей уровня кортикостерона, локомоторной активности и др. [9, 19].

Создаваемое в барокамере разрежение воздуха соответствовало "подъему на высоту" 11500 м над уровнем моря. "Подъем" осуществляли со скоростью 80 м/с. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время потери позы которых (время от момента окончания "подъема" до принятия животным бокового положения) "на высоте" составляло более 9 мин, к низкоустойчивым — менее 3 мин, к среднеустойчивым — более 3 мин, но менее 9 мин [20].

Забор периферической крови из хвостовой вены производили под золетиловым наркозом (5 мг/100 г, Virbac Sante Animale, Франция) в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта за сутки до моделирования острой гипоксической гипоксии и через 5-10 м после. Используя автоматический гематологический анализатор Mindray BC-2800 Vet (Китай) с программным обеспечением Rat, проводили количественное определение форменных элементов крови по 18 параметрам (WBC, Lymph#, Mon#, Gran#, Lymph%, Mon%, Gran%, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT, MPV, PDV, RTC). Показатели коагуляционного гемостаза определяли, используя полуавтоматический анализатор гемостаза модели КС4 Delta (Тсоад, Ирландия). Концентрацию кортикостерона в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов (IBL, Германия).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Характер распределения признаков оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Было установлено, что эмпирическое распределение полученных нами данных отличается от нормального. Для статистической обработки использовали непараметрический метод парных сравнений – U-критерий Манна–Уитни Т-критерий Уилкоксона–Манн–Уитни. Результаты выражали в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме (25–75%)). Различия считали значимыми при p < 0.05.

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

| Фено- типы | Условия | (RBC) Абсолютное количество эритро- цитов ×10 ¹² /л | (RTC) Рети- кулоциты, % от RBC | (МСН) Среднее содержание гемоглобина в RBC, пг | (WBC) Абсолютное количество лейко- цитов, ×10 ⁹ /л | (Gran#) Абсолютное количество грануло- цитов, ×10 ⁹ /л |
|---------------|-------------|--|--------------------------------------|---|---|---|
| ВУ (1) | До Б (3) | 9.2 | 3.2 | 20.1 | 8.8 | 2.9 |
| | | (4.7–11.7) | (1.8–4.4) | (19.7–21.2) | (4.3–12.9) | (2.3–3.6) |
| | | p1-2 < 0.001 | p1-2 < 0.001 | p1-2 < 0.001 | p1-2 < 0.001 | p1-2 < 0.001 |
| | | <i>p</i> 3–4 < 0.001 | p3-4 < 0.001 | p3-4 < 0.001 | p3-4 < 0.001 | p3-4 > 0.05 |
| | После Б (4) | 12.3 | 9.2 | 22.1 | 13.1 | 5.1 |
| | | (9.2–13.9) | (5.1–12.6) | (21.8–31.1) | (8.8–16.6) | (3.3–6.1) |
| | | p1-2 < 0.001 | $p1{-}2 < 0.001$ | p1-2 < 0.001 | p1-2 < 0.001 | p1-2 < 0.001 |
| НУ (2) | До Б (5) | 6.4 | 1.7 | 19.1 | 19.2 | 3.7 |
| | | (3.9–9.3) | (0.8 - 2.6) | (18.5–19.7) | (11.9–29.8) | (3.8–4.6) |
| | | <i>p</i> 5–6 < 0.001 | p5-6 < 0.001 | p5-6 > 0.05 | p5-6 < 0.001 | p5-6 < 0.001 |
| | После Б (6) | 8.5 | 4.8 | 19.9 | 36.6 | 7.4 |
| | | (5.9–11.9) | (1.6–5.2) | (18.9–21.5) | (22.9–54.7) | (5.9-8.9) |

Таблица 1. Гематологические показатели высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс до и после тестирования в барокамере (Б), Ме (25–75%)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ всех параметров крови с дифференциацией субпопуляций клеточных элементов позволил установить статистически значимые отличия между низкоустойчивыми (НУ), высокоустойчивыми (ВУ) и среднеустойчивыми (СУ) к гипоксии крысами только по пяти параметрам: абсолютному количеству лейкошитов, гранулошитов, эритрошитов, проценту ретикулоцитов от общего числа эритроцитов и среднему содержанию гемоглобина в эритроците. Как видно из представленных в табл. 1 данных, у ВУ крыс значения абсолютного количества эритроцитов, процента ретикулоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците были статистически значимо выше, чем у НУ животных (в 1.4, 1.9 и 1.1 раза соответственно) как до, так и после тестирования в барокамере (табл. 1). В этих же условиях показатели абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов у ВУ особей оказались гораздо ниже, чем у НУ крыс (табл. 1). Так, если в норме количество лейкоцитов у ВУ особей было ниже в 2.2 раза, а гранулоцитов — в 1.3 раза, то после тестирования в барокамере различия составляли 2.8 и 1.5 раза соответственно (табл. 1). В целом сразу после тестирования крыс в барокамере наблюдалось увеличение всех исследуемых параметров клеток крови у всех животных (табл. 1). Значения показателей СУ крыс были выше НУ животных, но ниже ВУ особей. Многие измеряемые гематологические показатели СУ крыс не имели статистически значимых отличий как от НУ, так и ВУ животных, в связи с этим мы не стали приводить их значения в таблице.

Ввиду разброса амплитуд и единиц измерения изучаемых нами показателей крови Нагорневым и соавт. была разработана формула индекса устойчивости к гипоксии (ИУГ) на основе формулы для интегративной оценки функциональных резервов организма [21]:

$$\mathcal{W}\mathcal{Y}\Gamma=1/\sqrt{\left(\frac{\Delta AK\mathcal{Y}}{AK\mathcal{Y}\phi oH}\right)^{2}+\left(\frac{\Delta C\Gamma\mathcal{Y}}{C\Gamma\mathcal{Y}\phi oH}\right)^{2}+\left(\frac{\Delta \Pi P\mathcal{Y}}{\Pi P\mathcal{Y}\phi oH}\right)^{2}+\left(\frac{\Delta AK\Pi}{AK\Pi\phi oH}\right)^{2}+\left(\frac{\Delta AK\Gamma}{AK\Gamma\phi oH}\right)^{2}$$

где Δ — прирост вычисляемых показателей крови по сравнению со средним значением в исследуемой группе, фон — среднее значение вычисляемых показателей крови в исследуемой группе, АКЭ абсолютное количество эритроцитов, СГЭ — среднее содержания гемоглобина в эритроците, ПРЭ процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов, АКЛ — абсолютное количество лейкоцитов, АКГ — абсолютное количество гранулоцитов. Было установлено, что в норме ИУГ низкоустойчивых крыс характеризуются значениями, равными, или ниже 0.203, высокоустойчивых равными или выше 0.335, а среднеустойчивых ниже 0.335, но выше 0.203.

Важнейшим доказательством того, что абсолютное количество лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов, а также среднее содержание гемоглобина в эритроците могут являться предикторами

| Фенотипы | Условия | АЧТВ, сек | ТВ, сек | ПВ, сек | Фибриноген, г/л | Кортикостерон, нг/мл |
|----------|-------------|--|---|--|---|--|
| ВУ (1) | До Б (3) | 17.3 (15.9-18.3) p1-2 > 0.05 p3-4 > 0.05 | 38.4 (32.9-44.1) $p1-2 > 0.05$ $n3-4 > 0.05$ | 18.6 (17.9-19.2) $p1-2 > 0.05$ $n3-4 > 0.05$ | 2.3 (2.1-2.4) $p1-2 > 0.05$ $n3-4 < 0.001$ | 255.6 $(226.2-286.7)$ $p1-2 > 0.05$ $p3-4 < 0.001$ |
| | После Б (4) | $ \begin{array}{r} 16.4 \\ (12.7-17.5) \\ p1-2 < 0.001 \end{array} $ | $\begin{array}{r} 34.6\\(33.3-37.1)\\p1-2 < 0.001\end{array}$ | | $\begin{array}{c} 2.5\\(2.2-2.7)\\p_{1-2} < 0.001\end{array}$ | $\begin{array}{r} 425.3\\ (361.4-489.2)\\ p1-2 > 0.05 \end{array}$ |
| НУ (2) | До Б (5) | 15.6 (11.5–18.4) <i>p</i> 5–6 < 0.001 | 36.7 (31.8–40.9) <i>p</i> 5–6 < 0.001 | 17.9 (16.5–19.1) <i>p</i> 5–6 < 0.001 | 2.3 (2.1–2.7) <i>p</i> 5–6 < 0.001 | 250.3 (227.5-267.9) $p5-6 < 0.001$ |
| | После Б (6) | 10.3 (8.5–12.1) | 21.8 (19.8–24.4) | 14.7 (13.7–16.1) | 3.7 (3.4–4.1) | 436.4 (335.1–531.6) |

Таблица 2. Показатели коагуляционного гемостаза и уровня кортикостерона у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс до и после тестирования в барокамере (Б), Ме (25–75%)

толерантности крыс к гипоксии, было тестирование животных в барокамере. Нами обнаружено, что при "подъеме до высоты" 11 500 м время до потери позы НУ крыс было менее 4 мин. Отмечено, что почти во всех случаях НУ животные начинали метаться по барокамере, не достигая уровня предельной "высоты", у некоторых из них начинались признаки проявления судорог, 3 крысы умерли после тестирования. СУ животные выдерживали максимальную "высоту" не более 9 мин. Поведение этих крыс характеризовалось беспокойством и энергичными побежками в начале достижения максимального уровня, успокаиваясь через 4-5 мин. ВУ особи отличались выраженным спокойствием и способностью пребывать на "высоте" 11 500 м более 9 мин. Всего в популяции из 40 крыс 30% оказалось ВУ, 40% – НУ и 30% – СУ. Необходимо подчеркнуть, что индивидуальные признаки толерантности к гипоксии ВУ, СУ и НУ крыс, определяемые при тестировании в барокамере, совпали по значениям ИУГ в норме (до тестирования).

Такие компоненты крови, как лейкоциты, в частности гранулоциты, вносят значительный вклад в состояние гемостаза, который оказывает серьезное влияние на транспорт и утилизацию кислорода тканями и, соответственно, на толерантность к гипоксии [22–24]. В связи с этим мы изучали коагуляционный гемостаз у крыс до и после тестирования в барокамере.

Обнаружено, что в норме значения исследуемых показателей гемостаза не имели статистически значимых различий между показателями ВУ, и НУ и СУ крыс, тогда как после тестирования в барокамере значения АЧТВ, ТВ и ПВ снижались, а уровня фибриногена – повышались (табл. 2). Показано, что для НУ животных характерны наименьшие значения АЧТВ, ТВ и ПВ и наибольшие – уровня фибриногена (табл. 2). Уровни кортикостерона, определяемые в сыворотке крови в норме и после тестирования крыс в барокамере, не имели статистически значимых отличий между животными с различной толерантностью к гипоксии (табл. 2). Безусловно, содержание кортикостерона существенно повышалось после барокамеры, как и в любом случае острого стресса [25] (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценивая в настоящем исследовании клеточный состав периферической крови крыс Вистар в период, предшествующий гипоксическому воздействию и после него, установлено, что показатели абсолютного количества лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов, а также среднее содержание гемоглобина в эритроците могут быть использованы в качестве предикторов устойчивости к гипоксии. По сравнению с НУ крысами ВУ животные в норме характеризуются значительно более высокими показателями абсолютного количества эритроцитов, процента ретикулоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритроците, а также более низкими значениями абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов. Такие же соотношения всех указанных элементов крови сохраняются и после тестирования крыс в барокамере. Полученные нами данные перекликаются со сведениями Л.А. Гридина, который установил, что гипоксия, как специфический стимулятор эритропоэза, активизирует механизмы, приволяшие к компенсаторному, адаптационному, снижению воспроизводства клеток белой крови в костном мозге [26]. В нашем исследовании была зарегистрирована, возможно, генетически закрепленная, повышенная мобилизационная готовность организма ВУ крыс к реакции на гипоксию, или другие стрессорные воздействия в виде механизма подавления воспроизводства клеток гранулоцитарного ряда и интенсификации приумножения клеток эритроидного ряда. Возможно, это объясняется тем, что в случае значительного преобладания лейкоцитарного звена, несмотря на его защитную функцию, может произойти катастрофа, так как гранулоциты, составляющие бо́льшую часть лейкоцитов у лабораторных грызунов, мгновенно реагируют на экстренную ситуацию выбросом большого количества токсичных для альтерирующих агентов веществ, но оказывающих негативное воздействие также и на организм хозяина. При этом может повреждаться эндотелий кровеносных сосудов, что вызывает активацию свертывающей системы. Указанные эффекты нейтрофилов, представляющих значительную часть гранулоцитарного звена популяции лейкоцитов, теперь хорошо известны при изучении их действия при заболевании COVID-19 [27, 28].

Среди причин снижения толерантности к гипоксии. повышение свертываемости крови играет значительную роль [29, 30]. В нашей работе установлено, что после пребывания в условиях острой гипоксической гипоксии, у НУ крыс наблюдалось состояние гиперкоагуляции по внутреннему (сокращение времени АЧТВ) и внешнему (сокращение протромбинового времени) пути активации свертывания крови, что усугублялось повышенным уровнем фибриногена. Причинами этого могли быть повреждение сосудистой стенки активными формами кислорода и повышенное по сравнению с ВУ количество активированных гипоксией лейкоцитов (гранулоцитов в частности), высвобождающих прокоагуляционные факторы [17, 24, 31]. Полученные нами данные согласуются с данными других исследователей [32-34]. Повышение содержания фибриногена в крови в ответ на увеличение кортикостерона в результате стресса, вероятно, являлось причиной сокращения показателя тромбинового времени, которое отражает превращение фибриногена в фибрин и зависит от количества фибриногена в крови [35].

Доказательством того, что по значениям ИУГ возможно определять индивидуальную толерантность крыс к гипоксии, было тестирование крыс в барокамере. Как известно, кроме гипоксических стимулов, на живые организмы в барокамере действуют факторы стресса. В физиологии принято выделять две качественно различающиеся тактики адаптации к неблагоприятным условиям среды, характерные для всех этапов эволюции – резидентную, характеризующуюся активным преодолением действия стрессорного фактора, и толерантную, обусловленную спокойным восприятием вмешательства раздражителя. Эти тактики обслуживаются различными нейроиммуноэндокринными механизмами [36, 37]. Судя по нашим данным, в барокамере ΗУ крысы демонстрировали ярко выраженную резидентную тактику, которая обусловливала перерасход запасов кислорода, и животные быстро утрачивали способность поддерживать позу на 4-х конечностях. В то время как ВУ крысы характеризовались толерантной тактикой, которая способствовала длительной экономии расходов кислорода. СУ крысы демонстрировали смену этих тактик, что детерминировало промежуточные между ВУ и НУ результаты времени сохранения позы. Считается, что так же, как толерантность к гипоксии, проявление тактик поведения закреплено генетически [37, 38]. В наших предыдущих работах на крысах Вистар было показано, что использование умеренной физической нагрузки в виде плавания позволяет добиться выработки толерантного поведения у большей части популяции. Одновременно с этим, удалось установить, что животные, усвоившие толерантную тактику поведения, становились ВУ, а не обучившиеся остались НУ. Учитывая сведения о том, что толерантность к гипоксии закреплена генетически, а СУ особи, вероятнее всего, устойчивы к гипоксии, то можно полагать, что к ВУ особям примкнули СУ, усвоившие толерантную тактику как основной принцип поведения. Проведенные исследования дают основание для постановки проблемы включения поведенческих механизмов в интегративный ответ организма животных и человека на острую гипоксию.

Таким образом, в проведенном исследовании зарегистрирована, возможно, генетически закрепленная, повышенная мобилизационная готовность организма ВУ крыс к реакции на гипоксию в виде механизма подавления воспроизводства клеток белой крови и усиления эритропоэза, а также определены предикторы толерантности к гипоксии: абсолютное количество лейкоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, процент ретикулоцитов от общего числа эритроцитов. Разработана формула для вычисления индекса устойчивости к гипоксии (ИУГ), позволяющая произвести разделение популяции крыс на ВУ, НУ и СУ без использования тестирования в барокамере. Установлено, что ИУГ низкоустойчивых крыс характеризуются значениями, равными или ниже 0.203, высокоустойчивых – выше 0.335, а среднеустойчивых – ниже 0.335, но вы-Прогнозирование индивидуальной ше 0.203. устойчивости лабораторных животных к гипоксии в предгипоксическом периоде представляет интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения, поскольку в ситуации острой гипоксической гипоксии происходит повреждение ЦНС, возможна гибель животных, а для выживших особей при проведении дальнейших исследований требуется длительное (не менее 1 мес) восстановление организма. Выявление взаимосвязи тех или иных физиологических показателей в предгипоксическом периоде с уровнем гипоксической устойчивости позволяет улучшить точность прогноза об исходе острого гипоксического воздействия, что имеет важное значение для представителей профессий, деятельность которых связана с риском развития гипоксических состояний. Кроме того, это важно для поиска терапевтических мишеней при моделировании различных заболеваний человека с целью разработки персонифицированного подхода к лечению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ "НИИ морфологии человека" АААА-А19-119021490067-4.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Кондашевская осуществляла планирование, сбор данных, написание статьи. К.А. Артемьева, В.В. Алексанкина и Н.Б. Тихонова осуществляли техническую поддержку при проведении экспериментов, участвовали в обработке и обсуждении экспериментальных данных. М.Н. Болтовская участвовала в обработке и обсуждении экспериментальных данных, осуществляла редактирование статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Semenza G.L.* (2014) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. Annu Rev Pathol 9: 47–71.

https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104720

- Luks A.M., Swenson E.R., Bärtsch P. (2017) Acute highaltitude sickness. Eur Respir Rev 26 (143): 160096. https://doi.org/10.1183/16000617.0096-2016
- 3. *Multhoff G., Vaupel P.* Hypoxia Compromises Anti-Cancer Immune Responses. Adv Exp Med Biol. 2020; 1232: 131–143.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-34461-0_18

4. *Chen Y.C., Ho C.W., Tsai H.H., Wang J.S.* (2015) Interval and continuous exercise regimens suppress neutrophilderived microparticle formation and neutrophil-promoted thrombin generation under hypoxic stress. Clin Sci (Lond) 128 (7): 425–436.

https://doi.org/10.1042/CS20140498

5. *McGarry T., Biniecka M., Veale D.J., Fearon U.* (2018) Hypoxia, oxidative stress and inflammation. Free Radic Biol Med 125: 15-24.

https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042

- Gonzalez N.C., Wood J.G. (2010) Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO(2) does and does not do. Adv Exp Med Biol 662: 27–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1241-1 3
- Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. (2016) Эндотелины в норме и патологии. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Медицинские науки. INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH. MEDICAL SCIENCES. 10: 210–214 [Dremina N.N., Shurygin M.G., Shurygina I.A. (2016) Endothelins in standard and pathology. International Journal of Applied and Fundamental Research. Medical sciences. INTERNATIONAL JOURNAL OF AP-PLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH. MEDI-CAL SCIENCES 10: 210–214. (In Russ.)]
- Ржепецкая М.К. (2017) Генетические маркеры как показатель устойчивости человека к различным эколого-профессиональным факторам. Известия Российской Военно-медицинской академии. 36 (4): 6–13. [Rzhepetskaya M.K. (2017) Genetic markers as an indicator of human resistance to various environmental and occupational factors. Proceedings of the Russian Military Medical Academy 36 (4): 6–13. (In Russ.)]
- 9. Dzhalilova D.S., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Makarova O.V. (2017) Relationship between Hypoxic Resistance and the Phase of 4-Day Corticosterone Biorhythm in Adult Male Rats. Bull Exp Biol Med 163: 687–690. https://doi.org/10.1007/s10517-017-3879-7
- Pavlik L.L., Mikheeva I.B., Al'-Mugkhrabi Y.M., Berest V.P., Kirova Y.I., Germanova E.L., Luk'yanova L.D., Mironova G.D. (2018) Specific Features of Immediate Ultrastructural Changes in Brain Cortex Mitochondria of Rats with Different Tolerance to Hypoxia under Various Modes of Hypoxic Exposures. Bull Exp Biol Med. 164 (3): 376–381. https://doi.org/10.1007/s10517-018-3993-1
- Каркищенко Н.Н. (2017) Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации. М. ФМБА России [Karkishchenko N.N. (2017) Biomedicinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksicheskoj aktivnosti lekarstvennyh sredstv. Metodicheskie rekomendacii [Biomedical (preclinical) study of antihypoxic activity of drugs. Methodological recommendations]. M. FMBA of Russia (In Russ.)]
- 12. Байбурина Г.А., Нургалеева Е.А., Дроздова Г.А. (2016) Влияние экстремальной гипоксии на гормональный профиль и динамику свободнорадикальных процессов в головном мозге крыс с различным фенотипом устойчивости к гипоксии. Здоровье и образование в XXI веке. 18 (6): 95–98. [Baiburina G.A., Nurgalieva E.A., Drozdova G.A. (2016) Influence of extreme hypoxia on the hormonal profile and dynamics of free radical processes in the brain of rats with different phenotypes of resistance to hypoxia. Health and education in the XXI century. 2016; 18 (6): 95–98 (In Russ.)]
- 13. *Hirai K., Furusho H., Hirota K., Sasaki H.* (2018) Activation of hypoxia-inducible factor 1 attenuates periapical inflammation and bone loss. Int J Oral Sci. 10 (2): 12. https://doi.org/10.1038/s41368-018-0015-0

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

- Brooks J.T., Elvidge G.P., Glenny L., Gleadle J.M., Liu C., Ragoussis J., Smith T.G., Talbot N.P., Winchester L., Maxwell P.H., Robbins P.A. (2009) Variations within oxygenregulated gene expression in humans. J Appl Physiol (1985). 106 (1): 212–220. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.90578.2008
- van Patot M.C., Gassmann M. (2011) Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2a. High Alt Med Biol. 12 (2): 157–167. https://doi.org/10.1089/ham.2010.1099
- Kabei K., Tateishi Y., Shiota M., Osada-Oka M., Nishide S., Uchida J., Nakatani T., Matsunaga S., Yamaguchi T., Tomita S., Miura K. (2020) Effects of orally active hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor, FG4592 on renal fibrogenic potential in mouse unilateral ureteral obstruction model. J Pharmacol Sci. 142 (3): 93–100.

https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.12.002

- Gaertner F., Massberg S. (2016) Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity. Semin Immunol 28 (6): 561–569. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.010
- Tikhomirova I., Petrochenko E., Malysheva Y., Ryabov M., Kislov N. (2016) Interrelation of blood coagulation and hemorheology in cancer. Clin Hemorheol Microcirc 64 (4): 635–644. https://doi.org/10.3233/CH-168037
- Kondashevskaya M.V., Diatroptov M.E. (2013) Behavioral Characteristics of Ovariectomied Wistar Rats Trained in a Maze. Effect of Mental Stress and Castration for Infradian Rhythms. Bull Exp Biol Med 155: 272–276. https://doi.org/10.1007/s10517-013-2130-4
- Dzhalilova D.S., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Makarova M.A., Makarova O.V. (2019) Liver and lung morphology and phagocytic activity of peripheral blood cells during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia. Clin Exp Morphol 29: 47–55. (In Russ.). https://doi.org/31088/2226-5988-2019-29-1-47-55
- Нагорнев С.Н., Бобровницкий И.П., Хрипач Л.В., Худов В.В. (2017) Иммуно-биохимический скрининг и метаболические нагрузочные тесты в оценке функциональных резервов организма. Russian Journal of Rehabilitation Medicine 2: 3–38 [Nagornev S.N., Bobrovnitsky S.P., Khripach L.V., Khudov V.V. (2017) Immuno-biochemical screening and metabolic load tests in the assessment of functional reserves of the body. Russian Journal of Rehabilitation Medicine 2: 3–38 (In Russ.)]
- 22. Finsterbusch M., Schrottmaier W.C., Kral-Pointner J.B., Salzmann M., Assinger A. (2018) Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. Platelets 29: 677– 685.

https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1430358

- 23. Lodge K.M., Cowburn A.S., Li W., Condliffe A.M. (2020) The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host. Int J Mol Sci 21: 1183. https://doi.org/10.3390/ijms21041183
- Egners A., Erdem M., Cramer T. (2016) The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. Mediators Inflamm. Article ID 2053646. https://doi.org/10.1155/2016/2053646

25. Obernikhin S.S., Yaglova N.V., Nazimova S.V., Yaglov V.V., Timokhina E.P. (2019) Transcriptional regulation of morphogenesis of rat adrenal zona glomerulosa during postnatal development. Clin Exp Morphol. 8: 48–54. (In Russ.).

https://doi.org/10.31088/2226-5988-2019-30-2-48-54

- 26. Гридин Л.А. (2016) Современные представления о физиологических и лечебно-профилактических эффектах действия гипоксии и гиперкапнии. Журнал "Медицина" 3: 45–68 [Gridin L.A. (2016) Modern ideas about the physiological and therapeutic and preventive effects of hypoxia and hypercapnia. Journal of Medicine 3: 45–68 (In Russ.)]
- Lv D., Xu Y., Cheng H., Ke Y., Zhang X., Ying K. (2020) A novel cell-based assay for dynamically detecting neutrophil extracellular traps-induced lung epithelial injuries. Exp Cell Res. 394:112101. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112101
- Colling M.E., Kanthi Y. (2020) COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. Vasc Med 25: 471-478. https://doi.org/10.1177/1358863X20932640
- 29. Shang C., Wuren T., Ga Q., Bai Z., Guo L., Eustes A.S., McComas K.N., Rondina M.T., Ge R. (2020) The human platelet transcriptome and proteome is altered and prothrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. Platelets 31:33–42.

https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1572876

30. Viecca M., Radovanovic D., Forleo G.B., Santus P. (2020) Enhanced platelet inhibition treatment improves hypoxemia in patients with severe Covid-19 and hypercoagulability. A case control, proof of concept study. Pharmacol Res 158: 104950. https://doi.org/10.1016/j.phgs.2020.104050

https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104950

- 31. Li X., Yang Y., Liu L., Yang X., Zhao X., Li Y., Ge Y., Shi Y., Lv P., Zhang J., Bai T., Zhou H., Luo P., Huang S. (2020) Effect of combination antiviral therapy on hematological profiles in 151 adults hospitalized with severe coronavirus disease 2019. Pharmacol Res 160: 105036. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105036
- 32. Tyagi T., Ahmad S., Gupta N., Sahu A., Ahmad Y., Nair V., Chatterjee T., Bajaj N., Sengupta S., Ganju L., Singh S.B., Ashraf M.Z. (2014) Altered expression of platelet proteins and calpain activity mediate hypoxia-induced prothrombotic phenotype. Blood 123 (8): 1250–60. https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501924
- 33. O'Brodovich H.M., Andrew M., Gray G.W., Coates G. (1984) Hypoxia alters blood coagulation during acute decompression in humans. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol. 56 (3): 666–670. https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.3.666
- Bärtsch P., Haeberli A., Hauser K., Gubser A., Straub P.W. (1988) Fibrinogenolysis in the absence of fibrin formation in severe hypobaric hypoxia. Aviat Space Environ Med. 59 (5): 428–432.
- Atencio A.C., Chao P.Y., Chen A.Y., Reeve E.B. (1969) Fibrinogen response to corticotropin preparations in rabbits. Am J Physiol. 216 (4): 773–780. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.216.4.773
- Цейликман В.Э., Цейликман О.Б., Синицкий А.И., Лавин Е.А., Лаптева И.А., Горностаева А.Б., Борисенков А.В., Нусратов М.И., Романов Д.А. (2008)

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

482

Биохимические стратегии адаптации в условиях хронического стресса. Вестник ЮУрГУ 4: 56–57 [Tseilikman V.E., Tseilikman O.B., Sinitsky A.I., Levin E., Lapteva I.A., Gornostaeva A.B., Borisenkov A.B., Nusratov M.I., Romanov D.A. (2008) Biochemical strategies of adaptation in conditions of chronic stress. Bulletin of South Ural State University 4: 56–57 (In Russ.)].

37. Байбурина Г.А., Нургалеева Е.А., Никитина И.Л., Булыгин К.В., Самигуллина А.Ф., Аглетдинов Э.Ф. (2017) Взаимосвязи уровней циркулирующего кортикостерона, экспрессии центральных кортикостероидных рецепторов и изменения поведенческой активности крыс с разной устойчивостью к гипоксии в динамике восстановления после экстремальной гипоксии. Современные проблемы науки и образования. 4: 36 [Baiburina G.A., Nurgaleeva E.A., Nikitina I.L., Bulygin K.V., Samigullina A.F., Agletdinov E.F. (2017) The relationship between the levels of circulating corticosterone, the expression of central corticosteroid receptors, and changes in the behavioral activity of rats with different resistance to hypoxia in the dynamics of recovery after extreme hypoxia. Modern problems of science and education. 4: 36]

 Perez-Tejada J., Garmendia L., Labaka A., Vegas O., Gómez-Lazaro E., Arregi A. (2019) Active and Passive Coping Strategies: Comparing Psychological Distress, Cortisol, and Proinflammatory Cytokine Levels in Breast Cancer Survivors. Clin J Oncol Nurs. 23 (6): 583–590. https://doi.org/10.1188/19.CJON.583-590

INDICATORS OF HYPOXIA TOLERANCE ARE DETERMINED BY THE CELLS OF RAT BLOOD

M. V. Kondashevskaya^{*a*,#}, K. A. Artemieva^{*a*}, V. V. Aleksankina^{*a*}, N. B. Tikhonova^{*a*}, and M. N. Boltovskaya^{*a*}

^a A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia [#]e-mail: marinavladi2177@yandex.ru

Even though hypoxia tolerance is mainly determined genetically, the research of the individual variability in the tolerance to hypoxia is important. In this study, we investigated the numbers of circulating blood cells and the coagulation system in Wistar rats as predictors that allow splitting the animal population between hypoxia tolerant and non-tolerant. The proof of the choice of reasonable predictors was the matching population split in accordance with detected individual parameters and the results of testing in a pressure chamber with rarefied air corresponding to the altitude of 11 500 m above the sea level. The quantitative assessment of circulating blood cells was performed according to eighteen parameters before and after hypoxic exposure. The differences between low-tolerant (LT), high-tolerant (HT) and medium-tolerant (MT) animals to hypoxia were identified by five parameters: white blood cell counts (WBC), granulocyte counts (Gran#), red blood cell counts (RBC), % reticulocyte (RTC) and mean corpuscular hemoglobin (MCH). The values of RBC, RTC, and MCH in HT rats were significantly higher than in LT animals (by 1.4, 1.9, and 1.1 times, respectively). The values of WBC and Gran# in HT rats were lower than in LT individuals. The hypoxia tolerance index (HTI) was calculated using the original formula. It was found that HTI in LT rats is ≤ 0.203 , in HT rats ≥ 0.335 , and in MT rats < 0.335 but > 0.203. The activated partial thromboplastin time (APTT), the thrombin time (TT), and the prothrombin time (PT) decreased, but the fibrinogen level increased after testing in a pressure chamber. LT rats were characterized by the lowest values of APTT, TT, and PT and the highest values of the fibrinogen level. As a result of the study, it was determined that one of the most important mechanisms causing a high tolerance to hypoxia is the maintenance mechanism of reciprocal relationships between the complex of the RBC indicators, which tend to increase with hypoxia, and the indicators of granulocytes, which are characterized by a decrease.

Keywords: hypoxia tolerance, blood cells, Wistar rats, coagulogram

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ВЛИЯНИЕ Na⁺ НА НАГРУЖЕННЫЕ КАЛЬЦИЕМ МИТОХОНДРИИ СЕРДЦА КРЫСЫ И МИОКАРД ЛЯГУШКИ

© 2021 г. С. М. Коротков^{1,*}, К. В. Соболь¹, И. В. Шемарова¹, В. П. Нестеров¹

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

> *e-mail: korotkov@SK1645.spb.edu Поступила в редакцию 28.06.2021 г. После доработки 29.07.2021 г. Принята к публикации 06.08.2021 г.

Проведено сравнительное исследование влияния кальциевой нагрузки на митохондрии сердца крысы (MCK(K⁺)), у которых часть ионов K⁺ в их матриксе была заменена на ионы Na⁺ (MCK(Na⁺)). Нагрузка MCK(K⁺) кальцием снижала их дыхание, разобщенное 2,4-динитрофенолом, и уменьшала потенциал внутренней мембраны ($\Delta \Psi_{\text{мито}}$). При этом набухание этих митохондрий увеличивалось в средах с 25 мМ K-ацетатом или 125 мМ NH₄NO₃. Эти эффекты кальциевой нагрузки были еще больше в аналогичных опытах с MCK(Na⁺). Ингибиторы митохондриальной кальций-зависимой поры (MK3П), АДФ и циклоспорин A, полностью устраняли вышеуказанные эффекты Ca²⁺ в опытах с MCK(K⁺), и лишь частично в опытах с MCK(Na⁺). При увеличении внеклеточной концентрации Na⁺ наблюдался положительный инотропный эффект, однако пре-инкубация в бескальциевом растворе приводила к отрицательному инотропному эффекту. Таким образом, частичная замена K⁺ на Na⁺ в матриксе сделала митохондрии сердца крысы более чувствительными к Ca²⁺ и увеличивала в их внутренней мембране вероятность открытия MK3П. Вместе с увеличением цитоплазматического [Na⁺]_i это может увеличивать кальциевую перегрузку кардиомиоцитов, делая более вероятным их повреждение при ишемии/реперфузии.

Ключевые слова: миокард, Na⁺, Ca²⁺, инотропное действие, митохондриальный потенциал, митохондриальная кальций-зависимая пора

Сокращения: CsA – циклоспорин A, $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточный кальций, $[Na^+]_i$ – внутриклеточный натрий, $\Delta \Psi_{\text{мито}}$ – потенциал внутренней митохондриальной мембраны, BMM – внутренняя мембрана митохондрий, ДНФ – 2,4-динитрофенол, МСК – митохондрии сердца крысы, МКЗП – митохондриальная кальций-зависимая пора

DOI: 10.31857/S0044452921060073

Концентрация Na⁺ в цитоплазме кардиомиоцитов, как известно, увеличивается в результате ишемии сердечной мышцы, но при этом накопления в этих клетках Ca^{2+} не наблюдается [1, 2]. Последующая реперфузия миокарда способствует кальциевой и натриевой перегрузке кардиомиоцитов и митохондрий [2-4]. Повреждение мембран клеток и митохондрий является другим отрицательным последствием ишемии/реперфузии, наряду с уменьшением цитоплазматической концентрации АТФ в кардиомиоцитах [4-6]. Ишемия сердечной мышцы крысы приводит к снижению давления в левом желудочке, а также в результате этого снижается скорость дыхания митохондрий в состоянии 3, изолированных из этой ткани [1]. В результате ишемии/реперфузии происходит активное поступление в матрикс ионов Na⁺ посредством Na⁺/Ca²⁺ и Na⁺/H⁺ митохондриальных обменников [1, 3, 7, 8].

В результате ишемии/реперфузии цитоплазматическая концентрация ионов Na⁺ в кардиомиоцитах, как было показано, достигает 25-35 мМ [8]. По этой причине ранее мы исследовали [9] митохондрии сердца крысы (МСК), матрикс которых был нагружен ионами Na⁺ в среде, содержащей 100 мМ NaCl. В матриксе таких митохондрий концентрация Na⁺ увеличивалась от 23 до 44 мМ [9]. В сравнении с контрольными органеллами без натриевой нагрузки (МСК(К⁺)) у митохондрий с повышенной концентрацией Na^+ в их матриксе (MCK(Na⁺)) возрастали пассивная калиевая и протонная проницаемость их внутренней мембраны (BMM) и энергозависимое поступление K⁺ в матрикс. При этом снижались скорости дыхания митохондрий, находящихся в состоянии 3 и 3Р_{лнф} (разобщенные ДНФ).

Показано, что окислительный стресс и кальциевая перегрузка митохондрий делали более вероятным открытие митохондриальной кальций-зависимой поры (МКЗП) в их внутренней мембране (ВММ) что является причиной возникновения повреждений сердечной мышцы из-за ишемии/реперфузии [10–13]. В данном случае наблюдается нарушение структуры наиболее важного и сложного I митохондриального комплекса дыхательной цепи [14].

Концентрация внутриклеточного натрия ([Na⁺],) играет важную роль в контроле внутриклеточной концентрации кальция ([Са²⁺],), поскольку [Na⁺], является основным регулятором Na⁺/Ca²⁺ обменника [15, 16]. Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума и Na⁺/Ca²⁺ обменник – два основных из четырех регулирующих механизмов снижения [Ca²⁺], в цитоплазме [16]. Na⁺/Ca²⁺ обменник – это сарколеммальный белок, который двунаправленно обменивает три иона Na⁺ на один ион Ca^{2+} . Направление обмена зависит от вне- и внутриклеточных концентраций Na⁺ и Ca²⁺, а также от величины мембранного потенциала. При величине мембранного потенциала, равной величине потенциала покоя Na⁺/Ca²⁺ обменник служит преимущественно для удаления Са²⁺ из клетки, однако, при деполяризации через Na⁺/Ca²⁺ обменник осуществляется приток Ca²⁺ клетку. Увеличение концентрации [Na⁺], приводит к снижению скорости вытеснения Ca²⁺ через Na⁺/Ca²⁺ обменник и оказывает положительный инотропный эффект [17, 18]. Однако такое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ посредством увеличения концентрации [Na⁺], может приводить к нарушению ритма сердца и особенно опасно для сердца в условиях ишемии/реперфузии [17–19]. В данной работе мы стимулировали рост [Na⁺]_i методом увеличения внеклеточной концентрации натрия в растворе Рингера и изучали эффекты повышенной концентрации Na⁺ на спонтанное сокращение препаратов предсердий лягушки. Вместе с тем можно полагать, что сопоставление данных, полученных в опытах с использованием представителей этих двух видов животных, вполне оправдано исходя из полученных ранее данных о единой структурной организации митохондрий в сократительных тканях всех типов многоклеточных животных и также в исследованных хондриомах сердца крысы и сердца лягушки Rana ridibunda.

Цель данной работы — исследовать эффекты натриевой перегрузки кардиомиоцитов на динамику мышечных сокращений и оценить влияние нагрузки митохондрий сердца крысы ионами Na⁺ и Ca²⁺ на потенциал внутренней мембраны, дыхание митохондрий в состояниях 4 и 3Р_{ДНФ}, на набухание этих органелл, а также на индукцию в их внутренней мембране кальций-зависимоой поры (МКЗП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали самцов породы Вистар весом 200–250 г. Животные содержали при 20–23°С с 12-часовым циклом свет/темнота со свободным доступом к питьевой воде и к стандартной диете для крыс. В работе также использовали самцов лягушек *Rana ridibunda* весом 140–160 г. Животные содержались при 8–10°С с 12-часовым циклом свет/темнота в ванне с небольшим количеством воды.

Выделение митохондрий. Митохондрии сердца крысы (МСК(К⁺)) выделяли согласно методике, разработанной нами ранее [20]. Концентрация (мМ) ионов K⁺ и Na⁺ в матриксе этих митохондрий была соответственно 128 ± 11 и 23 ± 2 [9]. Нагрузку матрикса МСК ионами натрия проводили в растворе, содержащем 5 мМ Трис-HCl (рН 8.60) и 110 мМ NaCl, согласно детально описанной нами ранее процедуре [9]. Концентрация (мМ) ионов K⁺ и Na⁺ в матриксе нагруженных Na⁺ митохондрий сердца крысы (МСК(Na⁺)) оказалась соответственно равна 101 ± 4 и 44 ± 2 [9]. Концентрацию белка в митохондриальных препаратах оценивали методом Бредфорда. Она оказалась около 25– 30 мг/мл.

Измерение скоростей поглощения кислорода в препаратах изолированных из сердца крысы митохондрий. Данные скорости (натомов О/мин мг белка) тестировали при 26°С в ячейке объемом 1.5 мл на полярографе LP-7 (ЧССР) методом полярографии с применением закрытого платинового электрода Кларка. Оценивали дыхание энергизованных смесью глутамата и малата митохондрий, находящихся в состояниях 4_0 и $3P_{дH\Phi}$ (разобщенном 2,4-динитрофенолом) [21]. Митохондрии (1 мг белка в 1 мл) инъецировали в среду, содержащую (мМ): 20 MOPS (рН 7.3), 125 КСl, 10 глутамат, 3 КН₂PO₄, 2 малат и 0.05 EGTA. Остальные добавки указаны в подписи к рис. 1.

Оценка набухания митохондрий спектрофотометрическим методом. Увеличение объема митохондриального матрикса (набухание митохондрий) исследовали с использованием спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, РФ) при температуре 20°С по снижению оптической плотности митохондриальной суспензии из-за уменьшения светорассяния при длине волны 540 нм. Органеллы (1 мг белка в 1 мл) вносили в среду, содержащую (мМ): 5 Трис-HCl (рН 7.3) и 125 NH₄NO₃ или 100 сахарозы, 25 К-ацетата и 10 трис-HCl (рН 7.3). Во всех средах присутствовал олигомицин (4 мкг/мл). Остальные добавки указаны в подписях к рис. 2 и 3.



Рис. 1. Влияние Ca²⁺ на скорость поглощения кислорода энергизованными глутаматом и малатом митохондриями сердца крысы. Митохондрии (1 мг/мл) были внесены в среду, содержащую 125 мМ KCl, 20 мМ трис-MOPS (pH 7.3), 3 мМ трис-PO₄, 10 мМ глутамат и 2 мМ малат. Числами над кривыми показаны скорости поглощения кислорода (натом О/мин на 1 мг белка). Вертикальными стрелками показаны добавки митохондрий: а – (RHM(K⁺), b – RHM(Na⁺). Наклонными стрелками обозначено внесение в среду 150 мкМ Ca²⁺ (Ca²⁺), 1 мкМ CsA (CsA), 4 мкг/мл олигомицина (OM) и 30 мкМ 2,4-динитрофенола (DNP). Цифрами справа от кривых показано: 1 - без добавок, 2 - Ca²⁺, 3 - OM + Ca²⁺ + CsA.

Оценка потенциала внутренней мембраны митохондрий. Трансмембранный потенциал ($\Delta \Psi_{\text{мито}}$) тестировали при 20°С стандартным методом [20] с использованием спектрофлуориметра Shimadzu RF-1501 (Shimadzu, Япония). Измеряли изменение интенсивности флуоресценции сафранина О. Длина волны возбуждающего света была 485 нм, а длина эмиссионной волны равнялась 590 нм. Мито-



Рис. 2. Влияние Ca^{2+} на набухание (ΔD_{540}) митохондрий сердца крысы в среде с NH_4NO_3 . Митохондрии (1 мг/мл) добавляли в среду, содержащую 125 мМ NH_4NO_3 , 5 мМ трис-HCl и 1 мкг/мл олигомицина, а также (где указано) 100 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}), 2 мкМ CsA (CsA), 500 мкМ ADP (ADP). Цифрами справа от кривых показана добавка до митохондрий: 1 - 6e3 добавок, $2 - Ca^{2+}$, $3 - Ca^{2+} + CsA + ADP$. Стрелками показаны добавки митохондрий: $a - (RHM(K^+), b - RHM(Na^+), а также 10 мМ глутамат с 2 мМ малатом (G + M).$

хондрии (0.5 мг белка в 1 мл) вносили в среду, содержащую (мМ): 10 трис-HCl (рН 7.3), 125 KCl, 50 сахарозы, 3 MgCl₂ и 3 трис-PO₄, а также 3 мкМ сафранин и 1 мкг/мл олигомицина. Другие добавки приведены в подписях к рис. 4.

Регистрация и анализ параметров сокращения. Для изучения инотропного эффекта натрия использовали спонтанно-сокращающиеся препараты предсердий лягушки *Rana ridibunda*. Подробное описание методики было представлено ранее [22]. Препараты помещали вертикально в ячейку из оргстекла и с помощью стальных крючков растягивали до оптимальной длины для получения максимальных спонтанных сокращений. Все эксперименты проводили в изометрическом режиме и при температуре 8°С. С одной стороны препарат крепили к неподвижному платиновому крючку, с другой стороны к тензометрическому датчику для измерения силы сокращений. Сигнал с тензодатчика подавался на компьютер, где обрабатывался с по-


Рис. 3. Влияние Ca^{2+} на набухание (ΔD_{540}) митохондрий сердца крысы в среде с К-ацетатом и сахарозой. Митохондрии (1 мг/мл) добавляли в среду, содержащую 25 мМ К-ацетат, 100 мМ сахарозу, 10 мМ трисацетат и 1 мкг/мл олигомицина. Добавки и обозначения как на рис. 2.

мощью программы WinPulse. Силу сокращения выражали в Ньютонах (Н). В экспериментах использовали раствор Рингера, содержащий (мМ): 2.5 KCl, 110 NaCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.5 NaHCO₃, 0.75 NaH₂PO₄ и 5 глюкозы (pH 7.4). Повышенную концентрацию натрия получали добавлением соответствующего количества NaCl в раствор Рингера.

Схема экспериментов была следующей: предсердия инкубировались в растворе с повышенной концентрацией Na⁺ (140 мM), затем из раствора убирали Ca²⁺, а затем снова добавляли. Время инкубации в каждом из растворов составляло 3-4 мин.

Применяли стандартные способы статистической обработки результатов с использованием критерия Стьюдента в статистической программе Microsoft Origin 6.0. Различия считали достоверными при p < 0.05. На всех рисунках представлены стандартные результаты из трех независимых экспериментов.



Рис. 4. Влияние Ca^{2+} на изменение потенциала ($\Delta \Psi_{MUTO}$) внутренней мембраны энергизованных глутаматом и малатом митохондрий сердца крысы. Митохондрии (0.5 мг/мл) вносили в среду, содержащую 125 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ трис-PO₄, 3 мкМ сафранин O и 1 мкг/мл олигомицина, а также (где указано) 1 мкМ CsA (CsA) и 500 мкМ ADP (ADP). Стрелками показаны добавки митохондрий: а – (RHM(K⁺), b – RHM(Na⁺), а также 10 мМ глутамат с 2 мМ малатом (G + M), 60 мкМ Ca²⁺ (Ca²⁺) и 1 мкМ FCCP (FCCP). Цифрами справа от кривых показаны опыты: *1* – без добавок, *2* – Ca²⁺, *3* – Ca²⁺ + CsA + ADP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние кальция на митохондрии сердца крысы, нагруженные Na⁺. Мы обнаружили ранее, что перегрузка MCK(K⁺) ионами Ca²⁺ индуцировала открытие поры во BMM митохондрий сердца крысы, что проявлялось в снижении их дыхания в состоянии $3P_{\Pi H \Phi}$ (рис. 1а, кривые *1* и *2*) [23]. После внесе-

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

ния Ca²⁺ в среду наблюдалось уменьшение дыхаэнергизованных глутаматом и малатом ния MCK(Na⁺), находящихся в состоянии 3Р_{лнф} (рис. 1b, кривые 1 и 2). Такое уменьшение данного дыхания было больше по сравнению с аналогичным снижением дыхания в опытах с контрольными митохондриями (MCK(K^+)) (рис. 1а, кривые 1 и 2). Эксперименты с ингибитором МКЗП циклоспорином A (CsA) показали, что индуцированное кальцием снижение дыхания в состоянии ЗРлнф полностью исчезало в контроле (рис. 1а, кривая 3) и дыхание этих митохондрий показало значения, найденные в бескальциевых опытах (рис. 1а, кривая 1). В подобных опытах с MCK(Na⁺) воздействие CsA было явно слабее (рис. 1b, кривая 3) и дыхание этих митохондрий в состоянии 3Рлно практически не изменилось в сравнении с опытами с Ca²⁺ без CsA (рис. 1b, кривая 2). Поскольку снижение дыхания в состоянии 3Рлнф не обязательно является результатом открытия кальций-зависимой поры во BMM, а может быть связано с увеличением митохондриального объема [23, 24], поэтому мы изучали набухание митохондрий, $MCK(Na^+)$ и $MCK(K^+)$, в средах с NH_4NO_3 или с К-ацетатом и сахарозой.

Набухание неэнергизованных митохондрий в среде, содержащей NH₄NO₃, дает возможность изучить пассивную проницаемость BMM для H⁺, поскольку эта мембрана имеет высокую проницаемость для анионов NO_3^- и молекул аммиака (NH₃), образующихся при диссоциации катионов аммония (NH_4^+) на NH_3 и протоны [25]. В этом случае набухание органелл зависит только от поступления H⁺ в матрикс. На рис. 2а (кривые 1 и 2) можно увидеть, что независимо от присутствия кальция, деэнергизованные МСК(К⁺) слабее набухали в этой среде в сравнении с аналогичными результатами, найденными в опытах с MCK(Na⁺) (рис. 2b, кривые 1 и 2). Возможно, большая пассивная протонная проницаемость ВММ, найденная нами ранее в опытах с MCK(Na⁺) [9], является причиной такого результата, что позволяет предположить отсутствие влияния ионов Ca²⁺ на эту проницаемость. Можно увидеть (рис. 2а и 2b, кривая 1), что митохондрии активно сжимались после внесения в среду глутамата и малата по причине откачки ионов

аммония (NH⁴₄) из матрикса в результате работы K^+/H^+ обменника [25, 26]. Обнаруженное здесь (рис. 2а, кривая 2) массивное набухание нагруженных кальцием MCK(K⁺) обусловлено появлением во внутренней мембране MK3П [23]. При наличии в этой среде ингибиторов MK3П (АДФ и CsA) набухание этих митохондрий сменилось их заметным сжатием (рис. 2а, кривая 3). С другой стороны, такого результата не удалось достичь в аналогичных опытах с MCK(Na⁺) (рис. 2b, кри-

вая 3). Кальциевая нагрузка этих митохондрий стимулировала большее их набухание после внесения субстратов, а влияние АД Φ и CsA было слабее (рис. 2b, кривая 3).

Изучение набухания энергизованных митохондрий в 160 мОсм среде с CH₃COOK и сахарозой дает возможность оценить электрофоретический транспорт К⁺ в матрикс энергизованных митохондрий [20, 26]. В этом случае ионы К⁺ накапливаются в матриксе электрофоретически при помощи К⁺-унипортера митохондрий. Анион ацетата во внешней среде находится в равновесии со свободно проникающими через ВММ молекулами СН₃СООН, которые, проникнув в митохондрии, снова диссоциируют на СН₃СОО- и протоны, которые далее удаляются из матрикса протонными помпами электрон-транспортной цепи энергизованных митохондрий [27]. В конечном итоге происходит накопление в матриксе ацетата калия и идушей за ним воды, что влечет за собой набухание митохондрий (рис. 3а и 3b, кривая 1). В сравнении с MCK(K⁺), набухание MCK(Na⁺) было больше после внесения субстратов в калий ацетатную сре- $_{\rm IV}$ с Ca²⁺ (рис. 3а и 3b, кривая 2). Независимо от наличия кальция в калий ацетатной среде, набухание MCK(Na⁺) оказывалось всегда больше аналогичного набухания МСК(К⁺).

Индуцированное кальцием набухание энергизованных митохондрий (рис. За и 3b, кривая 3) заметно снижалось в среде с АДФ и CsA, и стало сопоставимо с результатами опытов без кальция (рис. За и 3b, кривая 1). Однако данные ингибиторы действовали слабее в экспериментах с MCK(Na⁺).

Как известно, снижение флюоресценции сафранина О в митохондриальной суспензии свидетельствует о возникновении электрохимического потенциала ($\Delta \Psi_{\text{мито}}$) внутренней мембраны [28]. В этом случае на ее матриксной стороне возникает отрицательный заряд являющейся движущей силой при движении сафранина О в митохондрии. В опытах без Ca²⁺ и ингибиторов потенциал внутренней мембраны МСК(К⁺) после добавки глутамата и малата снижался медленнее (рис. 4а, кривая 1), чем в аналогичных опытах с MCK(Na⁺) (рис. 4b, кривая 1). После добавки Ca²⁺ в среду наблюдалось ощутимое снижение $\Delta \Psi_{\text{мито}}$ в опытах с MCK(Na⁺) (рис. 4b, кривая 2), однако этот эффект был не так выражен в аналогичных опытах с MCK(K⁺) (рис. 4а, кривая 2) и был сопоставим со снижением потенциала, найденным в опытах без кальция (рис. 4а, кривая 1). Индуцированное кальцием открытие поры во ВММ приводит к снижению $\Delta \Psi_{\text{мито}}$ и выходу сафранина О из митохондрий в инкубационную среду, что регистрируется как увеличение флуоресценции этого красителя [23, 29, 30]. Индуцированное кальцием уменьшение $\Delta \Psi_{\scriptscriptstyle
m MUTO}$ в опытах с MCK(K⁺) было ингибировано в присутствии АДФ и CsA (рис. 4a, кривая 3), однако эффект последних был заметно слабее в аналогичных экспериментах с MCK(Na⁺) (рис. 4b, кривая 3).

Существует точка зрения [12], что в цитоплазме миоцитов существует некий микродомен, натриевое пространство с нечеткими границами (Na⁺ "Fuzzy Space"), тесно примыкающий к саркоплазматическому ретикулуму. Регулирование концентрации Na⁺ в этом пространстве обеспечивается за счет Na⁺-Ca²⁺ обменника и Na⁺ канала сарколеммы, а также активностью Na⁺ помпы (Na⁺/K⁺-АТФазы). Увеличение поступления Na⁺ в цитоплазму миоцитов связывают с открытием Na⁺ канала в плазмолемме [12]. Приток ионов Na⁺ в это пространство вследствие ишемии может способствовать поступлению Ca²⁺ в цитоплазму по механизму Na⁺/Ca²⁺ обмена, что усиливает кальциевую перегрузку миоцитов [12]. Другими причинами Na⁺ и Ca²⁺ перегрузки миоцитов во время ишемии/реперфузии могут быть приток Na⁺ в миоплазму через Na⁺/H⁺ обменник, а также нарушение функции Na⁺/K⁺-АТФазы из-за истошения АТФ и увеличение притока Na⁺ через гемиканалы коннексина [12]. Как известно, результатом ишемии является увеличение концентрации Na⁺, H⁺ и Са²⁺ в матриксе митохондрий с одновременным увеличением ионной проницаемости внутренней мембраны [4].

При последующей реперфузии концентрация Н⁺ в плазмолемме снижается, а концентрация Ca²⁺ еще больше возрастает, и в частности за счет Ca²⁺/Na⁺ обменника, который транспортирует ионы Na⁺ в цитопламу с последующим их удалением из цитоплазмы кардиомиоцитов Na⁺/K⁺-ATФазой [4]. Ранее было обнаружено, что концентрация Са²⁺ в матриксе митохондрий [Са²⁺]_м сапонин пермеабилизованных кардиомиоцитов дозозависимо уменьшалась при FCCP-индуцированном снижении $\Delta \Psi_{\text{мито}}$ и достигала 50% от исходного уровня при полном обнулении потенциала в условиях полного ингибирования Ca²⁺ унипортера [31]. Снижение $\Delta \Psi_{\text{мито}}$ при условии эксперимента $[Ca^{2+}]_{M} < [Ca^{2+}]_{c}$ стимулировало открытие МКЗП и вход ионов Ca²⁺ в матрикс деэнергизованных митохондрий. Однако в присутствии CsA (игибитора МКЗП) происходило уменьшение [Ca²⁺]_м, что связывали с удалением Ca²⁺ из матрикса посредством Na⁺/Ca²⁺ обмена. При этом ингибирование этого обменника в безнатриевом растворе устраняло этот эффект, и в матриксе сохранялась высокая концентрация Ca²⁺ [31, 32]. Поскольку наша среда не содержала Na⁺, то в этом случае Na⁺/Ca²⁺ обменник был не активен и концентрация Ca²⁺ в матриксе $MCK(Na^+)$ не могла снижаться в опытах с CsA.

Поглошение митохондриями кальшия в основном катализируется расположенным во внутренней мембране кальциевым унипортером, тогда как удаление ионов Ca²⁺ из матрикса возбудимых тканей осуществляется в основном за счет митохондриального Ca²⁺/Na⁺ обменника [13, 31, 33]. При наличии кальция запускается катализируемый циклофилином D процесс структурной перестройки белков, ответственных за открытие МКЗП во внутренней мембране [4]. Этот процесс ингибируется селективным ингибитором этой поры циклоспорином A (CsA) уже в наномолярных концентрациях. При умеренной кальциевой нагрузке органелл МКЗП открывается в низко-проводящем состоянии и ВММ становится проницаемой для небольших неорганических катионов, и в том числе для Са²⁺ [35]. В связи с этим ряд исследователей предположили, что открытие такой поры, возможно, является еще одним путем удаления кальция из энергизованных митохондрий [11, 13]. С другой стороны, открытие МКЗП при патофизиологических условиях может служить в качестве пути транспорта Ca²⁺ в митохондрии [11, 13, 33].

Ранее показали, что скорости дыхания энергизованных NAD-зависимыми субстратами митохондрий в состоянии 3 заметно снижались при уменьшении концентрации ионов К⁺ в их матриксе [36]. При этом было обнаружено [9, 36, 37] (рис. 1a, 1b, кривые 1), что в результате нагрузки ионами Na⁺ митохондрий печени и сердца крысы их дыхание в состоянии 3P_{ДНФ} снижалось в сравнении с дыханием контрольных органелл (без Na⁺ нагрузки). Одной из причин такого снижения дыхания может быть уменьшение транспорта электронов в НАДН-убихиноновом участке дыхательной цепи [38]. Индуцированное кальцием снижение дыхания митохондрий в состоянии ЗРДНФ (рис. 1а и 1b, кривые 2) и в этом случае было более заметно в опытах с MCK(Na⁺). Возможно, такой результат может быть связан с тем. что Na⁺ увеличивал выход Mg²⁺ и адениновых нуклеотидов из матрикса нагруженных кальцием митохондрий [39].

Влияние избыточной концентрации натрия на амплитуду спонтанных сокращений предсердий лягушки. В наших экспериментах увеличение внеклеточной концентрации Na⁺ на 30 мМ приводило к положительному инотропному эффекту (сокращения 4 и 5 на рис. 5с). Амплитуда спонтанных сокращений увеличивалась на $22 \pm 2\%$ (n = 3, p < 0.05).

Причем время нарастания напряжения и время полурелаксации одиночного сокращения практически не изменялись при увеличении внеклеточного натрия. Однако инкубация предсердий в бескальциевом растворе при повышенной концентрации натрия приводила к отрицательному



Рис. 5. Влияние ионов Na⁺ и Ca²⁺ на спонтанные мышечные сокращения сегмента предсердий сердца лягушки. Регистрация спонтанных сокращений в бескальциевых растворах (а) и при аппликации в растворе с высокой концентрацией натрия – 140 мM NaCl (с) показана горизонтальной линией над миограммами. b – показаны одиночные сокращения, отмеченные черными кружками с цифрами на записях а и с, при другой временной шкале. На панелях а и с показана непрерывная регистрация сокращений.

инотропному эффекту. Амплитуда спонтанных сокращений снижалась на $31 \pm 7\%$ (n = 3, p < 0.01) (сокращение 4 vs. 7 на рис. 5с) и полностью не восстанавливалась при нормальной концентрации кальция. При этом в бескальциевом растворе инотропный эффект натрия полностью нивелировался (сокращение 2 vs. 6 на рис. 5). Поэтому, мы можем предположить, что инотропный эффект повышенной концентрации натрия может быть обусловлен изменением [Ca²⁺]_{*i*}. Частота спонтанных сокращений была практически постоянной как в растворе с высокой концентрацией натрия, так и в бескальциевых растворах, что свидетельствует о том, что ионы натрия практически не влияют на пейсмекерную активность предсердий. Однако в некоторых экспериментах мы наблюдали появление аритмий при инкубации предсердий в растворе с высокой концентрацией натрия. Положительный инотропный эффект в наших экспериментах мог быть обусловлен увеличением $[Na^+]_i$, что приводит к увеличению [Ca²⁺]_{*i*}. Однако отрицательный инотропный эффект натрия при преинкубации в бескальциевом растворе (рис. 5с) был обнаружен нами впервые и молекулярные механизмы такого снижения неизвестны. Однако нельзя исключить, что одной из причин является нарушение митохондриальных функций.

Заключение. И так, натриевая перегрузка митохондрий сердца крысы привела к увеличению чувствительности этих органелл к действию на них Са²⁺, что проявилось в заметном снижении дыхания этих митохондрий в состоянии 3Рдно, уменьшении $\Delta \Psi_{\text{мито}}$ и увеличении их набухания в солевых средах в сравнении с такими же опытами с МСК(К⁺). Более слабое действие ингибиторов МКЗП (АДФ и CsA) на кальциевые эффекты в экспериментах с МСК(Na⁺) дает основание предположить, что нагрузка матрикса ионами Na⁺ облегчает открытие МКЗП во внутренней мембране и делает эту пору менее чувствительной к действию ингибиторов. Наряду с увеличением [Na⁺], в цитоплазме это может приводить к усилению кальциевой перегрузки кардиомиоцитов, обусловливая, в свою очередь, еще большее их повреждение при ишемии и последующей реперфузии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.В. Брайловскую за помощь при выделении митохондрий и полярографическом измерении скоростей поглощения кислорода этими органеллами, а Л.В. Емельянову за помощь при определении потенциала внутренней мембраны митохондрий сердца крысы, а также А.И. Бурдыгина за создание программы для регистрации и обработки данных по сокращению. Исследования по определению митохондриального потенциала проводили на базе Центра коллективного пользования в ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена с использованием средств государственного бюджета по госзаданию № АААА-А18-118012290142-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

С.М. Коротков осуществил планирование, сбор и обработку данных, написание и редактирование манускрипта, а также исследовал набухание митохондрий. К.В. Соболь исследовал сократительные характеристики препаратов сердечной мышцы лягушки *Rana ridibunda* и участвовал в написании соответствующих экспериментальных разделов статьи, а также совместно с В.П. Нестеровым, И.В. Шемаровой и С.М. Коротковым в обсуждении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tanonaka K., Motegi K., Arino T., Marunouchi T., Takagi N., Takeo S.* (2012) Possible pathway of Na⁺ flux into mitochondria in ischemic heart. Biol Pharm Bull 35: 1661–1668.

https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00010

 Gursahani H.I., Schaefer S. (2004) Acidification reduces mitochondrial calcium uptake in rat cardiac mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H2659– H2665.

https://doi.org/10.1152/ajpheart.00344.2004

- Iwai T., Tanonaka K., Inoue R., Kasahara S., Motegi K., Nagaya S., Takeo S. (2002) Sodium accumulation during ischemia induces mitochondrial damage in perfused rat hearts. Cardiovasc Res 55: 141–149. https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00282-1
- Saris N.E., Eriksson K.O. (1995) Mitochondrial dysfunction in ischaemia-reperfusion. Acta Anaesthesiol Scand Suppl 107: 171–176. https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1995.tb04353.x
- 5. Costa A.D., Quinlan C.L., Andrukhiv A., West I.C.,
- 5. Costa A.D., Guinian C.L., Anarukniv A., West T.C., Jabůrek M., Garlid K.D. (2006) The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290: H406–H415. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00794.2005
- 6. Dos Santos P., Laclau M.N., Boudina S., Garlid K.D. (2004) Alterations of the bioenergetics systems of the cell

in acute and chronic myocardial ischemia. Mol Cell Biochem 256–257: 157–166.

https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000009866.75225.e2

- Tani M., Neely J.R. (1989) Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. Circ Res 65: 1045–1056. https://doi.org/10.1161/01.res.65.4.1045
- Iwai T., Tanonaka K., Inoue R., Kasahara S., Kamo N., Takeo S. (2002) Mitochondrial damage during ischemia determines post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart. J Mol Cell Cardiol 34: 725–738. https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2002
- 9. Korotkov S.M., Nesterov V.P., Demina I.N. (2009) Effect of sodium load of the matrix on properties of isolated rat heart mitochondria. Dokl Biochem Biophys 424: 56–60. https://doi.org/10.1134/s1607672909010165
- Halestrap A.P., Richardson A.P. (2015) The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 78: 129–141. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.018
- 11. *Bernardi P.* (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. Physiol Rev 79: 1127–1155. https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1127
- Barry W.H. (2006) Na "Fuzzy space": does it exist, and is it important in ischemic injury? J Cardiovasc Electrophysiol 17: S43–S46. https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2005.00396.x
- Wei A.C., Liu T., Cortassa S., Winslow R.L., O'Rourke B. (2011) Mitochondrial Ca²⁺ influx and efflux rates in guinea pig cardiac mitochondria: low and high affinity effects of cyclosporine. A Biochim Biophys Acta 1813: 1373–1381.

https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.02.012

- Perry C.N., Huang C., Liu W., Magee N., Carreira R.S., Gottlieb R.A. (2011) Xenotransplantation of mitochondrial electron transfer enzyme, Ndi1, in myocardial reperfusion injury. PLoS One 6: 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016288
- Pieske B., Houser S.R. (2003) Na⁺_i handling in the failing human heart. Cardiovasc Res 57: 874–886. https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00841-6
- 16. Bers D.M., Despa S. (2006) Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. J Pharmacol Sci 100: 315–322. https://doi.org/10.1254/jphs.cpj06001x
- 17. *Flesch M., Erdmann E.* (2002) Na channel activators as positive inotropic agents for the treatment of chronic heart failure. Cardiovasc Drugs Ther 15: 379–386. https://doi.org/10.1023/a:1013329203750
- Coppini R., Ferrantini C., Mugelli A., Poggesi C., Cerbai E. (2018) Altered Ca²⁺ and Na⁺ Homeostasis in Human Hypertrophic Cardiomyopathy: Implications for Arrhythmogenesis. Front Physiol 16: 1391. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01391
- 19. *Goldhaber J.I., Philipson K.D.* (2013) Cardiac Sodium-Calcium Exchange and Efficient Excitation-Contraction Coupling: Implications for Heart Disease. Adv Exp Med

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

Biol 961: 355–364.

https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_30

Коротков С.М., Соболь К.В., Шемарова И.В., Фураев В.В., Новожилов А.В., Нестеров В.П. (2018) Действие Nd³⁺ на кальций-зависимые процессы в изолированных митохондриях сердца крысы и сердечной мышце лягушки. Биол мембраны 35: 200–207. [Korotkov S.M., Sobol K.V., Shemarova I.V., Furaev V.V., Novozhilov A.V., Nesterov V.P. (2019) Effects of Nd³⁺ on calcium-dependent processes in isolated rat heart mitochondria and frog heart muscle Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology 13: 161–167.]

https://doi.org/10.7868/S0233475518030040

- Панов А.В. (2015) Практическая митохондриология Новосибирск. [Panov A.V. (2015) Practical mitochondriology Novosibirsk (In Russ)]. https://doi.org/10.13140/2.1.1599.3127
- 22. Соболь К.В., Коротков С.М., Нестеров В.П. (2014) Инотропное действие нового пробиотического продукта на сокращение миокарда Сравнение с эффектами диазоксида. Биофизика 59: 959–966. [Sobol C.V., Korotkov S.M., Nesterov V.P. (2014) Inotropic effect of a new probiotic product on myocardial contractility Comparison with diazoxide. Biophysics 59: 780–785.]

https://doi.org/10.1134/S000635091405025X

23. *Korotkov S.M., Emel'yanova L.V., Brailovskaya I.V., Nesterov V.P.* (2012) Effects of pinacidil and calcium on isolated rat heart mitochondria. Dokl Biochem Biophys 443: 113–117.

https://doi.org/10.1134/S1607672912020147

- 24. *Biasutto L., Azzolini M., Szabò I., Zoratti M.* (2016) The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update Biochim. Biophys Acta 1863: 2515–2530. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.012
- 25. *Mitchell P, Moyle J*. (1969) Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. Eur J Biochem 9: 149–155. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00588.x
- 26. *Garlid K.D., Paucek P.* (2003) Mitochondrial potassium
- transport: the K⁺ cycle. Biochim Biophys Acta 1606: 23– 41.

https://doi.org/10.1016/s0005-2728(03)00108-7

- Brierley G.P. (1976) The uptake and extrusion of monovalent cations by isolated heart mitochondria. Mol Cell Biochem 10 (1): 41–63. https://doi.org/10.1007/BF01731680
- Waldmeier P.C., Feldtrauer J.J., Qian T., Lemasters J. (2002) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. Mol Pharmacol 62: 22–29. https://doi.org/10.1124/mol.62.1.22

 Korotkov S., Konovalova S., Emelyanova L., Brailovskaya I. (2014) Y³⁺, La³⁺, and some bivalent metals inhibited the opening of the Tl⁺-induced permeability transition pore in Ca²⁺-loaded rat liver mitochondria. J Inorg Biochem 141: 1–9.

https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.004

- Korotkov S.M., Nesterov V.P., Brailovskaya I.V., Furaev V.V., Novozhilov A.V. (2013) T1⁺ induces both cationic and transition pore permeability in the inner membrane of rat heart mitochondria. J Bioenerg Biomembr 45: 531–539. https://doi.org/10.1007/s10863-013-9526-8
- Saotome M., Katoh H., Satoh H., Nagasaka S., Yoshihara S., Terada H., Hayashi H. (2005) Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H1820–1828. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00589.2004
- Vajda S., Mándi M., Konràd C., Kiss G., Ambrus A., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. (2009) A re-evaluation of the role of matrix acidification in uncoupler-induced Ca²⁺ release from mitochondria. FEBS J 276: 2713– 2724.

https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06995.x

- 33. Gunter T.E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K. (2000.) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. Cell Calcium 28: 285–296. https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0168
- 34. *Ichas F, Mazat J.P.* (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore Switching from low- to high-conductance state. Biochim Biophys Acta 1366: 33–50. https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00119-4
- Gómez-Puyou A., Sandoval F., Chávez E., Tuena M. (1970) On the role of K⁺ on oxidative phosphorylation. J Biol Chem 245: 5239–5247.
- 36. Глазунов В.В., Коротков С.М. (1997) Дыхание и набухание изолированных митохондрий печени крысы модифицированных замещением калия в их матриксе на натрий. ДАН 356: 551–554. [Glazunov V.V., Korotkov S.M. (1997) Respiration and swelling of isolated rat liver mitochondria, modified by replacing potassium for sodium in their matrix. Dokl Akad Nauk 356: 551– 554. (In Russ)].
- Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Puyou M. (1977) Monovalent cations in mitochondrial oxidative phosphorylation. J Bioenerg Biomembr 9: 91–102. https://doi.org/0.1007/BF00745045
- Harris E.J., Cooper M.B. (1981) Calcium and magnesium ion losses in response to stimulants of efflux applied to heart, liver and kidney mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 103: 788–796. https://doi.org/10.1016/0006-291x(81)90518-0

EFFECT OF SODIUM IONS ON CALCIUM-LOADED RAT HEART MITOCHONDRIA AND FROG MYOCARDIUM

S. M. Korotkov^{a,#}, C. V. Sobol^a, I. V. Shemarova^a, and V. P. Nesterov^a

^a Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia [#]e-mail: korotkov@SK1645.spb.edu

ВЛИЯНИЕ Na⁺ НА НАГРУЖЕННЫЕ КАЛЬЦИЕМ МИТОХОНДРИИ

A comparative study of the effect of calcium load on rat heart mitochondria [RHM(K⁺)] in which a part of the K⁺ ions in their matrix were replaced by Na⁺ ions [RHM(Na⁺)] was carried out. Calcium loading of RHM(K⁺) decreased their 2,4-dinitrophenol-uncoupled respiration and reduced the inner membrane potential ($\Delta \Psi_{mito}$). Swelling of these mitochondria increased in media with 25 mM potassium acetate or 125 mM NH₄NO₃. These effects of calcium loading were even greater in similar experiments with RHM(Na⁺). Inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), ADP and cyclosporin A (CsA), abolished completely the abovementioned effects of Ca²⁺ in experiments with RHM(K⁺) and did only partially in experiments with RHM(Na⁺). A positive inotropic effect was observed with an increase in the extracellular concentration of Na⁺, however pre-incubation in a calcium-free solution led to a negative inotropic effect. Thus, the partial replacement of K⁺ by Na⁺ in the matrix made rat heart mitochondria more sensitive to Ca²⁺ and increased the probability of MPTP opening in their inner membrane. Along with an elevation of cytoplasmic [Na⁺]_i, this can further increase calcium overload of cardiomyocytes, making their damage during ischemia/reperfusion more likely.

Keywords: mitochondrial permeability transition pore, mitochondrial potential, inotropic action, myocardium, Na^+ , Ca^{2+}

—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЯДРЫШЕК НЕЙРОНОВ СЕНСОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

© 2021 г. В. А. Отеллин^{1,*}, Л. И. Хожай¹, Т. Т. Шишко¹, Е. А. Вершинина¹

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

*e-mail: v.otellin@mail.ru Поступила в редакцию 05.04.2021 г. После доработки 28.05.2021 г. Принята к публикации 06.06.2021 г.

Вопросы становления головного мозга во время раннего постнатального периода и воздействия в это время перинатальной гипоксии, которая может приводить к развитию нейропсихичесой патологии, относятся к числу актуальных медицинских и социальных проблем. Известно, что ядрышки нейронов неокортекса осуществляют биосинтез субъединиц рибосом и участвуют в различных морфогенетических процессах. При изучении воздействия перинатальной гипоксии на развивающийся головной мозг (на модели энцефалопатии новорожденных) выявлены изменения в ультраструктурной организации ядрышек нейронов неокортекса и численного соотношения их типов. У контрольных животных по мере развития в неонатальный период имеет место увеличение числа ядрышек как гранулярного, так и ретикулярного типов, что может быть связано с процессингом рРНК. Появление к концу неонатального периода скоплений гранул – субъединиц рибосом возле ядерной мембраны ядра – может быть связано с лифференцировкой нервных клеток и формированием шероховатого эндоплазматического ретикулума. В настоящей работе установлен факт изменения численного соотношения гранулярного и ретикулярного типов ядрышек в ядрах нейронов после воздействия перинатальной гипоксии по сравнению с контрольными значениями. Полученные результаты дают основание предполагать, что ядрышки ядер нейронов неокортекса являются мишенью воздействия перинатальной гипоксии, т.е. звеном в патогенезе этого заболевания. Применение фенибута (ноотропного препарата, производного ГАМК) после воздействия гипоксии выявило его влияние на численное соотношение разных типов ядрышек, которое не отличалось от контрольных величин. Вероятно, фенибут может оказывать нейропротекторный эффект, воздействуя на ультраструктурную организацию ядрышек ядер нейронов неокортекса.

Ключевые слова: гранулярный и ретикулярный типы ядрышек, нейрон, неокортекс, перинатальная гипоксия, неонатальный период

DOI: 10.31857/S0044452921050065

ВВЕДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы сосредоточили внимание на периоде новорожденности, когда активно протекают процессы адаптации к новым условиям существования (изменение типов дыхания и питания, воздействие изменившейся температуры, гравитации). В это время реализуются запрограммированные гистогенетические процессы пролиферации, миграции и дифференцировки всех структурных элементов нервной ткани. Происходит становление и упорядочение слоев неокортекса, активно протекают синаптогенез и ангиогенез. В это время, как свидетельствуют многочисленные данные литературы и подтверждающие их наши собственные наблюдения, головной мозг отличается высокой чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов среды [1]. Среди них существенное место принадлежит часто встречающейся гипоксии-ишемии, которая приводит к развитию энцефалопатии новорожденных и ее проявлениям в виде нервно-психических заболеваний и расстройств на всех этапах последующего онтогенеза. Отдаленные последствия перинатальной патологии обусловливают основные неврологические нарушения — задержку моторного, психического, речевого развития, расстройства процессов памяти, внимания, эмоций, сна, и занимают первое место среди всех заболеваний нервной системы в детском возрасте.

В последние годы при изучении механизмов перинатальных повреждений головного мозга и ряда

других внутренних органов получило распространение представление о стрессе эндоплазматического ретикулума (СЭР). Эта реакция инициируется ишемией, воспалением и воздействиями других неблагоприятных факторов, что приводит к нарушению основных физиологических функций данной органеллы. К их числу, как известно, относятся процессы сворачивания белков (фолдинг белков), внутриклеточное хранение Са²⁺ и синтез ненасыщенных жирных кислот, стеринов и фосфолипидов. Нарушение даже одной из этих функций может привести к "напряжению эндоплазматического ретикулума", его стрессу за счет накопления в нем недавно синтезированных неспирализованных протеинов [1-3]. При этом мы не нашли данных в отношении реакций ядрышек ядер нейронов на перинатальную гипоксию [4–6]. Поэтому представляется актуальным исследование участия ядрышек в ответных реакциях развивающегося мозга на воздействие гипоксии, что может расширить знания и в отношении патогенеза эцефалопатий новорожденных.

Задачей настоящего исследования явилось изучение ультраструктурных характеристик ядрышек ядер нейронов сенсомоторной области неокортекса крыс в ранний (П5) и поздний (П10) неонатальный периоды после воздействия перинатальной гипоксии и последующего применения фенибута (препарата, производного ГАМК) (данное фундаментальное исследование ориентировано на нужды клиники).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В литературе господствует обоснованное мнение о том, что для моделирования энцефалопатий новорожденных наиболее пригодны грызуны. В данной работе использованы новорожденные крысы линии Wistar, полученные из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Воздействие гипоксии. Воздействие гипоксии на мозг новорожденных крыс осуществляли на 2-е постнатальные сутки. Эти животные помещались на 1 ч в камеру с проточной газовой смесью, содержащей: кислорода – 7.8%; углекислого газа – 0.4% и азота – 91.8%, при температуре – 21.3– 23.0°С и нормальном общем давлении. В работе было использовано 3 группы животных: 1 экспериментальная группа – крысы, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии; 2 экспериментальная группа – крысы, получавшие после воздействия гипоксии фенибут; 3 контрольная группа – интактные животные того же возраста. Каждая группа содержала по 8 крыс.

Средство фармакологической коррекции. Фенибут (ноотропный препарат, синтезированный на основе ГАМК и зарегистрированный в РФ как лекарственное средство) вводили подкожно в терапевтической дозе 15 мг/кг в течение 10 дней после воздействия гипоксии.

Электронномикроскопический метод. Для ультраструктурного исследования фрагменты сенсомоторной области неокортекса крыс на 5-е и 10-е постнатальные сутки (П5 и П10) фиксировали в 2.5% растворе глютаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере (ph 7.4) с добавлением сахарозы, дополнительно фиксировали 2% раствором тетроксида осмия и заключали в эпон. Из блоков делали полутонкие срезы и ориентировали блок на Ш-1У слои, где присутствуют нормохромные пирамидные нейроны. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III, которые помещали на сетки и контрастировали 1.5% раствором уранилацетата и цитратом свинца. Ультратонкие срезы анализировали под электронным микроскопом фирмы Tecnai G2 Spirit (FEI, Германия) при ускоряющем напряжении 70 кВ.

Методы статистической обработки. Анализ данных проводили на изображениях, полученных при исследовании материала под электронным микроскопом. Для статистческого анализа данных в каждой группе из 8 животных: контрольная группа, воздействие гипокси, воздействие гипоксии и применение фенибута, было взято по 100 изображений. на основании которых были рассчитаны проценты присутствия в ядрах ядрышек гранулярного и ретикулярного типов. Сравнение частоты присутствия того или другого типа ядрышек проводились с использованием критерия χ^2 . Поскольку сумма частот ядрышек гранулярного и ретикулярного типов равна 100%, то результаты, полученные при сравнении частот встречаемости ядрышек гранулярного типа и ретикулярного типа, полностью совпадают.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование контрольных животных. У контрольных крыс в неонатальный период в ядрах пирамидных нейронов сенсомоторной области неокортекса выявлены разные типы ядрышек, основными из которых являются гранулярный и ретикулярный, отличающиеся различным соотношением гранулярного и фибриллярного компонента.

На П5 (в ранний неонатальный период) у контрольных крыс в ядрах большинства нейронов определяется 2, изредка 3 эксцентрично расположенных ядрышка, как правило, прилежащих к кариолемме, и состоящих из гранулярного компонента (ГК). Такие ядрышки представляют гранулярный тип и составляют 72% от общего числа ядрышек, присутствующих в ядрах исследованных нейронов. У таких ядрышек слабо выражен плотный фибриллярный компонент (ПФК), в них присутствует небольшое число (2–4) нуклеолярных



Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крысы на П5. Ультраструктурная организация ядрышка гранулярного типа. Контроль. Ув.30 000 (масштабная линейка = 1 мкм). DFC – dense fibrillary component \плотный фибриллярный компонент; FC – fibrillary centre\фибриллярный центр.

лакун. На этом сроке исследования в ядрах нейронов выявлены и ядрышки, представляющие ретикулярный тип (их 25%). Они содержат, в основном, плотный фибриллярный компонент (ПФК) (рис. 1).

В ядрах нейронов встречаются ядрышки, содержащие как гранулярный, так и фибриллярный компоненты в равном количестве. Таких ядрышек мало, 3% от общего числа исследованных ядрышек, при этом между ядрышком и кариолеммой ядра, как правило, присутствуют скопления субъединиц рибосом и фрагменты гетерохроматина, ассоциированного с ядрышком. Полученные данные согласуются с наблюдениями других авторов [5, 7].

На П10 (в поздний неонатальный период) у контрольных животных размер ядрышек увеличивается. они могут занимать как центральное положение, так и прилежать к ядерной оболочке. По сравнению с П5 возрастает количество ядрышек ретикулярного типа (до 35%), в них увеличиваются лоля фибриллярного компонента и число мелких фибриллярных центров (ФЦ) (рис. 2a). В зоне ПФК появляется грануллярный компонент (скопление субъединиц рибосом). Следует отметить более высокую степень дифференцировки перикариона нейронов по сравнению с П5, наблюдаются начальные этапы формирования шероховатого эндоплазматического ретикулума.

Исследование животных после воздействия гипоксии. На П5 под воздействием гипоксии изменяются как положение ядрышек в ядре, так и соотношение в них ультраструктурных компонентов. Увеличивается число нейронов, в которых ядрышки располагаются по периферии ядра в непосредственной близости от ядерной мембраны, ее пор и расширенного перинуклеарного пространства. Соотношение типов ядрышек составляет 40% гранулярного типа и 60% ретикулярного, $\chi^2(1, N = 100) =$ = 25.06, *p* < 0.001 (по сравнению с контролем). В ядрышках последнего типа возрастает доля светлых крупных фибриллярных центров (рис. 2b). Одновременно увеличивается число некрупных ядрышек с мелкими фибриллярными центрами, окруженными ПФК (рис. 3а). Во всех ядрышках имеет место выраженное увеличение гранулярного компонента.



Рис. 2. Соматосенсорная область неокортекса крысы на П10. (а) – ультраструктурная организация ядрышка фибриллярного типа. Контроль. Ув. 40000 (масштабная линейка = 1 мкм); (b) – ядрышко фибриллярного типа с увеличенным плотным фибриллярным компонентом и возросшим числом мелких фибриллярных центров. Ув.40 000 (масштабная линейка = 1 мкм). GC – granular component\гранулярный компонент; DFC – dense fibrillary component\плотный фибриллярный центр.



Рис. 3. Соматосенсорная область неокортекса крыс на П5 и П10 после воздействия перинатальной гипоксии. (а) – ядрышки фибриллярного типа с увеличенным числом мелких фибриллярных центров и тесно прилежащих к расширенному перинуклеарному пространству; уменьшение числа гранул – субъединиц рибосом (П5). Увеличение 60000 (масштабная линейка = 1 мкм); (b) – ядрышки фибриллярного типа, преобладающие в ядре; концентрация гранулярного материала у перинуклеарного пространства (П10). Увеличение 60 000 (масштабная линейка = 1 мкм). GC – granular component\rpaнулярный компонент; DFC – dense fibrillary component\плотный фибриллярный компонент; FC – fibrillary centre\фибриллярный центр. LFC – little fibrillary centre\мелкий фибриллярный центр.

На П10 (к концу неонатального периода) у животных, перенесших перинатальную гипоксию, изменяется численное соотношение типов ядрышек: ядрышки гранулярного типа составляют 45%, а ретикулярного 55% $\chi^2(1, N = 100) = 8.08, p = 0.005$, (при этом 75% из них содержит крупные ФЦ, а 25% — мелкие ФЦ, что не отмечалось в контроле, рис. 3b).

Отмеченные изменения ультраструктурной организации ядрышек после воздействич гипоксии сочетаются с описанной нами ранее в аналогичных экспериментах задержкой дифференцировки нейронов [8]. Об этом говорят слабое развитие цитоплазмы и ее малый объем, практически полное отсутствие признаков усложнения шероховатого и гладкого эндоплазматического ретикулумов.

Применение фенибута. В экспериментах с использованием фенибута (препарата, производного ГАМК) выявило его влияние на численное соотношение разных типов ядрышек в ядрах нейронов после воздействия гипоксии. Так, на П5 после воздействия гипоксии. Так, на П5 после воздействия гипоксии и введения фенибута типы ядрышек распределялись следующим образом: гранулярный тип составлял 55%, а ретикулярный 45%, $\chi^2(1, N = 100) = 4.5, p = 0.034$, т.е. по сравнению с животными, пережившими только воздействие гипоксии, число ядрышек гранулярного типа возрастало, а ретикулярного типа снижалось. Вероятно, фенибут может оказывать влияние на структурную организацию ядрышек (хотя отличие от контроля все еще остается значимым: $\chi^2(1, N = 100) = 8.79$,

p = 0.003). На П10 эксперимента результат оказался разительным: после введения препарата число типов ядрышек практически не отличалось от контрольных величин (70% ядрышек гранулярного типа и 30% ретикулярного типа против соответственно 65% и 35%,) и на высоком уровне значимости отличалось от чисто гипоксического воздействия, $\chi^2(1, N = 100) = 12.79, p = 0.001$. При этом различия между процентом ядрышек гранулярного типа на П5 и П10 после воздействия гипоксии с использованием препарата значимы: $\chi^2(1, N = 100) = 4.8, p =$ = 0.028 (рис. 4). Это позволяет предполагать, что фенибут может обладать нейропротекторным свойством.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На нашем материале, касающемся возрастной динамики, и в экспериментах с воздействием перинатальной гипоксии проявляется высокая динамичность ультраструктур ядрышек изучавшихся неокортикальных нейронов, в результате чего изменяются частота встречаемости и соотношение типов ядрышек. К настоящему времени иммуноцитологами и биохимиками получены данные, позволяющие судить о функциональной роли отдельных ультраструктур ядрышек разных типов. Так, отмеченное нами изменение количества гранулярного компонента на протяжении неонатального периода, концентрация гранулярного компонента у ядерной мембраны и ее пор могут рассматриваться как начальный этап транспорта



Рис. 4. Суммарные графики частоты встречаемости ядрышек гранулярного типа (а) и ретикулярного типа (b) в процентах со стандартными ошибками (H% ± SE), ранний (P5) и поздний (P10) неонатальный периоды.

субъединиц рибосом в цитоплазму нейронов [6], где они будут участвовать в дифференцировке нейронов. Интересно, что в течение неонатального периода возрастает число ядрышек ретикулярного типа, содержащих, в основном, плотный фибриллярный компонент (ПФК), состоящий из тонких плотно упакованных фибрилл высокой электронной плотности. Здесь выявлены белки, участвующие в этапах процессинга рРНК, и рибонуклеопротеиновые комплексы, содержащие малые ядрышковые РНК [5, 9]. Появление же на П10 скопления субъединиц рибосом может быть связано с развитием процесса дифференцировки нервных клеток, когда в их цитоплазме начинает формироваться шероховаый эндоплазматический ретикулум.

В настоящей работе установлен факт изменения соотношения типов ядрышек после воздействия перинатальной гипоксии. Поскольку наши эксперименты проведены на модели энцефалопатии новорожденных, есть основание полагать, что и ядрышки ядер нейронов неокортекса являются мишенью воздействия гипоксии, т.е. в патогенез энцефалопатий вовлечены и ядрышки нейронов. Увеличение числа ядрышек ретикулярного типа после воздействия гипоксии, в которых возрастает число крупных и мелких фибриллярных центров, предполагает нарушение процессов транскрипции генов рРНК [9, 10]. Что касается интерпретации факта положительного влияния фенибута на изменение численного соотношения типов ядрышек после воздействия гипоксии, возвращая его к контрольным значениям, то она на настоящем этапе исследования затруднительна, и может быть сведена только к предположению о нейропротективном свойстве фенибута в неонатальный период развития [11, 12].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводились в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных" и при соблюдении требований Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании лабораторных животных. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Настоящая статья не содержит результатов какихлибо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №20-015-00052.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – В.А. Отеллин, Л.И. Хожай.

Сбор данных – Л.И. Хожай, Т.Т. Шишко. Обработка данных – В.А. Отеллин, Е.А. Вершинина, Т.Т. Шишко. Написание и редактирование статьи – В.А. Отеллин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Смирнова О.М., Горелышев А.С. (2012) Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. Проблемы эндокринологии 5: 57–65. [Dedov I.I., Smirnova O.M., Gorelyshev A.S. (2012) Stress of endoplasmic reticulum: scenario of pathogenesis of human diseases. Problemy endocrinologii 5: 57–65. (In Russ)].

2. Diaz H.S., Andrade D.C., Toledo C. (2020) Inhhibicion of brainstem endoplasmic reticulum stress rescues cardiorespiratory disfunction in high output heart failure. Hypertension 14: 12016056.

https://doi.org/10.1161/ Hypertension HA 120.16056

- 3. Osman A., El-Gamal H., Pasha M., Zeidan A., Korashy H.M., Abdelsalam S.S., Hasan M., Benameur T., Agouni A. (2020) Endoplasmic reticulum (ER) stress-generated extracellural vesicles self-perpetuate ER stress and mediate endothelial cell disfunction independenly of cell survival. Front Cardiovasc Med 10: 7:584791. https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.584791
- 4. Hernandez-Verdun D., Roussel P., Thiry M., Sirri V., Lafontaine D.L.J. (2010) The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. Wiley Interdiscip Rev RNA 1: 3: 415-431. https://doi.org/10.1002/wrna.39

- 5. Németh A., Grummt I. (2018) Dynamic regulation of nucleolar architecture Curr Opin Cell Biol 52: 105-111. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.02.013)
- 6. Latonen L. (2019) Phase-to-phase with nucleoli stress responses, protein aggregation and novel roles of RNA. Front Cell Neurosci 13: 151: 1–10. https://doi.org/3389/fncel.2019.00151)
- 7. Зиматкин С.М., Заерко А.В., Федина Е.М. (2020) Ядрышки в развивающихся гистаминергических нейронах мозга крысы Морфология 158: 4-5: 07-13 Zimatkin S.M., Zaerko A.V., Fedina E.M. (2020) Nucleoli in devtloping histaminergic neurons of the rat brain Morphology 158:4-5: 7–13 (in Russ)].

- 8. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А., Шишко Т.Т. (2011) Отлаленные последствия воздействия гипоксии в перинатальный период развития на структурно-функциональные характеристики мозга у крыс. Рос физиол журнал им. И.М. Сеченова 97 (10): 1092-1100. [Otellin V.A., Khozhai L.I., Vataeva L.A., Shishko T.T. (2011) Long-term effects of exposure to hypoxia in perinatal development on structural and functional characteristics of the brain in rats. Russ J Physiol 97 (10): 1092-1100. (In Russ)].
- 9. Otellin V.A., Khozhai L.I., Vataeva L.A. (2012) Effect of hypoxia in early perinatal ontogenesis on behavior and structural characteristics of the rat brain J Evol Biochem Physiol. 48: 467-473.
- 10. Hernandez-Verdun D. (2011) Structural organization of the nucleolus as a consequence of the dynamics of ribosome biogenesis. The nucleolus (in Protein Reviews) 15: 1: 3-28.https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0514-6 1
- 11. Villacís L., Mei S., Ferguson L., Hein N., Amee G. Hannan K. (2018) New Roles for the Nucleolus in Health and Disease. Rev Bioessays 40: 5: e1700233. https://doi.org/10.1002/bies.201700233
- 12. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Шишко Т.Т., Тюренков И.Н. (2016) Отдаленные последствия перинатальной гипоксии и их возможная фармакологическая коррекция: реакции нервных клеток и синапсов неокортекса. Морфология 150: 6: 7-12. [Otellin V.A., Khozhai L.I., Shishko T.T., Tyurenkov I.N. (2016) Remote consequences of perinatal hypoxia and their posssible pharmacological correction: reactions of neocortical nerve cells and synapses. Morphlogy 150: 6: 7–12. (In Russ)].

Nucleolar Ultrastructure in Neurons of the Rat Neocortical Sensorimotor Area during the Neonatal Period after Perinatal Hypoxia and Its Pharmacological Correction

V. A. Otellin^{a, #}, L. I. Khozhai^a, T. T. Shishko^a and , and E. A. Vershinina^a

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia #e-mail: v.otellin@mail.ru

The issues of brain morphogenesis during the early postnatal period and the effect of perinatal hypoxia thereupon, which can lead to the development of neuropsychic pathology, are among the major medical and social challenges. It is well known that the nucleoli of neocortical neurons synthesize ribosomal subunits and are involved in various morphogenetic processes. When studying the effect of perinatal hypoxia on the developing brain in the model of neonatal encephalopathy, we revealed ultrastructural changes in the nucleoli of neocortical neurons and in the numerical ratio of their types. In control rats, as they develop in the neonatal period, there is an increase in the number of both granular and reticulated nucleolar types, which may be due to ribosomal RNA (rRNA) processing. By the end of the neonatal period, the emergence of granular agglomerates (ribosomal subunits) near the nuclear membrane may be due to nerve cell differentiation and the biogenesis of the rough endoplasmic reticulum. In the present work, we established the fact of changing the numerical ratio of the granular and reticulated nucleolar types in the nuclei of neocortical neurons after perinatal hypoxic exposure of experimental vs. control rats. Our data suggest that the nucleoli in neocortical neurons are the targets for the exposure to perinatal hypoxia, i.e. a link in the pathogenesis of this disease. Post-hypoxic administration of Phenibut (a GABA derivative, nootropic drug) corrected the pathogenetic effect of perinatal hypoxia by restoring the numerical ratio of the nucleolar types in neocortical neurons, which is inherent to control rats. We assume that Phenibut can exert a neuroprotective effect through its ability to affect the nucleolar ultrastructure in neocortical neurons.

Keywords: granular and reticulated types of nucleoli, neocortex, perinatal hypoxia, neonatal period

—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ЦНС МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

© 2021 г. А. В. Сидоров^{1,*}, В. Н. Шаденко^{1,2}

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь ² Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Беларусь *e-mail: sidorov@bsu.by Поступила в редакцию 20.07.2021 г.

После доработки 20.08.2021 г. Принята к публикации 25.08.2021 г.

Изучены быстрые реакции ключевых интернейронов в составе дыхательной (RPeD1), локомоторной (LPeD1) и кардиорегуляторной (VD1/RPaD2) сетей центральных нервных ганглиев моллюска Lvmnaea stagnalis при действии D-глюкозы (1 и 10 мМ). В условиях выраженной гипергликемии (10 мМ) отмечены усиление частоты импульсации VD1/RPaD2 и ее снижение в отношении LPeD1, наблюдаемые уже на первой минуте после воздействия, при неизменности указанного показателя для RPeD1. Добавление в среду инкубации глюкозы в меньших концентрациях (1 мМ) не приводит к статистически достоверным изменениям показателей электрической активности для всех исследованных нейронов. Наблюдаемые эффекты не связаны в возрастанием содержания активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме, поскольку использование флуоресцентного зонда (2',7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата) не выявило их накопление в суспензии клеток нервных ганглиев в ответ на действие глюкозы (10 мМ) в краткосрочном (5 мин) периоде по сравнению с контрольными условиями. Анализ формы потенциала действия в условиях гипергликемии (глюкоза, 10 мМ), для высокочувствительных к действию глюкозы нейронов (VD1/RPaD2), выявил возрастание скорости деполяризации мембраны для достижения порогового потенциала на фоне неизменности других фаз спайка. Предполагается, что эффекты глюкозы в отношении частотных характеристик исследованных центральных нейронов *Lymnaea* обусловлены модификацией (интенсификацией) работы электрогенного Na⁺-глюкозного котранспортера и зависят от функциональной принадлежности клеток.

Ключевые слова: глюкоза, нейрон, моллюск, потенциал действия, АФК **DOI:** 10.31857/S0044452921060097

введение

Способность к детектированию содержания глюкозы в окружающем клетку пространстве является характерным свойствам целого ряда центральных нейронов позвоночных [1, 2] и беспозвоночных [3, 4] животных. Наличие таких структур обеспечивает эффективную работу функциональной системы, направленную на поддержание постоянного уровня глюкозы во внутренней среде организма [5], что в целом характерно для позвоночных, и/или инициирует определенные поведенческие ответы, преимущественно связанные с пищедобычей, как это отмечено для ряда беспозвоночных, включая моллюсков [4]. В этой связи глюкозу можно рассматривать в качестве сигнальной молекулы, диффузно распространяющейся во внутренней среде организма (кровь/гемолимфа, интерстициальная жидкость) и обеспечивающей неспецифические экстрасинаптические эффекты в отношении целого комплекса нервных клеток, как это характерно для факторов объемной передачи сигнала [6]. Однако неясно, будет ли действие глюкозы в отношении различных, исходно неспециализированных для ее рецепции нейронов в составе разных нейронных сетей ЦНС, универсальным, т.е. всегда однонаправленным (например, деполяризация и усиление импульсации при гипергликемии) или следует ожидать разнонаправленный характер реакции, в зависимости, например, от функциональной принадлежности или нейромедиаторной специфичности нервной клетки.

В центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* насчитывается ряд крупных (диаметр сомы ~100 мкм) идентифицированных нейронов, отличающихся друг от друга как в функциональном (входят в состав нейронных сетей вовлеченных в регуляцию разных форм поведения), так и химическом (содержат разные нейромедиаторы) плане, что делает данный организм одним из модельных объектов в нейробиологических исследованиях [7]. Чувствительные к глюкозе центральные нейроны Lymnaea сосредоточены преимущественно в пределах буккальных ганглиев, нейронные сети которых определяют работу центрального генератора пищевого ритма и пищедобычу в целом [8, 9]. Изоляция этих нервных узлов от центрального кольца ганглиев представляет собой элементарную методическую процедуру (перерезка церебробуккальной коннективы). В свою очередь это позволяет оценить ответы клеток, не входящих в состав пищевой нейронной сети, на действие метаболических сигналов, практически в "чистом" виде (ряд модуляторных нейронов пищевой сети, например, гигантские клетки церебральных узлов (cerebral giant cells, CGC) входят в состав центрального кольца ганглиев).

Различные эффекты глюкозы в отношении нервных клеток могут быть реализованы за счет возрастания внутриклеточной концентрации активных форм кислорода (АФК) как следствие интенсификации процессов окислительного фосфорилирования в электронтранспортной цепи митохондрий [10] в ответ на увеличения уровня сахаров, т.е. энергетических субстратов в цитоплазме нейронов. Концентрация глюкозы в гемолимфе Lymпаеа, в зависимости от степени выраженности пишевой доминанты, может возрастать многократно – с исходных 57 (голодные особи) до 760 (сытые особи) мг/мл [11]. С другой стороны, умеренная по длительности (часы) гипергликемия, сопровождаемая последующей нормализацией глюкозного гомеостаза, равно как и другие стрессовые воздействия, например, голодание, приводят к изменению антиоксидантного статуса нервной ткани [12], а модуляторное действие АФК в отношении идентифицированных нейронов как пищевой, так и кардиореспираторной [13, 14] нейронных сетей *Lymnaea stagnalis* хорошо известно. Тем не менее возможность внутриклеточного (внутринейронного) накопления АФК уже в течение первых минут после увеличения концентрации глюкозы в интерстиции, что может лежать в основе быстрых (минуты) нейротропных эффектов глюкозы, остается невыясненной.

Отмеченное выше и определило цель данной работы, заключающуюся в оценке быстрых эффектов возрастания уровня глюкозы во внеклеточном пространстве на показатели электрической активности функционально различных, непищевых нейронов ЦНС Lymnaea stagnalis, выяснение возможного механизма их обусловливающих.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Моллюски, прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis* L.), были собраны в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы). В лаборатории их содержали в аквариумах, на каждую особь приходилось не менее 1 л воды, при температуре 20 \pm 1°С. Смену воды проводили каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). В экспериментах использовали животных одинакового размерного класса – высота раковины 3.5 \pm 0.4 см, масса – 3.5 \pm 0.5 г.

Электрофизиология. Спонтанную электрическую активность идентифицированных нейронов оценивали в составе препарата изолированной ЦНС (кольцо центральных ганглиев, без буккальных узлов). Для размягчения периневральной оболочки и облегченного проникновения микроэлектродов в нейроны препараты предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США) -1 мг/мл в течение 5 мин при 20°С. Электрическую активность нейронов регистрировали после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Препараты ЦНС помещали в нормальный физиологический раствор Рингера (концентрация указана в ммолях): NaCl – 44.0; KCl – 1.7; CaCl₂ – 4.0; MgCl₂ · 6 H₂O - 1.5; HEPES - 10.0, pH 7.6 \pm 0.03. Внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов, используя усилитель МС-01М (Линтех, Беларусь). Микропипетки заполняли 2.5 молярным раствором KCl (сопротивление микроэлектрода 10-20 МΩ). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку.

Для каждого препарата (нейрона) осуществляли запись электрической активности в контрольных условиях (не менее 2-х мин после стабилизации мембранного потенциала и частоты генерации потенциала действия после введения микроэлектрода в клетку) и непосредственно после добавления глюкозы (на протяжении последующих 2 мин). Свежеприготовленный (на основе Рингера) раствор D-глюкозы (ч.д.а., "Анализ Х", Беларусь) наносили на поверхность препарата ЦНС - ее конечная концентрация в термостатируемой ($20 \pm 0.5^{\circ}$ C) экспериментальной камере составляла 1 и 10 мМ соответственно. Для записи и последующего анализа электрических сигналов использовали специальные возможности программы электронного осциллографа InputWin [15].

Нейроны идентифицировали по размеру, расположению в пределах ЦНС, цвету, паттерну спонтанной активности. Действие глюкозы на препарат ЦНС оценивали по влиянию, оказываемому на ряд индикаторных клеток разных ганглиев. Работа выполнена на гигантских (giant) вставочных нейронах педальных ганглиев — дофаминергическом RPeD1 и серотонинергическом LPeD1, а также пептид-содержащих, электрически связанных клетках висцерального и правого париетального ганглиев VD1/RPaD2, интегрированных в состав, как минимум, нескольких нейронных сетей, вклю-

чая локомоторную и кардиореспираторную (расположение и карты, базовые характеристики, принципы номенклатуры и особенности идентификации представлены, например, в 16). Регистрация электрической активности от нейронов, находящихся в составе цельной ЦНС, т.е. в условиях сохранения взаимосвязей в пределах нейронной сети (в отличие от изолированных, выделением в культуру или посредством модификации синаптической передачи, клеток), позволяет оценить действие глюкозы в зависимости от функциональной принадлежности нейрона – сетевые генераторы ритма, определяющие реализацию моторных форм поведения животного, это комплекс совместно работающих структур [8]. Кроме того, "удачной" особенностью выбранных клеток является тот факт, что паттерн их электрической активности может служить дополнительным индикатором, позволяющим оценить эффекты глюкозы в ЦНС регулярные (regular) разряды, как правило, характеризуют собственную ритмику нейрона, в то время как нерегулярная (irregular) активность преимушественно связана с синаптическими влияниями (входами), которые получает данная клетка [16].

Накопление АФК в нейронах. В изолированной ЦНС при помощи пинцетов разрывали соединительнотканную оболочку ганглиев, механически высвобождая содержащиеся в них нейроны, получая суспензию клеток в физиологическом растворе Рингера объемом 200 мкл (для одной ЦНС/пробы). Для оценки накопления АФК в цитоплазме использовали флуоресцентный краситель: 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA, максимумы $\lambda_{ex} - 501$, $\lambda_{em} - 525$ нм, Sigma–Aldrich) в конечной концентрации 10 мкМ. Зонд добавляли непосредственно к суспензии клеток, выдерживая их в темноте, в течение 1 ч. По окончании инкубации, клетки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 5 мин), физиологический раствор с содержащимся в нем зондом удаляли, а клетки ресуспензировали свежим раствором Рингера. Процедуру отмывки клеток от следов зонда повторяли лважлы.

Подготовленные пробы (по 8 для каждой экспериментальной серии) объемом 225 мкл располагали в отдельных лунках 24-луночного планшетах. Оценку интенсивности флуоресценции проводили до (0 мин) и после экспериментального воздействия (на 5 мин). К клеткам опытной группы добавляли 25 мкл 100 мМ раствора глюкозы (итоговая концентрация в лунке – 10 мМ), а к клеткам контрольной группы – равновеликое количество нормального раствора Рингера. В качестве дополнительного (позитивного) контроля использовали пероксид водорода (1 мМ, конечная концентрация), вносимого в суспензию клеток, к которым предварительно были добавлены FeSO₄ · 7 H₂O и ЭДТА (оба в конечной концентрации 10 мкМ), га-

рантированно инициирующего образование АФК (прежде всего гидроксильного радикала).

Флуоресценцию (возбуждение 501 нм, эмиссия 529 нм) образующегося продукта измеряли посредством планшетного флуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA) при трехкратной повторности каждого измерения (в дальнейшем использовали одно среднеарифметическое значение). Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки (на 0 мин), принимали за 100%.

Статистический анализ. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики, с использованием возможностей программы Statistica 6.0. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро-Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения показателей для всех сравниваемых групп использовали параметрические методы оценки - t-критерий Стьюдента для зависимых пар, представляя данные в виде среднее ± ошибка среднего. Если нормальность распределения не была подтверждена для всех экспериментальных групп, использовали непараметрические методы оценки и сравнения полученных результатов – тест Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) или критерий Φ ридмана (χ^2) для дисперсионного анализа по однофакторной схеме (Fridman ANOVA) при сравнении двух или нескольких зависимых выборок соответственно, представляя данные в виде – медиана (нижний; верхний квартили). Число наблюдений (*n*) указано отдельно для каждой анализируемой выборки. Достоверными считались данные при уровне значимости (p), равном или меньшем 0.05.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрическая активность нейронов. Добавление глюкозы (конечная концентрация 1 мМ) не приводит к статистически достоверному изменению показателей спонтанной электрической активности (частота, уровень потенциала покоя) в краткосрочном, в течение первой и второй минут после возрастания содержания глюкозы в омывающем препарат физиологическом растворе Рингера, периоде ни для одного из исследованных нейронов. В частности, в отношении частоты генерации потенциала действия были определены следующе значения χ^2 (Fridman ANOVA): 0.51 (p = 0.99),



Рис. 1. Частота генерации потенциалов действия (spike frequency) в идентифицированных нейронах *Lymnaea stagnalis* в условиях быстроразвивающейся гипергликемии.

Указаны значения исследованных показателей (медиана, числа над столбиками), интерквартильный размах (планки погрешностей) и количество исследованных нейронов (*n*) для клетки каждого типа. Момент добавления глюкозы (Glucose, 10 мМ) отмечен стрелкой. Для всех нейронов указано значение χ^2 (Fridman ANOVA) и уровня значимости *p*. Статистически достоверные различия (*p* < 0.05, Wilcoxon matched pairs test) по сравнению с контрольными условиями (0–30 или 31– 60 с) дополнительно отмечены астериском (*) и решеткой (#) соответственно.

1.88 (*p* = 0.87) и 4.52 (*p* = 0.48) для RPeD1, LPeD1 и пары VD1/RPaD2 соответственно.

Увеличение содержания глюкозы во внеклеточном растворе до 10 мМ, напротив, приводит к выраженной модификации электрических характеристик изученных клеток сразу после добавления указанного вещества (рис. 1 и 2).

Так, в отношении дофамин-содержащего нейрона RPeD1 речь идет о слабовыраженной гиперполяризации его мембраны (на 5.4 ± 0.8 мВ, n = 8), уже на первой минуте после аппликации глюкозы, сохраняющейся на отмеченном уровне и в дальнейшем, т.е. на 2-й минуте. Тем не менее статистически достоверных изменений частоты генерации спонтанных потенциалов действия по сравнению с начальными (контрольными) условиями не было выявлено ни для одного изученного временного диапазона (рис. 1, 2а). Отдельно можно отметить некоторую трансформацию паттерна электрической активности данного нейрона - с фазической, когда группы спайков разделены выраженными временными промежутками безимпульсной активности, на тоническую, при которой потенциалы действия следуют друг за другом непрерывно (сравни верхнюю линию записи со средней и нижней на рис. 2а).

Для серотонин-содержащей клетки LPeD1 отмечена неизменность значения мембранного потенциала при гипергликемии для всего изученного временного интервала. Тем не менее в отношении частоты спонтанной импульсации установлено ее статистически достоверное уменьшение, наиболее выраженное (в 1.35 раза) непосредственно, в первые 30 с, после добавления глюкозы к препарату изолированной ЦНС (рис. 1, 2b). Изменения паттерна электрической активности также отмечено не было.

Прогрессивная деполяризация в ответ на возрастание уровня глюкозы характерна для пары электрически связанных, пептид-содержащих нейронов VD1/RPaD2. Для клетки VD1 уже на первой минуте после добавления глюкозы ее величина составила 5.6 ± 0.6 мВ (n = 6) от контрольного значения, достигая 10.8 ± 0.8 мВ (n = 6) на второй минуте эксперимента. В отношении нейрона VD1/RPaD2 колебания мембранного потенциала были не столь выражены -4.2 ± 0.6 и 8.8 ± 0.9 мВ (n = 6) для 1-й и 2-й минут наблюдения соответственно, сохраняя тем самым тенденцию, отмеченную для VD1. Частота генерации потенциала действия в указанных клетках увеличивалась уже на первой минуте после аппликации глюкозы в 1.2 раза по сравнению с исходной для контрольных условий, сохраняясь на достигнутом уровне и в последующем (рис. 1, 2с). Как и в случае с LPeD1, трансформации паттерна спонтанной электрической активности VD1/RPaD2 отмечено не было импульсация клеток носила отчетливый тонический характер.

Дополнительно проведенный анализ формы спайка в пейсмейкерном нейроне VD1, как наиболее чувствительной к действию глюкозы клетки среди исследованных нейронов, показал, что в условиях гипергликемии увеличивается скорость медленной деполяризации мембраны (возрастает наклон кривой, отражающей изменение мембран-



Рис. 2. Спонтанная электрическая активность идентифицированных нейронов *Lymnaea stagnalis* в условиях гипергликемии (глюкоза, конечная концентрация 10 мМ).

а – дофаминергический нейрон RPeD1, b – серотонинергический нейрон LPeD1, с – пептид-содержащий нейрон RPaD2. Для каждого нейрона: верхняя линия записи – контрольные условия, средняя – на первой, нижняя – на второй минуте после добавления глюкозы (один и тот же нейрон). Калибровка: по времени – 1 с, по амплитуде – 25, 35, 60 мВ для а, б, в соответственно.

ного потенциала при развитии потенциала действия, рис. 3b), уменьшая время достижения порогового потенциала, предопределяя тем самым усиление импульсной активности клетки (рис. 3a). В отношении временны́х показателей других фаз спайка (фаз де- и реполяризации, следовой гиперполяризации) выраженных изменений выявлено не было.

Анализ накопления АФК в нейронах. Использование флуоресцентного зонда позволило оценить возможность генерации АФК в изолированных клетках нервных ганглиев *Lymnaea* в первые минуты после создания условий гипергликемии. Добавление к суспензии клеток глюкозы (10 мМ, конечная концентрация) не приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции даже по прошествии 5 мин после начала действия вещества, полностью повторяя реакцию клеток в контрольных условиях (рис. 4). В то же время искусственная инициация окислительных процессов посредством добавления к клеточной суспензии пероксида водорода (положительный контроль) незамедлительно, уже к 5-й минуте, приводит к ~40% увеличению интенсивности флуоресценции, подтверждая тем самым накопление АФК в цитозоле.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные подтверждают способность ряда крупных центральных интернейронов *Lymnaea* выступать в качестве, как минимум, индикаторных клеток, отражающих быструю рецепцию глюкозы (при возрастании ее уровня во внеклеточной среде) в ЦНС. Наиболее существенные сдвиги частоты импульсации отмечены в отношении пары



Рис. 3. Спонтанная электрическая активность нейрона VD1 *Lymnaea stagnalis* в норме и в условиях гипергликемии (глюкоза, конечная концентрация 10 мМ).

 а — фрагмент регистрации, b — при наложении потенциалов действия друг на друга (выравнивание по уровню потенциала покоя мембраны).

Для а: верхняя линия записи — контрольные условия, нижняя — после добавления глюкозы (на 2-й минуте). Для b: серая линия — контрольные условия, темная после добавления глюкозы. Калибровка: по времени — 1 с, по амплитуде — 50 мВ.

пептидсодержащих (более 10 форм) нейронов VD1/RPaD2, интегрированных в кардиореспираторную нейронную сеть [17, 18], — их отростки обнаружены, в том числе, в предсердии прудовика, некоторые из пептидов имеют сходство с кардиостимулирующим α 1-пептидом *Aplysia* [19], а в условиях гипергликемии наблюдается увеличение частоты сердечных сокращений у *Lymnaea* [20]. Ней-

рон VD1 является ведущим в этой паре (обладает пейсмейкерными свойствами. в отличие от связанного с ним посредством электрического синапса RPaD2 [21]), поэтому эффекты глюкозы, очевидно, обусловленны преимущественным действием в отношении его мембраны, что косвенно полтверждается большей степенью изменения его потенциала покоя по сравнению с RPaD2. Важно подчеркнуть, что неизменность паттерна работы данных клеток (тонический характер. т.е. отсутствие выраженных синаптических входов) как в контрольных, так и экспериментальных условиях, указывает на то, что наблюдаемые эффекты обусловлены внутренними (собственными) перестройками их мембран, а не индуцированы сторонними нейронами сети вследствие модификации синаптической передачи. Модуляция в работе сердечной мышцы чрезвычайно значима в плане формирования гидроскелета моллюска, во многом определяя движения его тела, в том числе и локомоцию, выраженно изменяющихся в ходе пищедобычи. В этой связи отмеченное снижение скорости локомошии прудовика при движении по пищевому субстрату и в сытом состоянии [22] хорошо коррелирует с наблюдаемым снижением частоты генерации потенциалов действия в серотонин-содержашем нейроне LPeD1. регулирующим активность локомоторной сети Lymnaea [23]. Схожий эффект подавления спайковой активности, наблюдаемый в течение первых минут после приложения глюкозы (250 иг/мл. т.е. 1.39 мМ), отмечен и для изолированных мотонейронов локомоторной сети (серотонинергические



Рис. 4. Флуоресценция (Fluorescence) в суспензии изолированных клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*. а – флуоресценция в начальный момент времени (0 min) принята за 100% (для каждой серии отдельно), b – флуоресцен-

а — флуоресценция в начальный момент времени (о піп) принята за 100% (для каждой серий отдельно), б — флуоресценция в контрольной группе принята за 100% (для каждого временно́го интервала (0 или 5 мин) отдельно).

"Ringer" – контроль (нормальный физиологический раствор Рингера), "Glucose" – экспериментальные условия (глюкоза, конечная концентрация 10 мМ), "Peroxide" – положительный контроль (пероксида водорода, конечная концентрация 1 мМ).

Данные представлены в виде среднее арифметическое \pm ошибка среднего. Число проб (*n*) – 8 для каждой серии эксперимента. Статистически достоверные различия (*t*-критерий Стьюдента для зависимых (а) или независимых (b) групп данных) отмечены астериском (*), дополнительно указана величина уровня значимости *p*.

клетки PeA-кластера), хотя для этих же клеток в составе цельной ЦНС эффект был выражен слабее [24].

Напомним, что описываемые нами влияния обнаружены в препаратах изолированной ЦНС, не содержащей буккальных ганглиев. С этих позиций, глюкоза может обладать сигнальными свойствами, реализуя корригирующие влияния в отношении центральных нейронов как агент объемной передачи сигнала, дополняя истинные синаптические влияния (входы) со стороны глюкозо-чувствительных клеток буккальных ганглиев и/или их возможных аналогов из состава центрального кольца ганглиев. При этом некоторые из структур в составе ЦНС оказываются относительно нечувствительны к такому воздействию – дофаминсодержащий нейрон RPeD1, как ключевой элемент центрального генератора респираторного ритма [25], - быстрой (в течение минут) модификации (интенсификации или терминации) легочного дыхания в ходе пищедобычи не наблюдается.

Гиперполяризация мембраны, выявленная в отношении этой клетки при действии глюкозы, может быть связана с модификацией функций ионных каналов плазмалеммы, во многом определяющих характер поглощения глюкозы, по крайней мере в отношении интестинальных клеток кишки [26]. Как правило, речь идет о катион-проводящих путях переноса (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) через мембрану, а единственным катионом, усиление трансмембранного переноса которого может привести к гиперполяризации мембраны, является ион калия. Тем не менее в отношении нервных клеток как позвоночных [27], так и беспозвоночных [28], возрастание содержания глюкозы в интерстиции ассоциируется с инактивацией АТФ-чувствительных К⁺-каналов, приводящей скорее к деполяризации мембраны. В этой связи, отмеченный нами эффект в отношении мембранного потенциала RPeD1, вероятно, следует отнести за счет модификации (предположительно, ослаблению) синаптических входов к указанной клетке, – как известно, нейрон RPeD1 интегрирует сигналы со стороны других нейронов, или их групп, расположенных в пределах центрального кольца ганглиев ЦНС *Lymnaea* [16]. В пользу этого говорит трансформация паттерна его электрической активности (фазический характер, отражающий, как правило, наличие синаптических входов, сменяется на тонический), а также тот факт, что гиперполяризация мембраны RPeD1 выявлена при использовании безкальциевого/высокомагниевого раствора, т.е. в случае блокады химической синаптической передачи в ЦНС Lymnaea [29].

Содержание глюкозы в гемолимфе *Lymnaea* во многом определяется характером питания животного — возрастание уровня глюкозы является стимулом для последующего ускорения процессов ро-

ста и размножения [30]. Согласно данным работ середины 70-х годов XX века базальный уровень глюкозы в гемолимфе Lymnaea относительно невелик -30 мкг/мл (т.е. 0.16 мМ), что в целом подтверждается и нашими данными [12]. С этих позиций отсутствие эффектов глюкозы в концентрации 1 мМ, т.е. большей базальной почти на порядок, выглядит несколько удивительным. Однако стоит указать на тот факт, что исходный уровень глюкозы в гемолимфе определяется, в том числе, и характером пищи, - высокоуглеводная пища "легко" повышает его до 86 мкг/мл (0.48 мМ), т.е. колебания содержания глюкозы в пределах 1 мМ не являются чем-то особенным, в сравнении с уже отмеченным скачком до 760 мкг/мл (4.22 мМ) у сытых особей [11]. Будет уместным предположить, что кратковременное пиковое содержание глюкозы во внутренней среде Lymnaea вполне может достигать уровня около 10 мМ, т.е. обнаруженные нами эффекты вполне физиологичны.

Несмотря на интенсификацию окислительных процессов, сопровождающую поглощение глюкозы, нами не обнаружено быстрого, лавинообразного, возрастания уровня АФК в цитоплазме клеток нервных ганглиев прудовика. Это может свидетельствовать как об относительно медленном накоплении АФК, вызываемых утилизацией "дополнительной" глюкозы, так и о развитой системе внутриклеточной антиокислительной защиты в нейронах (многие из них содержат ретиноиды [31]), способной купировать резкое возрастание свободно-радикального фона внутри клеток, по крайней мере в начальном периоде после воздействия.

Возрастание скорости медленной деполяризации, отмеченной при анализе формы спайка в VD1, говорит о модификации (увеличении) Na⁺-проводимости мембраны, вероятно, как следствие интенсификации работы электрогенного Na⁺-глюкозного котранспорта, как это отмечено в отношении нейроэндокринных светло-зеленых клеток (light-green cells, LGC) церебральных ганглиев [32]. Увеличение уровня глюкозы (максимальный эффект наблюдался при 5 мМ) приводит к деполяризации и усилению импульсации этих клеток, сопровождаемой выбросом "коктейля" разнообразных нейропептидов, в том числе инсулинподобных (molluscan insulin-related peptide, MIP), определяющих реализацию метаболических процессов на уровне ЦНС и всего организма [33, 34]. Нормализация содержания глюкозы, по крайней мере в отношении ее пиковых значений, фактически десенситизирует нейроны, делая возможным реализацию нового цикла реакций, инициируемых резким увеличением уровня данного метаболита в гемолимфе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резкое увеличение внеклеточного уровня глюкозы вызывает модификацию показателей электрической активности идентифицированных вставочных нейронов Lymnaea stagnalis в зависимости от их функциональной принадлежности. Наиболее чувствительными клетками, реагирующими на повышение уровня глюкозы в окружающем ЦНС пространстве, оказываются пептилергические кардиорегуляторные нейроны VD1/RPaD2 и серотонинсодержащие клетки (LPeD1) локомоторной сети, в то время как дофаминергические нейроны центрального генератора дыхательного ритма (RPeD1) практически не изменяют свои электрические характеристики. Это может указывать за способность глюкозы, как фактора объемной передачи, выступать в роли быстрого метаболического сигнала, определяющего поведение нейронных сетей мозга моллюска и реализацию ее эффектов на уровне целого организма.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта ГПНИ "Конвергенция-2020" (задание 3.10.2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.А.В.), сбор данных (С.А.В., Ш.В.Н. – электрофизиология, С.А.В. – анализ накопления АФК), обработка данных (С.А.В., Ш.В.Н.), написание и редактирование манускрипта (С.А.В., Ш.В.Н.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Steinbusch L., Labouèbe G., Thorens B.* (2015) Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. Trends Endocrinol Metab 26: 455–466. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.005
- Koekkoek L.L., Mul J.D., la Fleur S.E. (2017) Glucosesensing in the reward system. Front. Neurosci. 11: 716. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00716
- Dus M., Lai J.S., Gunapala K.M., Min S., Tayler T.D., Hergarden A.C., Geraud E., Joseph C.M., Suh G.S. (2015) Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in Drosophila. Neuron 87: 139–151. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.032

- Mita K., Okuta A., Okada R., Hatakeyama D., Otsuka E., Yamagishi M., Morikawa M., Naganuma Y., Fujito Y., Dyakonova V., Lukowiak K., Ito E. (2014) What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? Neurobiol Learn Mem 107: 1–12. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.10.013
- López-Gambero A.J., Martínez F., Salazar K., Cifuentes M., Nualart F. (2019) Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis. Mol Neurobiol 56: 769–796. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1099-4
- Lee C.Y. Dallérac G., Ezan P., Anderova M., Rouach N. (2016) Glucose tightly controls morphological and functional properties of astrocytes. Front Aging Neurosci 8: 82.

https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00082

- Fodor I., Hussein A.A., Benjamin P.R., Koene J.M., Pirger Z. (2020) The unlimited potential of the great pond snail, Lymnaea stagnalis. Elife 9: e56962. https://doi.org/10.7554/eLife.56962
- Benjamin P.R. (2012) Distributed network organization underlying feeding behavior in the mollusk Lymnaea. Neural Syst Circuits 2: 4. https://doi.org/10.1186/2042-1001-2-4
- Alania M., Dyakonova V., Sakharov D.A. (2004) Hyperpolarization by glucose of feeding-related neurons in snail. Acta Biol Hung 55: 195–200. https://doi.org/10.1556/ABiol.55.2004.1-4.24
- Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J., Valko M. (2017) Targeting free radicals in oxidative stressrelated human diseases. Trends Pharmacol Sci 38: 592– 607.

https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005

- Scheerboom J.E.M., Hemminga M.A., Doderer A. (1978) The effects of a change of diet on consumption and assimilation and on the haemolymph-glucose concentration of the pond snail Lymnaea stagnalis (L) Proc Kon Ned Akad Wet, Ser C 81: 335–346.
- Сидоров А.В., Маслова Г.Т. (2009) Система антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска Lymnaea stagnalis. Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2: 90–94. [Sidorov A.V., Maslova G.T. (2009) Antioxidant defense in the central nervous ganglions of mollusk Lymnaea. Proc Nat Acad Sci of Belarus. Biol Series. 1: 91–95. (In Russ)].
- 13. *Moghadam H.F., Winlow W., Moroz L.L.* (1995) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide (NO) on neuronal discharges and intracellular calcium concentration in the molluscan CNS. Acta Biol Hung 46: 145–153.
- Sidorov A.V. (2012) Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified Lymnaea neurons. Invert Neurosci 12: 63–68. https://doi.org/10.1007/s10158-012-0128-7
- Солтанов В.В., Бурко В.Е. (2005) Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных. Новости мед.-биол. наук 1: 91–95. [Soltanov V.V., Burko V.E. (2005) Computer programs for electrophysiological data-processing. News of Biomed Sci 1: 91–95. (In Russ)].
- 16. *Benjamin P.R., Winlow W.* (1981) The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurones in the isolated brain of Lymnaea stagnalis (L.) Comp Biochem Physiol 70A: 293–307.

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

- 17. Kerkhoven R.M., Croll R.P., Van Minnen J., Bogerd J., Ramkema M.D., Lodder H., Boer H.H. (1991) Axonal mapping of the giant peptidergic neurons VD1 and RPD2 located in the CNS of the pond snail Lymnaea stagnalis, with particular reference to the innervation of the auricle of the heart. Brain Res 565: 8–16. https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91730-0
- Kodirov S.A. (2011) The neuronal control of cardiac functions in Molluscs. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 160: 102–116. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.014
- Buck L.B., Bigelow J.M., Axel R. (1987) Alternative splicing in individual Aplysia neurons generates neuropeptide diversity. Cell 5: 127–133. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90017-1
- Сидоров А.В., Шаденко В.Н., Казакевич В.Б. (2019) Реакции идентифицированных кардиорегуляторных нейронов ЦНС моллюска Lymnaea stagnalis в условиях гипергликемии и при действии инсулина. Журн Белорус гос ун-та Биология 3: 49–58. [Sidorov A.V., Shadenko V.N., Kazakevich V.B. (2019) Responces of identified cardioregulatory neurons within CNS of mollusc Lymnaea stagnalis at hyperglycemia and insulin action. Journal of the Belarusian State University. Biology 3: 49–58. (In Russ)]
 - https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-3-49-58
- Wildering W.C., van der Roest M., de Vlieger T.A., Janse C. (1991) Age-related changes in junctional and non-junctional conductances in two electrically coupled peptidergic neurons of the mollusc Lymnaea stagnalis. Brain Res 547: 89–98.

https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90578-j

- Sidorov A.V. (2006) Coordination of locomotor activity of mollusc Lymnaea stagnalis at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). J Evol Biochem Physiol 42: 43–48.
- Vorontsov D.D., Tsyganov V.V., Sakharov D.A. (2004) Phasic coordination between locomotor and respiratory rhythms in Lymnaea. Real behavior and computer simulation. Acta Biol Hung 55: 233–227. https://doi.org/10.1556/ABiol.55.2004.1-4.28
- Dyakonova V., Hernádi L., Ito E., Dyakonova T., Zakharov I., Sakharov D. (2015) The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose. Biophysics (Nagoya-shi) 11: 55–60. https://doi.org/10.2142/biophysics.11.55
- Lukowiak K., Martens K., Orr M., Parvez K., Rosenegger D., Sangha S. (2006) Modulation of aerial respiratory behaviour in a pond snail. Respir Physiol Neurobiol 154: 61–72.

https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.02.009

- Chen L., Tuo B., Dong H. (2016) Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. Nutrients 8: 43. https://doi.org/10.3390/nu8010043
- Huang C.W., Huang C.C., Cheng J.T., Tsai J.J., Wu S.N. (2007) Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. J Neurosci Res 85: 1468–1477. https://doi.org/10.1002/inr.21284
- Inoue I., Tsutsui I., Brown E.R. (1997) K+ accumulation and K+ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid Sepioteuthis. J Physiol 500(Pt 2): 355–366. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022026
- 29. Эль Рахал А., Сидоров А.В. (2015) Взаимосвязь между показателями легочного дыхания и электрическими характеристиками идентифицированного нейрона респираторной сети моллюска Lymnaea stagnalis. Новости мед.-биол. наук 11 (1): 5–8. [Elrahal A., Sidorov A.V. (2015) Correlation between lung respiration and electrical properties of identified neuron within respiratory network in mollusc Lymnaea stagnalis. News of Biomed Sci 11 (1): 5–8. (In Russ)].
- Veldhuijzen J.P. (1974) Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail Lymnaea stagnalis. Neth J Zool. 25: 89–102. https://doi.org/10.1163/002829675X00146
- Dmetrichuk J.M., Carlone R.L., Jones T.R., Vesprini N.D, Spencer G.E. (2008) Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-cis retinoic acid on isolated neurons. J Neurosci 28: 13014–13024. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-08.2008
- 32. Kits K.S., Bobeldijk R.C., Crest M., Lodder J.C. (1991) Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology 417: 597–604. https://doi.org/10.1007/bf00372957
- 33. *Geraerts W.P.* (1992) Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in Lymnaea stagnalis. Gen Comp Endocrinol 86: 433–44. https://doi.org/10.1016/0016-6480(92)90068-u
- 34. Li K.W., Geraerts W.P., van Loenhout H., Joosse J. (1992) Biosynthesis and axonal transport of multiple molluscan insulin-related peptides by the neuroendocrine light green cells of Lymnaea stagnalis. Gen Comp Endocrinol 87: 79–86.

https://doi.org/10.1016/0016-6480(92)90152-a

Electrical Activity of Identified Neurons in the Central Nervous System of a Mollusk *Lymnaea stagnalis* under Acute Hyperglycemia

A. V. Sidorov^{*a*,[#]}, and V. N. Shadenko^{*a*,*b*}

^a Belarusian State University, Minsk, Belarus ^b Republican Research and Practice Center for Mental Health, Minsk, Belarus [#]e-mail: sidorov@bsu.by Rapid responses of the key interneurons identified in the respiratory (RPeD1), locomotor (LPeD1) and cardioregulatory (VD1/RPaD2) networks of the CNS ganglia in a mollusk *Lymnaea stagnalis* under the action of Dglucose (1 and 10 mM) were studied. In acute hyperglycemia (10 mM), an increase in the firing frequency of VD1/RPaD2 neurons and its decrease in LPeD1 neurons, as observed already within the first minute after exposure, were detected; at the same time, the firing frequency of RPeD1 neurons remained intact. Bath application of glucose at lower concentrations (1 mM) led to no significant changes in the electrical activity of all the above neurons. The observed effects were not associated with an increased production of reactive oxygen species (ROS) in the cytoplasm, since the fluorescent probe (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) failed to reveal their accumulation in the cell suspension of CNS ganglia after glucose (10 mM) application during the shortterm period (5 min) as compared to the control. Action potential shape analysis under conditions of hyperglycemia (glucose, 10 mM) revealed in highly glucose-sensitive VD1/RPaD2 neurons an increase in the rate of slow membrane depolarization to reach a threshold potential, while the other spike phases remained unchanged. It is assumed that the glucose effects toward the frequency characteristics of the above *L. stagnalis* interneurons are realized via modification (intensification) of the electrogenic Na⁺-coupled glucose transporter and depend on their functional affiliation (incorporation into a specific neural network).

Keywords: glucose, neuron, mollusk, action potential, reactive oxygen species

—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

ВЛИЯНИЕ D-СЕРИНА НА ТРЕВОЖНО-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И СПОСОБНОСТЬ К ПРОСТРАНСТВЕННОМУ ОБУЧЕНИЮ КРЫС ЛИНИИ ГК, СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ НА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К КАТАТОНИЧЕСКИМ РЕАКЦИЯМ

© 2021 г. О. И. Прокудина^{1,*}, Т. А. Алехина¹

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: petrenko@bionet.nsc.ru Поступила в редакцию 12.03.2021 г. После доработки 13.08.2021 г. Принята к публикации 31.08.2021 г.

В настоящее время накапливаются доказательства важной роли ко-агониста глицинового сайта NMDA-рецепторов D-серина в патогенезе психических расстройств. В литературе обсуждается возможность коррекции когнитивных нарушений и негативной симптоматики при шизофрении с его помощью. Учитывая терапевтический потенциал D-серина, представляется важным исследовать его действие на экспериментальных моделях патологического поведения. Данная работа проведена на крысах линии ГК ("генетические кататоники"), предлагаемых как модель кататонических нарушений, и на крысах Вистар, не склонных к кататоническим реакциям. Во многих исследованиях используются достаточно высокие дозы D-серина, при этом уже установлено, что введение больших доз препарата имеет отрицательные побочные эффекты. Цель данной работы – исследовать влияние низких доз D-серина на поведение в тестах светло-темной камеры, приподнятого крестообразного лабиринта и на способность к обучению в лабиринте Барнс у крыс линии ГК, а также у контрольных животных. В данной работе показано, что на крыс Вистар внутрибрюшинное введение 50 мг/кг D-серина оказало как анксиолитический, так и прокогнитивный эффекты. У крыс линии ГК доза 100 мг/кг снизила двигательную активность в приподнятом крестообразном лабиринте, введение 50 мг/кг D-серина снизило двигательную активность в лабиринте Барнс, но не повлияло на время нахождения убежища.

Ключевые слова: кататония, каталепсия, тревожность, обучение, D-серин, линия ГК **DOI:** 10.31857/S0044452921060085

D-серин является эндогенным ко-агонистом глицинового сайта связывания глутаматных NMDA-рецепторов, играющих важнейшую роль в психических функциях. С гипофункцией глутаматергической передачи через NMDA-рецепторы связывают патогенез такого тяжелого заболевания, как шизофрения [1]. При шизофрении может наблюдаться целый спектр нарушений. Выделяют позитивные (бред, галлюцинации, психомоторное возбуждение), негативные (дефицит воли, социальный дефицит, каталепсия) и когнитивные симптомы (расстройство внимания, снижение памяти и др.) шизофрении. Считается, что позитивная симптоматика лучше поддается купированию соответствующими антипсихотическими препаратами, тогда как негативные симптомы и когнитивные нарушения трудно поддаются фармакологической коррекции [2, 3]. При этом когнитивные расстройства играют значимую роль в формировании шизофренического дефекта, и диагностируются при различных видах шизофрении [4, 5], что делает

актуальным поиск новых терапевтических агентов. В настоящее время в литературе обсуждается вклад D-серина в патогенез шизофрении [6, 7]. Некоторые клинические испытания подтверждают, что при шизофрении терапия D-серином, в дополнение к традиционному антипсихотическому лечению, может облегчать негативные симптомы, и улучшать когнитивные функции [8–11]. У здоровых людей также обнаружен положительный эффект D-серина при возрастных изменениях познавательных функций мозга [12]. Экзогенное введение D-серина стимулирует NMDA-рецепторы, не вызывая эксайтотоксических эффектов, следующих за введением прямых агонистов NMDA-рецепторов или самого глутамата [13].

Показана связь D-серина с патологическими состояниями и на экспериментальных моделях. Мыши с генотипом SR —/—, с нокаутом гена серин-рацемазы (фермента синтеза D-серина), и обладающие сниженным на 85% уровнем D-серина в коре и гиппопкампе, демонстрируют высокую го-

ВЛИЯНИЕ D-СЕРИНА НА ТРЕВОЖНО-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ

мологию нейропатологических и когнитивных показателей, связанных с шизофренией [7]. На трансгенных моделях [14] и в экспериментах с использованием антагониста NMDA-рецепторов фенциклидина [15] продемонстрированы анксиолитический, антидепрессивный и прокогнитивный эффекты D-серина. Показано, что введение D-серина крысам может предотвратить вызванное стрессом нарушение когнитивных функций [16].

Открытым остается вопрос о безопасных и эффективных дозах препарата [10]. Во многих работах [14-16], посвященных изучению влияния D-серина на поведение, используются достаточно высокие дозы вещества (до 3 г/кг). При этом показано возникновение двигательных нарушений у животных [17, 18], и нефротоксичность у людей [19, 20] при приеме высоких доз D-серина.

Учитывая терапевтический потенциал D-серина. представляется важным исследовать его действие на модели патологического поведения. В ИЦиГ СО РАН из крыс линии Вистар путем селекции на усиленную реакцию пассивно-оборонительного застывания была получена линия ГК (названная так от первых букв слов "генетические кататоники"). Накопленные данные позволяют рассматривать линию ГК как модель кататонических нарушений [21-23]. Кататонические расстройства, включающие в себя как акинетический полюс (кататонический ступор и каталепсию), так и гиперкинетический – кататоническое возбуждение, у человека наблюдаются при целом спектре заболеваний (шизофрения, аффективные расстройства и другие). Застывание крыс линии ГК, на которое проводился отбор, выражалось в неподвижной вертикальной позе с элементами "восковой гибкости", возникающей в ответ на прижатие животного палочкой-тестером к стенке клетки и сохраняемой после того, как тестер убирался. В дальнейшую селекцию отбирались те животные, у которых удавалось вызвать застывание не менее 10 сек в нескольких тестах. Отбор на предрасположенность к каталепсии привел не только к повышению частоты и интенсивности застывания, но и к увеличению частоты встречаемости крыс с повышенной возбудимостью - оборонительном поведении с вокализацией, пароксизмальным бегством и прыжками при манипуляциях с ними. Эти формы поведения у каждой особи могут либо сочетаться друг с другом в разной степени, либо сменять одна другую [24, 25].

Цель нашей работы – исследовать влияние низких доз D-серина на тревожно-подобное поведение и на способность к обучению крыс линии ГК, предрасположенных к кататоническим реакциям.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В исследовании использовались взрослые (6.5-7 мес) самцы крыс линий ГК, в качестве контроля использованы крысы Вистар, не предрасположенные к кататоническим реакциям. Животные содержались в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. За 3 дня до начала тестирования интактные крысы рассаживались в индивидуальные клетки, в которых содержались до конца эксперимента. Размер групп составлял 8-11 животных. Содержание крыс и экспериментальные процедуры находятся в соответствии с международными нормами этического обращения с животными и принципами Базельской декларации, а также одобрены Биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН (протокол № 43 от 28.09.2018).

Схема эксперимента

В первой группе животных изучалось тревожноподобное поведение: на 4-й день после рассадки проводился тест светло-темной камеры, на 6-й – тест приподнятого крестообразного лабиринта. Во второй группе животных на 4-й день после рассадки начиналось исследование способности к пространственному обучению в лабиринте Барнс. Перед каждым животным установка для тестирования очищалась с помощью 70% раствора этанола. Тестирование проводилось с 14:00 до 18:00 при искусственном освещении, в изолированном помещении с фиксацией на видеокамеру без присутствия экспериментатора. Видеозаписи обрабатывались исследователем, "слепым" к условиям эксперимента. Для каждого анализируемого параметра фиксировались число, длительность и латентный период проявления паттерна; в каждом тесте оценивался уровень дефекации.

Тест светло-темной камеры (СТК)

СТК состояла из двух отсеков (темного и светлого) размером $30 \times 30 \times 30$ см, соединенных круглым отверстием. Высаживание проводилось в светлый отсек освещенностью 350 люкс. Освещенность темного отсека составляла 10 люкс. С помощью программы полуавтоматической регистрации поведенческих паттернов Real Timer (ООО "НПК Открытая Наука", Москва) в течение 5 мин оценивались: время в светлом отсеке, стойки на задних лапах и груминг (умывание) в светлом отсеке, число переходов между отсеками, неполные выходы из темного отсека с последующим возвращением (stretched-attend posture, SAP), эпизоды застывания (полной неподвижности без движений головы) в светлом отсеке.

Тест приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ)

ПКЛ состоял из двух открытых и двух закрытых сбоку (высота стенок 40 см) рукавов длиной 50 см и шириной 10 см, расположенных на высоте 60 см. Уровень освещенности в открытых рукавах составлял 350 люкс, в закрытых – 130 люкс. Высаживание крысы проводилась в центр, мордой в открытый рукав, в сторону, противоположную экспериментатору. В течение 5 минут оценивались стойки, груминг, переходы между рукавами, неполные выходы из закрытого рукава с последующим возвращением (stretched-attend posture, SAP), свешивания головы/плеч с открытого рукава вниз (headdipping), эпизоды застывания (полной неподвижности без движения головы), длительность нахождения в различных частях лабиринта.

Пространственное обучение

Лабиринт Барнс используется для оценки пространственного обучения и памяти и основан на инстинктивном стремлении грызунов к избеганию открытых пространств и предпочтению закрытых, темных отсеков [26]. Тестирование проводилось в установке производства ООО "НПК Открытая наука", модель TS1101-R (диаметр поля 122 см, на периферии поля расположено 18 лунок). Уровень освещенности на поверхности лабиринта составлял 350 люкс. По четырем сторонам от лабиринта на стенах были размещены контрастные изображения геометрических фигур (на расстоянии от центра около 1.5 м). Процедура тестирования включала в себя трехминутные сессии с обучением (1 раз в день в течение 5 дней) и проверку навыка (на 7 день) [27]. Оценивались латентный период захода в целевую лунку (закрытый отсек), длина пройденного пути до захода в целевую лунку, средняя скорость перемещения. Видеотрекинг и регистрация поведенческих параметров проводились с использованием программы EthoVision XT 15 (Noldus).

Введение препаратов

За 45 минут до каждого помещения в установку для тестирования крысам проводилась внутрибрюшинная инъекция объемом 1 мл/кг веса. Животным контрольных групп вводился физиологический раствор (0.9%), животным эксперименталь-D-серин (Sigma-Aldrich), ных групп _ растворенный в физиологическом растворе (0.9%). При исследовании тревожно-подобного поведения использовали D-серин в дозах 50 и 100 мг/кг, при исследовании способности к обучению в дозе 50 мг/кг. В работе [28] было показано, как отсутствие нефротоксичности D-серина для крыс в выбранных нами дозах, так и то, что введение относительно малых доз D-серина вызывает увеличение его уровня в плазме крови выше базального.

Статистика

Статистическую обработку результатов проволили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Stat Soft, USA). Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для данных, имеющих нормальное распределение, применялись методы параметрической статистики. Результаты обучения в лабиринте Барнс обработаны с помощью дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений (в качестве факторов были взяты день обучения и введение препарата), post-hoc анализ сделан с использованием критерия Tukey HSD. Сравнение результатов, полученных при проверке навыка, проведено с помощью One-Way ANOVA. На рисунках представлены средние значения и ошибка среднего (M ± SEM). Статистически значимыми считали различия при *p* < 0.05. В случаях, когда проверка данных не подтверждала нормальность распределения, при дальнейшей обработке использовались методы непараметрической статистики. Для анализа результатов использовали дисперсионный анализ Kruskal-Wallis ANOVA. Апостериорные межгрупповые сравнения проводились с использованием критерия Манн–Уитни с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения (для трех групп критический уровень значимости был принят p < 0.017). В таблицах результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала (Me [Q1-Q3]).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние D-серина на тревожно-подобное поведение

Влияние препарата на исследованные параметры в тесте светло-темной камеры у крыс линий ГК и Вистар посредством Kruskal-Wallis ANOVA не обнаружено. Как показатели, характеризующие тревожно-подобное поведение в СТК (латентный период захода в темный отсек, число выходов в светлый отсек из темного), исследовательскую активность, так и длительность застывания в светлом отсеке не изменились под влиянием D-серина. В отношении застывания стоит отметить, что крысы Вистар практически не проявляли этой формы поведения - только у одного животного из контрольной группы был зафиксирован один эпизод застывания длительностью 3.7 сек. У крыс ГК застывание в светлом отсеке СТК наблюдалось у большинства животных во всех группах (у 66.7% животных контрольной группы, у 63.6%, получавших D-серин в дозе 50 мг/кг, и у 60% – в дозе 100 мг/кг).

В тесте ПКЛ обнаружены некоторые изменения в поведении животных под воздействием D-серина. Паттерны поведения, для которых был показан эффект введения препарата, у крыс Вистар приведены в табл. 1. Межгрупповые различия, получен-

| | Доза D-серина | | | Эффект дозы |
|--|-----------------------------|--------------------|---------------------|---|
| Паттерны поведения Ме [Q1–Q3] | 0 мг/кг (контроль) n = 8 | 50 мг/кг n = 11 | 100 мг/кг n = 10 | (Kruskal–Wallis ANOVA): H $(2, n = 29)$ |
| Время в центре, сек | 7.2 | 24.7 | 2.8 | 6.49 |
| | [1.5–17.3] | [9.9–29.7] | [0.8–11.5] | (<i>p</i> < 0.05) |
| Лат. период захода в закрытый рукав, сек | 2.1 | 22.1 | 1.7 [#] | 7.84 |
| | [1.5–3.0] | [5.1–42.1] | [1.3–5.5] | (<i>p</i> < 0.05) |
| Число заходов в закрытые рукава | 3.5 | 6.0 | 2.5 [#] | 6.25 |
| | [1.5–7] | [5.0–9.0] | [2.0–5.0] | (<i>p</i> < 0.05) |
| Общее число заходов в рукава | 4.5 | 10.0 | 4.5 [#] | 6.65 |
| | [3.0–9.0] | [8.0—12.0] | [3.0-8.0] | (<i>p</i> < 0.05) |
| Неполный выход из закрытого рукава, N | 4.5 | 5.0 | 1.5 [#] | 6.30 |
| | [2.0–6.0] | [4.0–8.0] | [1.0-4.0] | (<i>p</i> < 0.05) |
| Свешивания с открытого рукава, N | 0.0 [0.0–1.5] | 4.0* [2.0–5.0] | 0.0 | 7.30 (<i>p</i> < 0.05) |
| Свешивания с открытого рукава, сек | 0.0 | 1.7* | 0.0 | 6.30 |
| | [0.0–0.8] | [0.9–6.5] | [0.0-8.2] | (<i>p</i> < 0.05) |
| Лат. период свешивания с открытого рукава, сек | 301 | 11.2* | 301 [#] | 12.5 |
| | [165.6–301] | [7.1–25.6] | [30.3–301] | (<i>p</i> < 0.01) |
| Груминг, N | 3.0 | 0.0* | 2.5 [#] | 10.79 |
| | [1.0–4.5] | [0.0–0.0] | [1.0–6.0] | (<i>p</i> < 0.01) |
| Груминг, сек | 12.7 [0.3–35.7] | 0.0* [0.0–0.0] | 14.5 [#] | 8.86 (<i>p</i> < 0.05) |
| Лат. период груминга, сек | 169.5 | 301* | 205.2 [#] | 9.09 |
| | [127.6–259.5] | [301–301] | [98.8–269.9] | (<i>p</i> < 0.02) |

Таблица 1. Влияние D-серина на поведение в тесте ПКЛ крыс Вистар

Примечание: * - p < 0.017: 50 мг/кг D-серина vs. 0 мг/кг D-серина (контроль);

[#] – *p* < 0.017: 50 мг/кг D-серина vs. 100 мг/кг D-серина.

ные с учетом поправки на множественные сравнения, отмечены символами.

Крысы Вистар, получавшие 50 мг/кг D-серина, демонстрируют в ПКЛ увеличение длительности и числа свешиваний с открытых рукавов вниз (headdipping) и снижение смещенной активности (груминг) по сравнению с контрольной группой. Эти изменения можно рассматривать как свидетельство анксиолитического действия D-серина этой дозе [29, 30]. Также у крыс, получавших 50 мг/кг D-серина, снижена смещенная активность и повышена двигательная и исследовательская активность по сравнению с животными, получавшими D-серин в дозе 100 мг/кг. Отличий между крысами Вистар, получавшими 100 мг/кг D-серина, и контрольной группой не обнаружено.

Паттерны поведения, для которых был показан эффект введения D-серина, у крыс линии ГК представлены в табл. 2. Крысы линии ГК, получавшие 100 мг/кг препарата (табл. 2) продемонстрировали в ПКЛ снижение двигательной активности. Кроме общепринятых параметров в тесте ПКЛ мы оценивали реакцию застывания. У крыс Вистар мы не зафиксировали застывания ни у одной особи. У всех крыс линии ГК в тесте ПКЛ наблюдались эпизоды застывания разной длительности. Влияние введения D-серина этот параметр не обнаружено. Но, тем не менее, мы бы хотели отметить некоторое снижение латентного периода застывания у крыс ГК, получавших 100 мг/кг (p < 0.05) по сравнению с группой, получавшей 50 мг/кг, несмотря на то, что достоверного эффекта препарата посредством анализа Kruskal–Wallis ANOVA на этот признак не получено (H(2, n = 28) = = 4.4, p < 0.1).

Влияние D-серина на пространственное обучение в лабиринте Барнс

Для проверки влияния D-серина на пространственное обучение была использована доза 50 мг/кг в группе интактных животных. Для крыс Вистар было показано влияние дня обучения на ла-

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

| | Доза D-серина | | | Эффект дозы | |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------|--|--|
| Паттерны поведения Me [Q1–Q3] | 0 мг/кг (контроль) n = 8 | 50 мг/кг n = 10 | 100 мг/кг n = 10 | (Kruskal–Wallis ANOVA): H(2, n = 28) | |
| Время в центре, сек | 16.9 | 17.2 | 7.9 | 7.23 | |
| | [11.4–33.3] | [12.8–34.0] | [7.3–10.2] | (<i>p</i> < 0.03) | |
| Число заходов в открытые рукава | 2.5 | 2.0 | 1.0 * # | 8.0 | |
| | [1.0 - 3.0] | [2.0 - 2.0] | [0.0 - 1.0] | (p < 0.02) | |
| Число заходов в закрытые рукава | 4.0 | 2.5 | 2.0 * | 6.1 | |
| | [2.0 - 4.5] | [2.0 - 4.0] | [1.0 - 3.0] | (<i>p</i> < 0.05) | |
| Общее число заходов в рукава | 5.0 | 5.5 | 2.5 * # | 10.9 | |
| | [5.0 - 8.0] | [4.0-7.0] | [2.0 - 4.0] | (p < 0.004) | |

Таблица 2. Влияние D-серина на поведение в тесте ПКЛ крыс линии ГК

Примечание: * – $p \le 0.017$: 100 мг/кг D-серина vs. 0 мг/кг D-серина (контроль);

[#] – *p* < 0.017: 50 мг/кг D-серина vs. 100 мг/кг D-серина.

тентный период нахождения убежища (F(4.56) = 20.88, p < 0.001). Также для них было обнаружено взаимодействие факторов препарата и дня обучения: F (4.56) = 2.71, p < 0.04. На 2-й день обучения экспериментальные животные показали большее время до захода в убежище (p < 0.05), рис. 1. Для пройденной дистанции был показан эффект дня обучения (F (4.56) = 3.03, p < 0.03) с меньшим значением в 5-й день по сравнению с 1-м (p < 0.03). Для скорости перемещения крыс Вистар также был показан эффект дня обучения: F (4.56) = 14.16, p < 0.001, с увеличением ее к 5-му дню обучения.

При проверке навыка у крыс Вистар, получавших D-серин, были обнаружены меньшая пройденная дистанция (p < 0.05) и меньшее время до захода в целевую лунку (p < 0.05) по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует о более эффективном поиске убежища [31]. Скорость перемещения крыс Вистар в исследуемых группах не отличалась (рис. 2).

Для крыс линии ГК показано влияние дня обучения на латентный период нахождения убежища (F(4.76) = 15.02, *p* < 0.0001). Эффекта препарата, а также взаимодействия факторов дня обучения и введения препарата на время нахождения убежища не обнаружено. Для дистанции, пройденной до убежища, показаны эффекты дня обучения (F(4.76) = 9.60, p < 0.0001) и препарата (F(1,19) =9.08, p < 0.008), взаимодействие факторов не обнаружено. Животные, получавшие D-серин, прошли меньшую дистанцию (p < 0.008). Для скорости перемещения обнаружен только эффект дня обучения (F(4.76) = 11.42, *p* < 0.001) с возрастанием скорости в 5-й день по сравнению со скоростью в 1-й, 2-й, 3-й и 4-й дни (*p* < 0.001 для всех). При проверке навыка у крыс ГК было обнаружено, что животные, получавшие препарат, прошли меньшую дистанцию по сравнению с контрольными (p < 0.05),

латентный период нахождения убежища и скорость перемещения не отличались (рис. 3).

Таким образом, в лабиринте Барнс D-серин в дозе 50 мг/кг оказал прокогнитивный эффект на крыс Вистар и снизил двигательную активность у крыс ГК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В литературных источниках имеются данные об анксиолитических и прокогнитивных эффектах D-серина [14, 15, 33]. В отношении когнитивных способностей результаты, полученные нами на крысах линии Вистар, находятся в согласии с данными других исследователей. Так, у мышей было



Рис. 1. Время нахождения убежища в лабиринте Барнс крысами Вистар в процессе обучения. Обозначения: * - p < 0.05: 0 мг/кг D-серина (контрольная группа) vs. 50 мг/кг D-серина. Значения представлены как M ± SEM, n = 8.



Рис. 2. Длина пути и время нахождения убежища крысами Вистар при проверке навыка. Обозначения: * – *p* < 0.05: 0 мг/кг D-серина (контрольная группа) vs. 50 мг/кг D-серина. (а) Путь до убежища. (b) Латентный период нахождения убежища. Значения представлены как M ± SEM, *n* = 8.



Рис. 3. Длина пути и время нахождения убежища крысами ГК при проверке навыка. Обозначения: * - p < 0.05: 0 мг/кг D-серина (контрольная группа) vs. 50 мг/кг D-серина. Значения представлены как M ± SEM, n = 10-11.

показано улучшение показателей рабочей памяти и распознавания объектов, сопровождающееся увеличением уровня D-серина в гиппокампе, при введении 50 мк/кг препарата [33]. Введение крысам 100 мг/кг D-серина за 40 мин до тестирования оказывало прокогнитивный эффект при обучении в водном лабиринте Морриса [34]. У крыс ГК не обнаружено изменение времени нахождения убежища под влиянием препарата, но обнаружено снижение пройденного пути до убежища как в процессе обучения, так и при проверке навыка. С одной стороны, более короткий путь считается показателем лучшей обучаемости [26, 31], с другой стороны, это может отражать снижение двигательной активности под воздействием D-серина.

Для исследования тревожно-подобного поведения широко применяются тесты светло-темной камеры и приподнятого крестообразного лабиринта [29, 30]. В тесте СТК нам не удалость обнаружить анксиолитические эффекты использованных доз D-серина ни у одной из линий. Полученные в нашей работе результаты свидетельствуют об анксиолитическом эффекте D-серина для крыс Вистар в дозе 50 мг/кг в ПКЛ, тогда как введение 100 мг/кг D-серина такого действия не оказало. Для D-сери-

на описана зависимость эффекта и дозы в виде перевернутой U-образной кривой [35]. Например, при исследовании обучения в водном тесте Морриса было показано улучшение когнитивных функций только при использовании средней из использованных доз. В этой же работе показано, что большая доза D-серина не ведет большей к активации NMDA-рецепторов. Возможно, уменьшение ответа NMDA-рецепторов на более высокую дозу D-серина связано с интернализацией NMDA-рецепторов [36]. Для частичного агониста глицинового сайта связывания NMDA-рецепторов D-циклосерина, схожего по функциям с D-серином, также показаны U-образная зависимость эффекта и дозы [37]. С другой стороны, ранее исследователями было продемонстрировано снижение тревожно-подобного поведения при использовании больших доз (1000 м г/кг) D-серина в ПКЛ [32].

В отличие от крыс Вистар, введение D-серина крысам кататонической линии ГК в дозе 50 мг/кг не вызвало изменений в ПКЛ, а введение препарата в дозе 100 мг/кг вызвало снижение двигательной активности у крыс линии ГК в этом тесте. В литературных источниках приводятся данные об отсутствии эффекта препарата на локомоцию даже в больших дозах (1000 мг/кг) у крыс Спрейг-Доули [32], однако эксперимент был проведен не на интактных животных, а полвергавшихся операции. Существуют данные об анксиогенном эффекте Dсерина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта при введении в DPAG, дорсальную часть периакведуктального серого вещества [38]. Также интересно отметить, что для D-циклосерина на крысах Вистар показана зависимость эффектов препарата от базового уровня тревожности животных [39, 40]. Исследователями был обнаружен анксиогенный эффект D-циклосерина в тесте ПКЛ у высокотревожных животных, и сделано предположение о том, что сайт связывания глицина NR1субъединицы NMDA-рецепторов вовлечен в реализацию индивидуальных различий в уровне тревожности [40]. Ранее нами была показана предрасположенность к тревожно-подобному поведению у крыс линии ГК по сравнению с контрольными животными Вистар [22]. Возможно, обнаруженные генотипические различия по поведенческому ответу на D-серин могут быть связаны с тем же нейробиологическим субстратом, который обеспечивает различия в уровне тревожности у крыс Вистар и ΓK.

Таким образом, в данном исследовании обнаружены модифицирующие эффекты внутрибрюшинного введения малых доз D-серина на поведение крыс. Эти эффекты проявляются по-разному на фоне разных генотипов. Механизмы, отвечающие за обнаруженные изменения поведения, требуют дополнительного исследования. Полученные результаты убедительно свидетельствуют в пользу применения дифференциального подхода к использованию D-серина в качестве терапевтического средства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01631-А, бюджетным проектом № 0259-2021-0016 и выполнена с использованием оборудования ЦКП "Центр генетических ресурсов лабораторных животных" ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.И.П.), сбор данных (О.И.П., Т.А.А.), обработка данных (О.И.П.), написание и редактирование манускрипта (О.И.П., Т.А.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Kantrowitz J., Javitt D.C.* (2012) Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice. Curr Opin Psychiatry 25 (2): 96–102. https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835035b2
- Kawaura K., Koike H., Kinoshita H., Kambe H., Kaku A., Karasawa J., Chaki S., Hikichi H. (2015) Effects of a glycine transporter-1 inhibitor and D-serine on MK-801induced immobility in the forced swimming test in rats. Behav Brain Res 278: 186–192. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.046
- Stepnicki P., Kondej M., Kaczor A.A. (2018) Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. Molecules 23. 2087. https://doi.org/10.3390/molecules23082087
- 4. *Elvevag B., Goldberg T.E.* (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. Crit Rev Neurobiol 14: 1–21.
- Ross C.A., Margolis R.L., Reading S.A.J., Pletnikov M., Coyle J.T. (2006). Neurobiology of schizophrenia. Neuron 52: 139–153.
- Cho S.E., Na K.S., Cho S.J., Kang S.G. (2016) Low d-serine levels in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. Neurosci Lett 634: 42–51. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.006
- Coyle J., Balu T. (2018) The Role of Serine Racemase in the Pathophysiology of Brain Disorders. Adv Pharmacol 82: 35–56. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.10.002
- 8. *Labrie V., Wong A., Roder J.C.* (2012) Contributions of the D-serine pathway to schizophrenia. Neuropharma-

cology 62: 1484–1503. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.030

- Kantrowitz J., Malhotra A., Cornblatt B., Silipo G., Balla A., Suckow R., D'Souza C., Saksa J., Woods S., Javitt D. (2010) High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. Schizophr Res 121: 125–130. https://doi.org/10.1016/j.schres.2010.05.012
- Kantrowitz J.T., Epstein M.L., Lee M., Lehrfeld N., Nolan K.A., Shope C., Petkova E., Silipo G., Javitt D.C. (2018) Improvement in mismatch negativity generation during d-serine treatment in schizophrenia: Correlation with symptoms. Schizophr Res 191: m70–79. https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.02.027
- 11. Panizzutti R., Fisher M., Garrett C., Man W.H., Sena W., Madeira C., Vinogradov S. (2019) Association between increased serum D-serine and cognitive gains induced by intensive cognitive training in schizophrenia. Schizophr Res 207: 63–69.

https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.04.011

 Avellar M., Scoriels L., Madeira C., Vargas-Lopes C., Marques P., Dantas C., Manhães A., Leite H., Panizzutti R. (2016) The effect of D-serine administration on cognition and mood in older adults. Oncotarget 7 (11): 11881–11888.

https://doi.org/10.18632/oncotarget.7691

 Coyle J.T., Basu A., Benneyworth M., Balu D., Konopaske G. (2012) Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: Therapeutic implications. Handb Exp Pharmacol 213: 267–295. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25758-2 10

- 14. Otte D.M., Arellano de M.L.B., Bilkei-Gorzo A., Albayram O., Imbeault S., Jeung H., Alferink J., Zimmer A. (2013) Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. PLOS ONE 8 (6): e67131. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067131
- 15. Andersen J., Pouzet B. (2004) Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. Neuropsychopharmacology 29: 1080 - 1090.https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300394

16. Guercio G.D., Bevictori L., Vargas-Lopes C., Madeira C.,

- Oliveira A., Carvalho V.F., d'Avila JC, Panizzutti R (2014) D-serine prevents cognitive deficits induced by acute stress. Neuropharmacology 86: 1-8. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.021
- 17. Chen X.G., Wang Y.H., Wen C.C., Chen Y.H. (2014) Overdose of D-serine Induces Movement Disorder and Neuromuscular Changes of Zebrafish Larvae. J Toxicol Pathol 27: 19-24.

https://doi.org/10.1293/tox.2013-0032

- 18. Rais R., Thomas A.G., Wozniak K., Wu Y., Jaaro-Peled H., Sawa A., Strick C.A., Engle S.J., Brandon N.J., Rojas C., Slusher B.S., Tsukamoto T. (2012) Pharmacokinetics of oral D-serine in D-amino acid oxidase knockout mice. Drug Metab Dispos 40 (11): 2067-2073. https://doi.org/10.1124/dmd.112.046482
- 19. Ganote C.E., Peterson D.R., Carone F.A. (1974) The nature of D-serine-induced nephrotoxicity. Am J Pathol 77 (2): 269 - 282.
- 20. Krug A.W., Volker K., Dantzler W.H., Silbernagl S. (2007) Why is D-serine nephrotoxic and alpha-aminoisobutyric acid protective? Am. J. Physiol. Renal Physiol 293: 382-390.

https://doi.org/10.1152/ajprenal.00441.2006

- 21. Колпаков В.Г., Куликов А.В., Алехина Т.А., Чугуй В.Ф., Петренко О.И., Барыкина Н.Н. (2004) Кататония или депрессия? Линия крыс ГК – генетическая живот-ная модель психопатологии. Генетика 40 (6):1-7. [Kolpakov V.G., Kulikov A.V., Alekhina T.A., Chuguy V.F., Petrenko O.I., Barykina N.N. (2004) Catatonia or depression: The GC rat strain as an animal model of psychopathology. Genetics (Moscow) 40 (6): 827–834. (In Russ)] https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000033315.79449.d4
- 22. Kulikov A.V., Kolpakov V.G., Popova N.K. (2006) The genetic cataleptic (GK) rat strain as a model of depression disorders. In: Kalueff AV (ed) V. Animal models in biological psychiatry, 1st edn. Nova Science Pub Inc, New York 59-73.
- 23. Рязанова М.А., Прокудина О.И., Плеканчук В.С., Алехина Т.А. (2017) Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престимульного торможения у крыс с генетической кататонией. Вавиловский журнал генетики и селекции 21 (7): 798-803. [Ryazanova M.A., Prokudina O.I., Plekanchuk V.S., Alekhina T.A. (2017) Expression of catecholaminergic genes in the midbrain and prepulse inhibition in rats with a genetic catatonia. Vavilovskij žurnal genetiki i selekcii 21 (7): 798-803. (In Russ)].

https://doi.org/10.18699/VJ17.296

24. Барыкина Н.Н., Алехина Т.А., Чугуй В.Ф., Петренко О.И., Плюснина И.Ф., Колпаков В.Г. (2004) Биполярное проявление каталептического типа реагиро-

вания у крыс. Генетика 40 (3): 1-7. [Barykina N.N., Alekhina T.A., CHuguj V.F., Petrenko O.I., Plyusnina I.F., Kolpakov V.G. (2004) Bipolyarnoe proyavlenie katalepticheskogo tipa reagirovaniya u krys. Genetika 40 (3): 1– 7. (In Russ)].

- 25. Алехина Т.А., Прокудина О.И., Чугуй В.Ф., Шихевич С.Г., Барыкина Н.Н., Колпаков В.Г. (2005) Двойственное проявление кататонической реакции у крыс. Журн. высш. нерв. Деятельности 55 (4): 536-542. [Alekhina T.A., Prokudina O.I., CHuguj V.F., SHihevich S.G., Barykina N.N., Kolpakov V.G. (2005) Dvojstvennoe proyavlenie katatonicheskoj reakcii u krys. ZHurn. vyssh. nerv. Devatel'nosti 55 (4): 536-542. (In Russ)].
- 26. Barnes C.A. (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J Comp Physiol Psychol 93 (1): 74–104. https://doi.org/10.1037/h0077579
- 27. Stansley B.J., Yamamoto B.K. (2015) Behavioral impairments and serotonin reductions in rats after chronic Ldopa. Psychopharmacology (Berl) 232 (17): 3203-3213. https://doi.org/10.1007/s00213-015-3980-4
- 28. Hasegawa H., Masuda N., Natori H., Shinohara Y., Ichida K. (2019) Pharmacokinetics and toxicokinetics of D-serine in rats. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 162: 264-271. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.026
- 29. Walf A.A., Frye C.A. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc 2 (2): 322-328. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44
- 30. Rodgers R.J., Johnson N.J. (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 52:297-303. https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-m
- 31. Gawel K., Gibula E., Marszalek-Grabska М., Filarowska J., Kotlinska H.J. (2019) Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents - methodological consideration. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 392(1): 1-18. https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-v
- 32. Wang X.Q., Zhong X.L., Li Z.B., Wang H.T., Zhang J., Li F., Zhang J.Y., Dai R.P., Xin-Fu Z., Li C.Q., Li Z.Y., Bi F.F. (2015) Differential roles of hippocampal glutamatergic receptors in neuropathic anxiety-like behavior after partial sciatic nerve ligation in rats. BMC Neurosci 16: 14.

https://doi.org/10.1186/s12868-015-0150-x

- 33. Bado P., Madeira C., Vargas-Lopes C., Moulin T.C., Wasilewska-Sampaio A.P., Maretti L., de Oliveira R.V., Amaral O.B., Panizzutti R. (2011) Effects of low-dose D-serine on recognition and working memory in mice. Psychopharmacology (Berl) 218 (3): 461-470. https://doi.org/10.1007/s00213-011-2330-4
- 34. Stouffer E.M., Petri H.L., Devan B.D. (2004) Effect of dserine on a delayed match-to-place task for the water maze. Behav Brain Res 152: 447-452. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.008
- 35. Zhang Z., Gong N., Wang W., Xu L., Xu T.L. (2008) Bellshaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. Cereb Cortex 18

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ 2021 том 57 Nº 6

(10): 2391–2401. https://doi.org/10.1093/cercor/bhn008

36. Nong Y., Huang Y.O., Ju W., Kalia L.V., Ahmadian G., Wang Y.T., Salter M.W. (2003) Glycine binding primes NMDA receptor internalization. Nature 422 (6929): 302–307. https://doi.org/10.1038/nature01497

37. Rodgers R.J., Howard K., Stewart S., Waring P., Wright F.L.

(2010) Anxioselective profile of glycineB receptor partial agonist, D-cycloserine, in plus-maze-naïve but not plusmaze-experienced mice. Eur J Pharmacol 646 (1–3): 31–37.

https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.005

- Schmitt M.L., Coelho W., Lopes-de-Souza A.S., Guimarães F.S., Carobrez A.P. (1995) Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. Neurosci Lett 189: 93–96. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11459-a
- Wu S.L., Hsu L.S., Tu W.T., Wang W.F., Huang Y.T., Pawlak C.R., Ho Y.J. (2008) Effects of d-cycloserine on the behavior and ERK activity in the amygdala: Role of individual anxiety levels. Behav Brain Res 187: 246–253. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.09.013
- 40. Ho Y.J., Hsu L.S., Wang C.F., Hsu W.Y., Lai T.J., Hsu C.C., Tsai Y.F. (2005) Behavioral effects of d-cycloserine in rats: the role of anxiety level. Brain Res 1043: 179–185. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.02.057

Effect of D-serine on Anxiety-like Behavior and Spatial Learning Abilit y of GC Rats Selected for the Predisposition to Catatonic Reactions

O. I. Prokudina^{*a*, #} and T. A. Alekhina^{*a*}

^a Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia [#]e-mail: petrenko@bionet.nsc.ru

Evidence is accumulating for an important role of D-serine, a co-agonist of the NMDA receptor glycine site, in the pathogenesis of psychiatric disorders. According to various literature sources, D-serine may contribute to correcting cognitive impairments and negative symptoms in schizophrenia. Given the therapeutic potential of D-serine, it seems important to investigate its effect on experimental models of pathological behavior. This study was carried out on GC rats, proposed as a model of catatonic disorders, and Wistar rats, undisposed to catatonic reactions. In numerous studies, D-serine is used at fairly high doses, although it has been established that high doses of D-serine elicit adverse side effects. The goal of this work was to investigate the effect of low D-serine doses on the behavior of both GC rats and control Wistar rats in the light-dark box and elevated plus maze tests, as well as on their learning ability in the Barnes maze. It was found that intraperitoneal injection of 50 mg/kg reduced locomotor activity in the elevated plus maze test, while at 50 mg/kg, D-serine reduced locomotor activity in the latency to escape.

Keywords: catatonia, catalepsy, anxiety, learning, D-serine, GC rats

—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ ГИПОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ЭМБРИОГЕНЕЗА, НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЛУХОВОЙ КОРЫ В ПЕРВЫЙ МЕСЯЦ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ КРОЛИКОВ

© 2021 г. А. Г. Гусейнов

Институт физиологии им. А.И. Караева НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

e-mail: guseynov_alipanah@mail.ru Поступила в редакцию 22.11.2020 г. После доработки 16.04.2021 г. Принята к публикации 19.07.2021 г.

У 20- и 30-дневных крольчат, подвергнутых гипоксии в разные периоды внутриутробной жизни, исследован спектральный состав ЭКоГ слуховой коры. Недостаток кислорода в зародышевый (E1-8), предплодный (E8-18) и плодный периоды (E18-28) пренатального развития по-разному влияет на формирование спектра ЭКоГ слуховой коры крольчат. Эти различия в основном выражаются степенью увеличения количества медленных волн в электрической активности слуховой коры. Как у 20-, так и 30-дневных крольчат, подвергнутых гипоксии в зародышевый период эмбриогенеза, спектральные показатели ЭКоГ отклоняются от нормы незначительно, тогда как гипоксия на двух более поздних сроках эмбриогенеза приводила к более выраженным, но сходным изменениям спектральных показателей. Исходя из этих данных, можно предположить, что клетки, формирующие нервные структуры, генерирующие электрическую активность слуховой коры кролика, более чувствительны к недостатку кислорода в предплодный и плодный периоды эмбриогенеза, по сравнению с зародышевым периодом внутриующие.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, электрокортикограмма, зародышевый период, предплодный период, кролик

DOI: 10.31857/S0044452921060048

В литературе, на основании электрофизиологических исследований, считается, что на ранних этапах онтогенеза чем моложе организм, тем его нервная система более устойчива к кислородной недостаточности [1, 2]. Так, в срезах мозга 4-, 7- и 10-дневных и взрослых крыс постсинаптические потенциалы нейронов исчезают, соответственно, через 22, 9, 6 и 4 мин после начала аноксии [2]. Однако, имеются данные, которые не согласуются с этим общепринятым представлением. По мнению некоторых авторов, реакция нервной системы на кислородное голодание в пренатальном онтогенезе и период новорожденности исследовано недостаточно, и представление о высокой устойчивости развивающейся нервной системы к гипоксии основывается на исследованиях, проведенных, в основном, в более поздние периоды онтогенеза [3, 4]. Обнаружено, что несмотря на то, что электрическая активность развивающегося мозга, по сравнению со взрослым, меньше подавляется под воздействием гипоксии, незрелые нервные структуры, в частности, нейроны, больше подвержены гипоксическим повреждениям [4]. Также имеются электрофизиологические данные, указывающие на то, что в течение первого месяца жизни чувствительность нервной системы крольчат к кислородному голоданию повышается [3].

Реакция нервной системы на гипоксию изменяется также в течение эмбриогенеза. Известны данные о том, что у 25-дневных плодов кролика, по сравнению с 20-дневными, гипоксия, вызванная пережатием пуповины, вызывает более выраженные изменения в ЭЭГ [5].

Структурные изменения, как в развивающейся, так и зрелой нервной системе, могут проявляться сразу или отсроченно, через 1–3 сут, неделю или больше времени после воздействия гипоксии. Подобная закономерность обнаруживается во всех структурах нервной системы [6, 7]. Поэтому для определения устойчивости развивающейся нервной системы к недостатку кислорода значительный интерес представляют те электрофизиологические исследования, которые проведены не сразу после воздействия гипоксии, а в более поздние периоды онтогенеза. Так, было показано, что у 28-дневных плодов кролика, испытавших кислородное голодание в предплодный период внутриутробной жизни, в ЭКоГ сенсомоторной коры обнаруживаются очень сильные изменения, в то время как после гипоксии в плодный период в корковой активности изменения почти отсутствуют [8]. В спектре ЭЭГ лимбической и зрительной коры крольчат разного возраста после кислородного голодания в зародышевый, предплодный и плодный периоды внутриутробной жизни также обнаружены изменения разного характера [9, 10]. Однако из-за неоднозначности этих изменений не представляется возможным определение периода пренатальной жизни, когда нервная система проявляет наибольшую чувствительность к недостатку кислорода.

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе электрофизиологическими методами исследовано изменение восприимчивости нервной системы к гипоксии в разные периоды внутриутробной жизни. С этой целью проведен анализ ЭКоГ крольчат разного возраста после воздействия гипоксии в разные периоды пренатального развития. Объектом исследования выбрана слуховая кора, которая, по сравнению с другими сенсорными корковыми областями, отличается более поздним морфофункциональным развитием в онтогенезе [11].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на 20- и 30-дневных крольчатах породы Шиншилла. Все исследования проводили в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями биоэтического комитета организации ARRIVE [15].

В обеих возрастных группах электрофизиологические исследования проводились на 4 группах крольчат. Одна группа животных служила контролем. Крольчата первой экспериментальной группы подвергались воздействию гипоксии в течение всего зародышевого периода (с 1-го по 8-е сутки), второй – в течение предплодного периода (с 8-го по 18-е сутки), а третьей – в течение плодного периода (с 18-го по 28-е сутки) пренатальной жизни (классификация пренатального онтогенеза по Шмитду [12]). В контрольной и экспериментальных группах использовались 17, 14, 16 и 17 крольчат, соответственно, 20-дневного возраста, и 17, 14, 15 и 16 крольчат 30-дневного возраста. Для создания гипоксического состояния у плодов по методу Б.М. Хватовой ("Способы определения степени тяжести гипоксии". Авт. св. №. 2986388.1983) беременная крольчиха каждый день помещалась в прозрачную специально вентилируемую камеру объемом 0.12 м³, куда в течение 20 мин подавалась смесь газов – кислорода (5%) и азота (95%). В камере содержание диоксида углерода не превышало 0.1%. Перед родами беременные крольчихи пересаживались в клетку, приспособленную для ухода за потомством. До электрофизиологических исследований крольчата содержались вместе матерью.

Исследоване электрокортикограммы (ЭКоГ) слуховой коры проводилось в обоих полушариях. Координаты слуховой коры определяли по картам коры головного мозга кролика [13, 14]. Перед регистрацией электрической активности коры мозга животных наркотизировали внутривенным введением раствора этаминала-натрия в дозе 40 мг/кг веса животного. Для регистрации электрической активности обнажали участок слуховой коры мозга площадью 0.5 см². ЭКоГ регистрировали с поверхности слуховой коры посредством игольчатых электродов, референтный электрод фиксировали в носовой пазухе. ЭКоГ записывали на 8-канальном электроэнцефалографе "Медикор" (Венгрия) и на компьютере "Нейрон Спектр 2" (Россия). Фильтры усилителя электроэнцефалографа устанавливались в диапазоне 0.1-70 Гц. Регистрация с каждой области продолжалась в течение 20 мин. Животных по окончании опытов усыпляли раствором этаминала-натрия.

Спектральный анализ ЭКоГ проводился с помощью компьютера "Нейрон Спектр 2". Исследованы стандартные волны δ -, θ -, α -, β 1- и β 2-диапазонов. Эпохи анализа для каждого животного составляли 30 с.

Статистическую обработку полученных данных проводили на компьютере "Нейрон Спектр 2" с помощью пакета программ Excel. Статистическую достоверность различия средних значений спектральных показателей оценивали с помощью критерия Фишера (F-критерий). Данные считались достоверными при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенный анализ показывает, что в спектре ЭКоГ 20-дневных крольчат преобладают быстрые волны. Однако ЭКоГ отличается очень высоким содержанием медленной активности – 25.4%. В медленном спектре δ -активность, по сравнению с доминирующей θ -активностью, индекс которой равняется – 14.1 ± 1.3%, представлена несколько меньше – 11.3 ± 1.5%. Быстрые волны β 1- и β 2-диа-пазона имеют наибольшие индексы в спектре электрической активности – 19.5 ± 2.2% и 40.7 ± 4.2%. α -активность занимает 14.4 ± 1.7% спектра (рис. 1, 2).

После перенесенной гипоксии в зародышевый период эмбриогенеза в спектре усиливается выраженность медленной активности. Прирост в количестве δ - и θ -волн равен 21–23%. Вместе эти волны занимают 30.9% спектра, что на 21% больше, чем в норме. Удельный вес всех быстрых волн фоновой активности уменьшается.



Рис. 1. ЭКоГ слуховой коры 20-дневных крольчат: а – контроль, b – после гипоксии в зародышевый (*E*1–8), с – предплодный (*E*8–18) и d – плодный периоды эмбриогенеза (*E*18–28). Калибровка: 100 мкВ, 1 с.



Рис. 2. Спектральный состав ЭКоГ слуховой коры 20-дневных крольчат: а – контроль (n = 17), b – после гипоксии в зародышевый (E1-8, n = 14), с – предплодный (E8-18, n = 16) и d – плодный период эмбриогенеза (E18-28, n = 17). * – (p < 0.05), **– (p < 0.01).

Анализ ЭКоГ слуховой коры крольчат, испытавших дефицит кислорода в предплодный период эмбриогенеза, показывает, что в ее спектре резко возрастает доля медленных δ - и θ -волн и составляет 33.9% (p < 0.05). Этот показатель на 33% больше, чем в норме. При этом прирост медленных волн, в основном, связан с δ -активностью, которая становится доминирующей в медленном спектре (p < 0.01). Резко – в 1.5 раза – уменьшается количество волн α -диапазона (p < 0.05). Более умеренно ослабляется β -активность. Если индекс β 2-волн, по сравнению с контролем, меньше на 12%, то ослабление β 1-активности очень незначительное (рис. 1, 2).

После гипоксического воздействия в плодный период эмбриональной жизни электрическая активность слуховой коры также характеризируется сильно измененным спектром. Доля низкочастотных δ - и θ -волн в спектре резко — на треть — возрастает и достигает 33.6% (p < 0.05). Как и в предыдущей экспериментальной группе, δ -активность (p < 0.01) становится преобладающей в медленном спектре, а индекс θ -волн незначительно отличается от контроля. В той или иной степени ослабляется активность всех быстрых волн. Если количество колебаний α -диапазона уменьшается на 40% (p < 0.05), то изменение спектральных показателей β 1- и β 2-волн менее выражено (рис. 1, 2).

ГУСЕЙНОВ



Рис. 3. ЭКоГ слуховой коры 30-дневных крольчат: а – контроль, b – после гипоксии в зародышевый (*E*1–8), с – предплодный (*E*8–18) и d – плодный периоды эмбриогенеза (*E*18–28). Калибровка: 100 мкВ, 1 с.



Рис. 4. Спектральный состав ЭКоГ слуховой коры 30-дневных крольчат: а – контроль (n = 17), b – после гипоксии в зародышевый (E1-8, n = 14), с – предплодный (E8-18, n = 15) и d – плодный период эмбриогенеза (E18-28, n = 16). * – (p < 0.05), ** – (p < 0.01).

Обобщая эти данные, можно заключить, что у 20-дневных крольчат после гипоксии в последние периоды внутриутробной жизни, по сравнению с первым (зародышевым), в спектре ЭКоГ слуховой коры изменения выражены сильнее. Если в первой экспериментальной группе прирост медленных волн спектра равен 21%, то в следующих экспериментальных группах увеличивается ровно на треть.

У контрольных 30-дневных крольчат спектральный состав и общая картина ЭКоГ во многом напоминают таковую у предыдущего возраста. Анализ показывает, что в спектре ЭКоГ 30-дневных крольчат медленные волны занимают 26.9% спектра. В медленном спектре δ - и θ -волны представлены неравномерно, с некоторым преобладанием последних. Индекс δ - и θ -активности, соответственно, равен 12.2 \pm 1.8 и 14.7 \pm 1.5%. В быстром спектре меньше всех представлены волны α -диапазона – 15.1 \pm 1.7%. Спектральный индекс β 2-волн ровно в два раза превышает таковой β 1-волн, они, соответственно, занимают 38.4 \pm 4.1 и 19.6 \pm 2.1% спектра ЭКоГ (рис. 3, 4).

У крольчат этого возраста, перенесших кислородное голодание в зародышевый период эмбрио-
генеза, спектральный состав несколько отклоняется от нормы. Прежде всего происходит сдвиг в соотношении медленных и быстрых волн в спектре в сторону первых. Выраженность медленных волн на 15% больше, чем в контроле, и они занимают 31.1% спектра. Увеличение индекса медленных волн связано как с δ -, так и θ -активностью. Как и в норме, в спектре θ -активность представлена чуть больше, чем δ -активность. Незначительно изменяется индекс волн быстрого спектра, удельный вес волн α и β 2-диапазона меньше, а β 1-диапазона больше, чем в норме.

Анализ спектрального состава фоновой актив-30-дневных ности слуховой коры крольчат после перенесенного кислородного голодания в предплодный период внутриутробной жизни показал, что суммарное количество медленных δ- и θ-волн, по сравнению с контролем, увеличивается на 27% (*p* < 0.05) и равняется 34.2%. Увеличение активности медленных колебаний происходит за счет δ -волн (*p* < 0.01), а выраженность θ-волн почти не меняется. Тем самым δ-частота становится доминирующей в медленном спектре. На 50% ослабляется α -активность (p < 0.05), изменение показателей остальных быстрых волн менее заметное. Индекс активности β_1 – уменьшается, β_2 -волн – увеличивается (рис. 3, 4).

ЭКоГ 30-дневных крольчат после кислородного голодания в плодный период пренатальной жизни также отличается сильно измененными спектральными показателями. В спектре удельный вес медленных волн достоверно возрастает до 38.4% (p < 0.05) (повышение на 42.5% по сравнению с контролем). Усиление выраженности медленного спектра связано как с δ-, так и θ-волнами. При этом в медленном спектре преобладает δ-активность, прирост которой, по сравнению с θ-активностью, в два раза больше (p < 0.01). Одновременно в спектре уменьшается количество всех быстрых волн. Больше всех – примерно на 30% – изменяется количество волн α -диапазона (p << 0.05). Менее выражено ослабление β 1- и β 2-активности (рис 3, 4).

У 30-дневных крольчат спектральные показатели ЭКоГ слуховой коры после кислородного голодания в предплодный и плодный периоды пренатального развития, по сравнению с зародышевым периодом, больше отклоняются от нормы. Соответственно в трех экспериментальных группах медленные волны спектра увеличиваются на 15, 27 и 42.5%. В последних экспериментальных группах удельный вес медленного спектра ЭКоГ, соответственно, составляет 34.2 и 38.4%. Однако, различия между ними являются статистически не достоверными.

Обобщая вышеизложенные данные, можно заключить, что гипоксия в зародышевый, предплодный и плодный периоды пренатального развития по-разному влияет на формирование спектра ЭКоГ слуховой коры крольчат. Эти различия в основном выражаются степенью увеличения количества медленных волн в электрической активности.

В спектре ЭКоГ слуховой коры 20- и 30-дневных крольчат, имеющих почти идентичный состав, недостаток кислорода в зародышевый период пренатального развития приводит к минимальным изменениям, в то время как гипоксия на более поздних сроках эмбриогенеза приводит к более заметным и почти одинаковым изменениям спектральных показателей ЭКоГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для понимания влияния гипоксии на электрическую активность коры головного мозга в пренатальном онтогенезе необходимо рассмотреть основные этапы ее развития в течение данного периода. Нервная трубка у кролика формируется на 9-й день [16], а корковая пластина на 12-14-е дни или 16-й день внутриутробной жизни [17]. По всему неокортексу нейроны появляются с 15-го дня [18]. С 18-19-го дня начинается стратификация коры мозга. и на 20-й день на ней ясно выделяются 2 комплекса слоев – верхний более густонаселенный и нижний – бедный элементами [17, 20]. На 22-й день внутриутробной жизни в неокортексе формируется зачаток II-IV слоев [20], и появляются первые афференты [21]. С этого периода начинается интенсивная дифференцировка нейронов неокортекса [22]. На 24-25 день пренатальной жизни в неокортексе, в основном, заканчивается процесс нейрогенеза [19, 23]. Одновременно нижние корковые слои приобретают четкие границы [17, 23]. К концу пренатальной жизни большинство нейронов нижних слоев коры мозга дифференцируются [17, 24]. К моменту рождения неокортекс кролика характеризуется ясно различимыми слоями, с дифференцированными нейронами, развитым нейропилем, сформированными афферентными и эфферентными связями и представляет собой высокодифференцированную и дееспособную структуру [17, 24, 25].

В наших предыдущих работах подобные исследования проводились на 28-дневных плодах кролика и 10-дневных крольчатах [26]. На основании этих, а также представленных в настоящей статье данных можно определить возрастные особенности изменений ЭКоГ слуховой коры крольчат после гипоксии в разные периоды внутриутробной жизни. У 28-дневных плодов кролика и 10-дневных крольчат гипоксия в предплодный и плодный периоды эмбриогенеза приводит к более выраженным и почти одинаковым изменениям спектрального состава суммарной активности по сравнению с гипоксией в зародышевый период. Исходя из этих данных, можно предположить, что нервные структуры, генерирующие электрическую активность слуховой коры кролика в последние два периода внутриутробной жизни, проявляют более высокую чувствительность к недостатку кислорода.

Сравнительный анализ также показывает, что до 20-го дня постнатальной жизни во всех экспериментальных группах чем старше возраст животных, тем сильнее спектральные показатели ЭКоГ у гипоксических животных отличаются от контроля.

На основании исследований, проведенных на контрольных животных разного возраста, также можно установить закономерности формирования фоновой активности слуховой коры кролика в онтогенезе. Спектральные показатели слуховой коры формируются уже к 10-му дню постнатальной жизни, и по мере дальнейшего развития они почти не изменяются. У кролика подкорковые структуры в начале постнатального онтогенеза почти завершают свое развитие [17]. По мнению большинства авторов, к концу 1-го месяца жизни цитоархитектоническое развитие коры мозга кролика заканчивается [17, 27], плотность синапсов становится почти дефинитивной [28]. В коре мозга миелинизируется значительная часть нервных волокон [29]. На основании этих данных можно утверждать, что к этому периоду нервная система кролика в общих чертах формируется. Следовательно, спектр фоновой активности слуховой коры становится дефинитивным еще до завершения формирования нервной системы.

В последние годы обнаружено, что в течение эмбриогенеза чувствительность к гипоксии коры мозга, подкоркового белого и серого вещества мозга и ряда других структур нервной системы изменяется [6, 30, 31]. Учитывая роль подкоркового белого и серого вещества мозга в генезе ЭЭГ [32, 33], можно предположить, что кислородная недостаточность в разные периоды эмбриогенеза по-разному влияет на морфофункциональное состояние не только коры, но и подкорковых структур мозга, что выражается в различиях спектральных характеристик ЭКоГ, регистрируемых в разные периоды постнатального развития.

Гипоксия в относительно ранние периоды эмбриональной жизни приводит к существенным изменениям в коре мозга и подкорковом белом веществе в постнатальный период [6, 31]. Этот период для коры мозга является критическим, так как в это время закладываются ее базисные элементы [6]. Основной причиной высокой восприимчивости подкоркового белого вещества к гипоксии является появление предшественников олигодендроцитов [31, 34]. К концу эмбриональной жизни эти структуры приобретают относительную устойчивость к недостатку кислорода, а подкорковое серое вещество, наоборот, становится восприимчивым к ее действию [6, 30, 31]. У эмбриона человека этот период охватывает последний триместр беременности [30].

Увеличение чувствительности серого вещества, а точнее подкорковых ядер, к гипоксии к концу эмбриогенеза связывают с нехваткой энергии из-за усиления их активности [35]. Однако в исследованиях, проведенных на плодах овцы, обнаружено, что в позднем эмбриогенезе, по сравнению с его ранними периодами, с ослаблением способности к поддержанию кровяного давления и мембранных функций нейронов, подкорковые ядра становятся более восприимчивыми к гипоксии [36].

Известно, что в раннем эмбриогенезе выделяют два критических периода, когда развивающийся организм наиболее восприимчив к неблагоприятным воздействиям. Первый, предшествующий имплантации, и второй – формированию зачатков органов, когла неблагоприятные факторы могут способствовать возникновению различных пороков [37]. У кролика эти критические периоды почти соответствуют зародышевому периоду внутриутробной жизни [16]. Тем не менее в наших исследованиях в нервной системе крольчат наблюдаются менее выраженные изменения, вызванные кислородным голоданием в зародышевый период эмбриогенеза. Возможно, относительная устойчивость развивающейся нервной системы к дефициту кислорода в течение зародышевого периода пренатальной жизни связана с более низкими потребностями в кислороде делящихся клеток эмбриона в указанный период [38].

Предполагается, что гибель нейронов при кислородном голодании также опосредована их синаптической активностью. В исследованиях, проведенных в культуре гиппокампальных нейронов, аноксия, вызванная цианидом, не влияет на недифференцированные нейроны, а дифференцированные погибают [39]. Показано, что в коре мозга гибель ГАМК-ергических нейронов в свою очередь вызывает гибель нейронов, связанных с ними посредством синаптической передачи [40]. Следовательно, нельзя исключать, что в ранние периоды эмбриогенеза отсутствие синаптических связей у нейронов является одной из причин их относительной устойчивости к воздействию гипоксии.

У кролика предплодный период эмбриональной жизни характеризуется интенсивными процессами органогенеза [16]. Нарушение этих процессов под воздействием гипоксии, несомненно, отражается в структурах нервной системы. В указанный период кора мозга и подкорковое белое вещество проявляют высокую чувствительность к нехватке кислорода [30, 31]. Можно предположить, что эти структурные нарушения являются основными причинами сильного изменения ЭКоГ под влиянием гипоксии в течение предплодного периода внутриутробной жизни.

Несмотря на то что к концу эмбриональной жизни наблюдается снижение восприимчивости коры мозга и полкоркового белого вешества к недостатку кислорода [6, 30, 31], а также формируются защитные антигипоксические реакции головного мозга [41], в наших исследованиях электрическая активность слуховой коры резко реагирует на гипоксию в поздние периоды эмбриогенеза. Возможно, это связано с тем, что в начале плодного периода пренатальной жизни кролика этот участок коры мозга и подкорковое белое вещество все еще сохраняют высокую чувствительность к гипоксии [6, 30, 31]. Также в исследованиях, проведенных на кроликах, обнаружено, что с появлением новых предшественников олигодендроцитов подкорковое белое вещество мозга к концу эмбриональной жизни снова может приобретать восприимчивость к гипоксии [31]. Повреждение серого вещества подкорковых структур мозга при дефиците кислорода в плодный период пренатальной жизни также может играть существенную роль в изменении спектра ЭКоГ. Высокую чувствительность нервной системы к гипоксии в плодный период эмбриогенеза также можно объяснить усилением ее функциональной активности, что приводит к завышенным энергетическим затратам.

Поведенческие исследования также указывают на то, что кислородная недостаточность в конце внутриутробной жизни вызывает сильные функциональные нарушения в нервной системе. Показано, что у крыс воздействие гипоксии в период преимущественной генерации и миграции нейробластов (*E*14) является значимым как для физиологического развития и становления двигательного поведения животных, так и для реализации когнитивных функций мозга. В то время как к концу эмбриональной жизни период когда в мозге преобладают процессы созревания и дифференцировки (*E*18), является более важным для осуществления когнитивных функций. [42].

Как уже было упомянуто, до 20-го дня постнатальной жизни во всех экспериментальных группах, с возрастом изменения электрической активности слуховой коры крольчат становятся более выраженными. Несомненно, эти изменения отражают отсроченные морфофункциональные изменения в нервной системе как в коре мозга, так и в других структурах, играющих роль в генерации суммарной корковой активности.

Известно, что нервная система способна к восстановлению после гипоксических повреждений. Вreen и соавт. предполагают, что в пренатальном периоде эта способность выше, чем в зрелом мозге [43]. Чем раньше произведена гипоксия, или же чем старше возраст анализируемого животного, тем больше времени отведено для восстановления нервной системы. Однако с появлением отсроченных морфофункциональных изменений однозначно оценить роль восстановительных процессов в нервной системе в изменениях электрической активности коры мозга пока не представляется возможным.

Ввиду того, что в настоящее время о генезе волн спектра ЭЭГ известно недостаточно, выявление точных механизмов его изменения под воздействием гипоксии, в частности, усиление выраженности медленных волн, не представляется возможным.

По мнению Steriade, Amzica и соавт., как медленные, так и быстрые волны ЭЭГ генерируются единой таламокортикальной системой [44, 45]. Другие же считают, что только быстрые волны ЭЭГ отражают активацию коры мозга таламусом. Генез медленных δ- и θ-волн связывается с активацией коры мозга глубинными подкорковыми структурами и лимбической системой, соответственно [46, 47]. Предполагается также, что волны дельта-диапазона формируются благодаря синхронной активности коры мозга и подкорковых структур [48]. Следовательно, увеличение медленных волн в спектре под влиянием гипоксии, соответственно, можно объяснить изменениями в таламокортикальной системе, или подкорковых структурах и лимбической системе, или же одновременно в высших и подкорковых структурах мозга.

Для понимания механизмов влияния гипоксии на ЭЭГ прежде всего необходимо выяснение ее нейрональных механизмов. В настоящее время об этих механизмах известно очень мало и не во всех случаях можно обнаружить корреляцию между импульсной активностью корковых нейронов и характером ЭЭГ.

Существует мнение, что при ослаблении импульсной активности корковых нейронов усиливается выраженность медленных волн в ЭЭГ [49, 50]. Результаты многих исследований подтверждают это предположение. У крыс при гипоксии начальная активация ЭЭГ по времени совпадает с усилением фоновой импульсации корковых нейронов, и по мере ее подавления увеличивается выраженность медленных волн [51]. При постсинаптической депрессии импульсной активности корковых нейронов редуцируются высокие частоты спектра ЭЭГ [52]. Обнаружено, что при активации таламокортикальных нейронов в результате деполяризации их мембраны в ЭЭГ генерируются более высокие частоты [53]. На основании этих данных можно предположить, что увеличение количества медленных волн в ЭЭГ при гипоксии связано с

ослаблением импульсной активности корковых нейронов, и наоборот [54].

Возможно, в условиях кислородной недостаточности ослабление разрядной активности корковых нейронов в результате их истощения или повреждения является одной из основных причин усиления выраженности медленных волн в спектре ЭЭГ. У плодов овцы исчезновение высокочастотных волн в ЭЭГ при асфиксии ассоциируется с острым повреждением корковых нейронов [55].

Под влиянием гипоксии мембрана у большинства нейронов деполяризируется [56–58], у других, в том числе и центральных – гиперполяризируется [50, 56, 57]. Эти изменения, соответственно, приводят к усилению [56–58] или ослаблению вплоть до полного исчезновения импульсной активности нейронов [50, 56, 57]. При этом надо учитывать, что эти исследования, в основном, проведены *in vitro*.

Существует мнение, что обменные процессы в нейронах играют значительную роль в генезе суммарной активности коры мозга или вовсе определяют ее характер [59–61]. Обнаружено, что ослабление обмена веществ в коре мозга приводит к появлению в ЭЭГ медленных ритмов [60]. Несмотря на то что роль биохимических процессов в происхождении ЭЭГ окончательно не выяснена, нельзя исключить их влияние на электрическую активность коры мозга при нехватке кислорода.

При гипоксии обычно работа сердца независимо от возраста ослабляется и при этом церебральное кровообращение усиливается. Однако это не компенсирует недостаток кислорода [62, 63]. В результате отмечается нарушение обмена веществ в нервной системе. Существует точка зрения, что ослабление работы сердца приводит к увеличению выраженности низкокочастотных волн ЭЭГ, и наоборот [64, 65]. Однако подобную связь не обнаруживают [66, 67]. По мнению Hellström-Westas и Rosén, изменения в сердечно-сосудистой системе при гипоксии отражаются на показателях ЭЭГ только у взрослых [64].

Предположительно спектральные изменения в ЭЭГ под воздействием гипоксии могут быть связаны с ее повреждающим и неповреждающим действием на нервную систему. У новорожденных детей, перенесших нехватку кислорода, структурные изменения в нервной системе обнаруживаются и в том случае, когда ЭЭГ остается нормальной [68]. На основании этих данных нельзя исключить роль гипоксического повреждения нервных структур в каких-либо заметных изменениях суммарной электрической активности коры мозга. Вполне возможно, что в спектральных показателях ЭЭГ отражаются не только морфофункциональные изменения в коре мозга и других структурах нервной системы, но и в уровне обмена веществ которой в значительной мере связана с работой сердечно-сосудистой системы. Можно предположить, что если эти изменения в ЭЭГ при регистрации непосредственно после воздействия гипоксии обратимы, то при отсроченной регистрации – необратимы.

При кислородном голодании, как обычно, в ЭЭГ усиливается выраженность медленных волн, что предположительно связано с подавлением разрядной деятельности корковых нейронов. В результате проведенного анализа предполагается, что эти изменения носят не случайный, а целенаправленный характер. В условиях гипоксии генерация ЭЭГ регулируется модулирующими и пейсмекерными нейронами, а также активацией эндогенных механизмов самих корковых нейронов. Модулирующие и пейсмекерные нейроны, в основном управляемые внутриклеточными механизмами, формируют систему, способную воздействовать на активность нейронов коры и других структур мозга при гипоксии. Нейроны, как возбуждающие, так и тормозные, формирующие систему, расположены во всех отделах нервной системы. но в основном сосредоточены в ее центре – в филогенетически древних подкорковых структурах. Восходящими и нисходящими прямыми или опосредованными путями они имеют связи со всеми структурами нервной системы, начиная от центра до периферии [54].

Это предположение основывается на следующих данных. Известно, что внутриклеточные механизмы способны существенно влиять или же контролировать генерацию нейронами нервного импульса [69, 70] и их ритмическую активность [69, 71, 72]. Тем самым они могут играть значительную роль в генерации разных волн и ритмов ЭЭГ [69, 70].

Внутриклеточные механизмы электрическую активность нейронов регулируют также при нехватке кислорода [50, 73, 74]. Обнаружено, что изменение проводимости мембранных каналов нейронов может наступать сразу же после воздействия гипоксии, когда еще не нарушено их энергетическое обеспечение [73, 74]. При аноксии у нейронов блуждающего нерва активация K⁺-каналов мембраны не зависит от уровня АТФ [50]. На основании этих данных можно предположить, что сдвиг в мембранном потенциале нейрона, в частности, ее гиперполяризация при кислородном голодании также может наступать под влиянием внутриклеточных механизмов.

Известно, что некоторые корковые нейроны, по сравнению с другими, играют более значительную роль в генезе ЭЭГ [75, 76]. В коре мозга крысы небольшое количество нейронов обеспечивает появление θ-ритма, веретен и волн arousal и сильно влияет на остроту ЭЭГ [75]. Благодаря активности принципиальных нейронов коры мозга, объединенных посредством аксональных щелевых контактов, генерируются очень быстрые осцилляции ЭЭГ [76].

Предполагается, что гипотетические пейсмекерные нейроны подкорковых структур способны воздействовать на активность корковых нейронов [45, 48, 77]. Ослабление этих влияний на нейроны коры мозга при гипоксии является одной из причин дезорганизации стандартного медленного комплекса ЭЭГ [48]. Пейсмекерные нейроны также формируют нисходящие пути, которые модулируют активность сенсорных путей и рецепторов [78].

В условиях гипоксии система модулирующих и пейсмекерных нейронов регулирует активность корковых нейронов посредством синаптических контактов и несинаптических сигналов, а также активацией эндогенных механизмов нейронов. По мере развития гипоксии, благодаря воздействию этих нейронов и эндогенных механизмов, разрядная деятельность нейронов угнетается, тем самым предотвращается их повреждение или гибель. Этот процесс отражается на ЭЭГ усилением выраженности медленных волн и генерацией медленных ритмов.

Ослабление активности модулирующих и пейсмекерных нейронов подкорковых структур в результате морфофункциональных нарушений приводит к усилению возбудимости центральных нейронов, и возможно, является одним из механизмов развития патологической активности в ЭЭГ. На это указывают данные о том, что у новорожденных острота ЭЭГ ассоциируется с повреждением базальных ганглиев, таламуса, подкоркового белого вещества, *internal capsule*, но только не с корой мозга [79].

Предположительно регуляция генерации ЭЭГ модулирующими и пейсмекерными нейронами осуществляется как при патологических, так и нормальных условиях. Следовательно, генерация ЭЭГ не является случайным процессом, а частично или полностью контролируется самим мозгом [54].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Bickler P., Hansen B. (1998) Hypoxia-tolerant neonatal CA1 neurons: relationship of survival to evoked glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices. Brain Res Dev Brain Res 106 (1-2): 57-69.

https://doi.org/10.1016/s0165-3806(97)00189-2

- 2. *Kawai S., Yonetani M., Nakamura H., Orada Y.* (1989) Effects of deprivation of oxygen and glucose on the neural activity and the level of high energy phosphates in the hippocampal slices of immature and adult rat. Dev Brain res 48 (1): 11–18.
- Мехтиев А.А., Ибрагимли И.Г., Гусейнов А.Г. (2015) Влияние гипоксии, проведенное в разные периоды онтогенеза на биоэлектрическую активность мозга крольчат. Известия Национальной Академии Наук Азербайджана 70: 98–103. [Mekhtiev A.A., Ibragimli I.G., Guseynov A.G. (2015) Vliyanie gipoksii provedennoe v raznye periody ontogeneza na bioelektricheskuyu aktivnost mozga krolchat. Izvestiya Natsionalnoy Akademii Nauk Azerbaydzhana 70: 98–103. (In Russ.)].
- Lafemina M., Sheldon R., Ferriero D. (2006) Acute hypoxia--ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. Pediatr Res 59: 680–683. https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000214891.35363.6a
- Тагиев Ш.К., Джангиров П.Л., Мамедов Х.Б. (1982) Фоновая биоэлектрическая активность мозга кроликов разных возрастных сроков. Журн высш нерв деят 32(3): 560–562. [*Tagiev Sh.K., Dzhangirov P.L., Mamedov Kh.B.* (1982) Fonovaya bioelektricheskaya artivnost mozga krolikov raznykh vozrastnykh srokov. Zhurn vyssh nerv. deiat 32 (3): 560–562. (In Russ.)].
- Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А. (2008) Структурные изменения в нервной ткани новой коры в онтогенезе крыс после гипоксии на разных сроках эмбриогенеза. Журн эвол биохим и физиол 44 (3): 258–267. [Vasilev D.S., Tumanova N.L., Zhuravin I.A. (2008) Strukturnye izmeneniya v nervnoy tkani novoi kory v ontogeneze krys posle gipoksii na raznykh srokakh embriogeneza. J evol biochem physiol 44 (3): 258–267. [In Russ.)].
- Tanaka H., Amamiya S., Takahashi S., Suzuki N., Araki A., Ohinata J., Fujieda K. (2010) Effect of neonatal hypoxia on the development of intraspinal serotonergic fibers in relation to spinal motoneurons Brain Dev 32: 268–274.
- Гусейнов А.Г., Мамедов Х.Б. (2012) Влияние гипоксии в разные периоды пренатального онтогенеза на электрокортикограмму плодов кролика. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 98 (10): 1250–1257. [Guseynov A.G., Mamedov Kh.B. (2012) Vliyanie gipoksii v raznye periody prenatalnogo ontogeneza na elektrokortikogrammu plodov krolika. Russ J Physiol 98 (10): 1250–1257. (In Russ.)].
- Абдулкеримова С.Л., Мамедов Х.Б., Гусейнов А.Г. (2008) Влияние пренатальной гипоксии на функциональное развитие зрительной коры крольчат. Проблемы физиологии и биохимии 26: 1–10. [Abdulkerimova S.L., Mamedov Kh.B., Guseynov A.G. (2008) Vliyaniye prenatalnoy gipoksii na funktsionalnoe razvitiye zritelnoy kory krolchat. Problemy fiziologii i biokhimii 26: 1–10. (In Russ.)].

527

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

- Газиев А.Г., Рагимли В.М., Мамедов Х.Б., Абдулкеримова С.Л. (2007). Послойный анализ биоэлектрической активности зрительной коры мозга 30-ти дневных крольчат. Проблемы физиологии и биохимии 25: 145–153. [Gaziyev A.G., Ragimli V.M., Mamedov Kh.B., Abdulkerimova S.L. (2007) Posloynyi analiz bioelektricheskoi aktivnosti zritelnoi kory mozga 30-ti dnevnykh krolchat. Problemy fiziologii i biokhimii 25: 145–153. (In Russ.)].
- Клявина М.П., Малышева В.В. (1979) Реакции нейронов слуховой коры в онтогенезе у кролика. Нейрональные механизмы развивающегося мозга. М. Наука. 159–171. [*Klyavina M.P., Malysheva V.V.* (1979) Reaktsii neyronov slukhovoi kory v ontogeneze u krolika. Neyronalnye mekhanizmy razvivayushchegosya mozga. M. Nauka 159–171. (In Russ.)].
- Шмитд Г.А. (1951) Эмбриология животных. Общая эмбриология. ч 1. М. Советская наука. [Shmitd G.A. (1951) Embriologiya zhivotnykh. Obshchaya embriologiya (Embryology of animals. General embryology). ch. 1 M. Sovetskaya nauka. (In Russ.)].
- Блинков С.М., Бразовская Ф.А., Пуцилло М.В. (1973) Атлас мозга кролика. М. Медицина. [Blinkov S.M., Brazovskaya F.A., Putsillo M.B. (1973) Atlas mozga krolika. M. Meditsina. (In Russ.)].
- Робинер И.С. (1959) О локализации кожного анализатора в коре и зрительном бугре кролика и кошки. Развитие центральной нервной системы. М. Наука. 1959. 205–225. [Robiner I.S. (1959) O lokalizatsii kozhnogo analizatora v kore i zritelnom bugre krolika i koshki. Razvitie tsentralnoi nervnoi sistemy. M. Nauka. 205–225. (In Russ.)].
- 15. Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G. (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol 8: e1000412.
- Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С. (1975) Лабораторные млекопитающие: мышь, крыса, кролик, хомячок. Проблемы биологии развития. Объекты биологии развития. М Наука 505–566. [Dyban A.P., Puchkov V.F., Baranov V.S. (1975) Laboratornye mlekopitayushchie: mysh, krysa, khomyachok. Problemy biologii razvitiya. Obekty biologii razvitiya. (Laboratory mammals: mouse, rat, rabbit, hamster. Problems of developmental biology. Moscow. Nauka. 505–566. (In Russ.)].
- Троицкая С.А. (1953) Пренатальный онтогенез коркового конца двигательного анализатора у кролика. Архив анат гистол и эмбриол 30 (1): 21–31. [*Troitskaya S.A.* (1953) Prenatalnyi ontogenez korkovogo kontsa dvigatelnogo analizatora u krolika. Arkhiv anat gistol i embroil 30 (1): 21–31 (In Russ.)].
- Stensaas L.J. (1967) The bevelopment of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits: II. Twenty millimeter stage, neuroblast morphology. J Com Neurol 129: 71–81. https://doi.org/10.1002/cne.901290106

- 19. *Fernandez V., Bravo H.* (1974) Autoradiographic study of development of the cerebral cortex in the rabbit. Brain Behav a evol 9 (5): 317–333.
- Пенцик А.С. (1940) Онтогенетическое развитие биоэлектрической деятельности и клеточного строения мозговой коры. Тр инст мозга М. 5: 273–293. [Pentsik A.S. (1940) Ontogeneticheskoe razvitie bioelektricheskoi deyatelnosti i kletochnogo stroeniya mozgovoi kory. Tr inst mozga M. 5: 273–293. (In Russ.)].
- Белова Т.И. (1971) О закономерностях онтогенетического созревания нервной системы млекопитающих. Успехи физиол. наук 2 (2): 68–104. [Belova T.I. (1971) О zakonomernostyakh ontogeneticheskogo sozrevaniya nervnoi sistemy. Uspekhi fiziol nauk 2 (2): 68– 104 (In Russ.)].
- 22. *Stensaas L.J.* (1967) The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. III. Twenty–nine millimeter stage, marginal lamina. J Comp Neurol 130: 149–162.
- Максимова Е.В. (1990) Онтогенез коры больших полушарий. М. Наука. [Maksimova E.V. (1990) Ontogenez kory bolshikh polusharii. M. Nauka. (In Russ.)].
- 24. *Stensaas L.J.* (1968) The development of hippocampal and dorsolateral pallial regions of the cerebral hemisphere in fetal rabbits. VI. Ninety millimeter stage, cortical differentiation. J Comp Neurol 132: 93–108. https://doi.org/10.1002/cne.901320105
- Гусейнов А.Г. (2003) Структурная организация неокортекса кролика в пренатальном онтогенезе. Успехи физиол наук 34 (3): 64–75. [Guseynov A.G. (2003) Strukturnaya organizatsiya neokorteksa krolika v prenatalnom ontogeneze. Uspekhi fiziol nauk 34 (3): 64–75. (In Russ.)].
- Гусейнов А.Г. (2018) Влияние гипоксии на электрическую активность мозга крольчат разного возраста. Труды института зоологии 36 (1): 143–152. [Guseynov A.G. (2018) Vliyanie gipoksii na elektricheskuyu aktivnost mozga krolchat raznogo vozrasta. Trudy instituta zoologii 36 (1): 143–152. (In Russ.)].
- 27. *Окс С.* (1969) Основы нейрофизиологии. М. Мир. 1969. [*Ochs S.* (1965) Elements of neurophysiology. Sidney Hardcover].
- 28. Vrensen G., De Groot D. (1978) Neuronal and synaptic development in the cerebral cortex of the rabbits. Biological aspects of learning, memory formation and ontogeny of the CNS 1 (5): 383–391.
- Дмитриева Н.И. (1965) Миелинизация центрального слухового пути в постнатальном онтогенезе у кролика. Журн эвол биох и физиол 1 (5): 159–165. [Dmitrieva N.I. (1965) Mielinizatsiya tsentralnogo slukhovogo puti v postnatalnom ontogeneze u krolika. Zh Evol Biokhim Fiziol.1 (5): 159–165. (In Russ.)].
- Johnston M. (2001) Excitotoxicity in neonatal hypoxia. Mental retardation and developmental disabilities research reviews 7: 229–234. https://doi.org/10.1002/mrdd.1032

528

- Buser J., Segovia K., Dean J., Nelson K., Beardsley D., Xi Gong, Ning Ling Luo, Ren J., Ying Wan, Riddle A., McClure M.M. (2010) Timing of appearance of late oligodendrocyte progenitors coincides with enhanced susceptibility of preterm rabbit cerebral white matter to hypoxia–ischemia J Cereb Blood Flow Metab 30: 1053–1065. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.286
- 32. Babiloni C., Frisoni G., Steriade M., Bresciani L., Binetti G., Del Percio C., Geroldi C., Miniussi C., Nobili F., Rodriguez G., Zappasodi F., Carfagna T., Rossini P. (2006) Frontal white matter volume and delta EEG sources negatively correlate in awake subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Clin Neurophysiol 117: 1113–1129.

https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.01.020

- Hellstróm-Westas L., Rosen I. (2005) Electroencephalography and brain damage in preterm infants. Early Human Dev 81: 255–261. https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2005.01.006
- 34. Riddle A., Luo N., Manese M., Beardsley D., Green L., Rorvik D., Kelly K., Barlow C., Kelly J., Hohimer A., Back S. (2006) Spatial heterogeneity in oligodendrocyte lineage maturation and not cerebral blood flow predicts fetal ovine periventricular white matter injury. J. Neurosci Neuroscience 26: 3045–3055. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5200–05.2006
- Billiards S., Pierson C., Haynes R., Folkerth D., Kinney C. (2006) Is the late preterm infant more vulnerable to gray matter injury than the term infant? Clin Perinatol 33: 915–933.

https://doi.org/10.1016/j.clp.2006.10.003

- 36. Mallard E., Williams C., Johnston B., Gluckman P. (1994) Increased vulnerability to neuronal damage after umbilical cord occlusion in fetal sheep with advancing gestation. Am J Obstet Gynecol 170: 206–214. https://doi.org/10.1016/s0002–9378(94)70409–0
- 37. Светлов П.Г. (1978) Физиология (механика) развития. т. 1. Процессы морфогенеза на клеточном и организменном уровне. Л. Наука. [Svetlov P.G. (1978) Fiziologiya (mekhanika) razvitiya t. 1. Protsessy morfogeneza na kletochnom i organizmennom urovne. (Physiology (mechanics) of development. vol. 1. The processes of morphogenesis at the cellular and organismal level). L. Nauka. (In Russ.)].
- Webster W., Abela D. (2007) The effect of hypoxia in development. Birth Defects Res. C Embryo Today 81: 215–228. https://doi.org/10.1002/bdrc.20102
- Rothman S. (1983) Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. Science 220:536–537. https://doi.org/10.1126/science.6836300
- Gerstein M., Huleihel M., Mane R., Stilman M., Kashtuzk I., Hallak M., Golan H. (2005) Remodeling of hippocampal GABAergic system in adult offspring after maternal hypoxia and magnesium sulfate load: Immunohistochemical study. Exp Neurol 196(1):18–29.

- Отеллин В.А., Коржевский Д.Э., Неокесарийский А.А., Григорьев И.П., Гилерович Е.Г., Косткин В.Б., Хожай Л.К. (2004) Последствия пренатального воздействия гипоксии на развивающийся мозг. Медицинский академический журнал 4: 38–45. [OItellin V.A., Korzhevskii D.E., Neokesariiskii А.А., Grigoryev I.P., Gilerovich E.G., Kostkin V.B., Khozhai L.K. (2004) Posledstviya prenatalnogo vozdeystviya gipoksii na razvivayushchiisya mozg. Meditsinskii akademicheskii zhurnal 4: 38–45. (In Russ.)].
- Дубровская Н.М., Журавин И.А. (2008) Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза. Журн высш нервн деят 58 (6): 718–727. 2008. [Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. (2008) Ontogeneticheskie osobennosti krys, perenesshikh gipoksiyu na 14-е ili 18-е sutki embriogeneza. Zh. Vyssh. Nervn. Deyat 58 (6): 718–727. (In Russ.)]. https://doi.org/10.1111/j.1467–7687.2006.00498.x.
- 43. Breen S, Rees S, Walker D (1997) Identification of brain-
- stem neurons responding to hypoxia in fetal and newborn sheep. Brain Res 748:107–121. https://doi.org/10.1016/s0006–8993(96)01273–5
- 44. Amzica F., Steriade M. (2000) Integration of low-frequency sleep oscillations in corticothalamic networks. Acta Neurobiol. Exp 60: 229–245. https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.007
- Steriade M. (2005) Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. Trends Neurosci 28:317–324. https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.007
- 46. Robinson D. (1999) The technical, neurological and psychological significance of 'alpha', 'delta' and 'theta' waves confounded in EEG evoked potentials: a study of peak latencies. Clin Neurophysiol 110: 1427–1434. https://doi.org/10.1016/s1388–2457(99)00078–4
- 47. *Vinogradova O*. (1995) Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. Prog Neurobiol 45: 523–583. https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00051-i
- 48. *Ginsburg D., Pasternak E., Gurvitch A.* (1977) Correlation analysis of delta activity generated in cerebral hypoxia. Clin Neurophysiol 42: 445–455.
- Cobb S., Buhl E., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P. (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABA–ergic interneurons. Nature 378: 75–78. https://doi.org/10.1038/378075a0
- Müller M., Brockhaus J., Ballanyi K. (2002) ATP-independent anoxic activation of ATP-sensitive K⁺ channels in dorsal vagal neurons of juvenile mice in situ. Neurosci 109: 313–328. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00498-5
- 51. Akopyan N., Baklavadzhyan O., Karapetyan M. (1984) Effects of acute hypoxia on the EEG and impulse activity of the neurons of various brain structures in rats. Neurosci Behav Physiol 5: 405–411. https://doi.org/10.1007/BF01184611

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

- Urrestarazu E., Jirsch J., LeVan P., Hall J., Avoli M., Dubeau F., Gotman J. (2006) High–frequency intracerebral EEG activity (100–500 Hz) following interictal spikes. Epilepsia 47: 1465–1476. https://doi.org/10.1111/j.1528–1167.2006.00618.x
- 53. *Hughes S., Crunelli V.* (2007) Just a phase they're going through: The complex interaction of intrinsic high—threshold bursting and gap junctions in the generation of thalamic α and θ —rhythms. Inter. J Psychophysiol 64: 3–17.

https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2006.08.004

- 54. Гусейнов А.Г. (2017) Механизмы влияния гипоксии на суммарную активность коры головного мозга. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 103 (11):1209– 1224. [Guseynov A.G. (2017) Mekhanizmy vliyaniya gipoksii na summarnuyu aktivnost kory golovnogo mozga. Russ J Physiol 103 (11):1209–1224. (In Russ.)].
- 55. Keogh M., Drury P., Bennet L., Davidson J., Mathai S., Gunn E., Booth L., Gunn A. (2012) Limited predictive value of early changes in EEG spectral power for neural injury after asphysia in preterm fetal sheep. Pediatric Res 71: 345–353.

https://doi.org/10.1038/pr.2011.80

- 56. *Ballanyi K*. (2004) Protective role of neuronal KATP channels in brain hypoxia. J Exp Biol 207: 3201–3212. https://doi.org/10.1242/jeb.01106
- 57. *Krnjevic K.* (1999) Early effects of hypoxia on brain cell function. Croat Med J 40:375–380.
- Nolan P., Waldrop T. (1996) Ventrolateral medullary neurons show age-dependent depolarizations to hypoxia in vitro. Dev Brain Res 91: 111–120. https://doi.org/10.1016/0165–3806(95)00166–2
- 59. *Majkova T., Lukashev S., Piradov M., Danilova M.* (2006) Central synaptic neurotransmission: universal self–regulation theory. Lik Sprava (1–2): 12–18.
- Moosmann M., Ritter P., Krastel I., Thees S., Blankenburg F., Taskin B., Obrig H., Villringer A. (2003) Correlates of alpha rhythm in function magnetic resonance imaging and near infrared spectroscopy. Neuroimage 20: 45–158. https://doi.org/10.1016/s1053–8119(03)00344–6
- Xiong Z., Saggau P., Stringer J. (2000) Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. Neurosci 20: 1290–1296. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-04-01290.2000
- 62. Bishai J., Blood A., Hunter C., Longo L., Power G. (2003) Fetal lamb cerebral blood flow (CBF) and oxygen tensions during hypoxia: a comparison of laser Doppler and microsphere measurements of CBF. J Physiol 546: 869– 878.

https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.025270

 Blood A., Hunter C., Power G. (2003) Adenosine mediates decreased cerebral metabolic rate and increased cerebral blood flow during acute moderate hypoxia in the near– term fetal sheep. J Physiol 553: 935–945. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047928 64. *Hellström-Westas L., Rosén I.* (2005) Electroencephalography and brain damage in preterm infants. Early Human Dev 81: 255–261.

https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2005.01.006

65. *Kilner J., Mattout J., Henson R., Friston K.* (2005) Hemodynamic correlates of EEG: A heuristic. Neuroimage 28: 280–286.

https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.06.008

 Lindauer U., Gethmann J., Kühla M., Kohl-Bareis M., Dirnag U. (2003) Neuronal activity—induced changes of local cerebral microvascular blood oxygenation in the rat: effect of systemic hyperoxia or hypoxia. Brain Res 975: 135–140.

https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02602-7

- 67. *van de Bor M., Meinesz J., Benders M., Steendijk P., Cardozo R., van Bel F.* (1999) Electrocortical brain activity during hypoxia and hypotension in anesthetized newborn lambs. Early Human Dev 55: 237–245.
- Foran A., Cinnante C., Groves A., Azzopardi D., Rutherford M., Cowan F. (2009) Patterns of brain injury and outcome in term neonates presenting with postnatal collapse. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 94 (3): 168–77. https://doi.org/10.1136/adc.2008.140301
- 69. Jun Lian, Jianwei Shuai, Durand D (2004) Control of phase synchronization of neuronal activity in the rat hippocampus. J Neural Eng 1: 46–54. https://doi.org/10.1088/1741–2560/1/1/007
- Lytton W., Destexhe A., Sejnowski T. (1996) Control of slow oscillations in the thalamocortical neuron: a computer model. Neurosci 70: 673–684. https://doi.org/10.1016/S0306–4522(96)83006–5
- Karameh F., Dahleh M., Brown E., Massaquoi S. (2006) Modeling the contribution of lamina 5 neuronal and network dynamics to low frequency EEG phenomena. Biol Cybern 95: 289–310. https://doi.org/10.1007/s00422–006-0090–8
- Ros T., Munneke M., Ruge D., Gruzelier J., Rothwell J. (2010) Endogenous control of waking brain rhythms induces neuroplasticity in humans. Eur J Neurosci 31: 770–778.

https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07100.x

 Fujimura N., Tanaka E., Yamamoto S., Shigemori M., Higashi H. (1997) Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. J Neurophysiol 77: 378– 385.

https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.1.378

74. Jiang C., Haddad G. (1993) Short periods of hypoxia activate a K⁺ current in central neurons. Brain Res 614: 352–356. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91055-w

 Kitazoe Y., Hiraoka N., Ueta H., Ogura H., Yamamoto K., Seto K., Saito H. (1983) Theoretical analysis on relationship between the neural activity and the EEG. J Theoret Biol 104: 667–683.

76. Traub R., Whittington M., Buhl E., Le Beau F., Bibbig A., Boyd S., Cross H., Baldeweg T. (2001) A possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. Epilepsia 42 (2): 153–170. https://doi.org/10.1046/j.1528–1157.2001.26900.x

- 77. *Thomas E., Wyatt R.* (1995) A computational model of spindle oscillations. Mathematics and Computers in Simulation 40:35–69.
- Dubner R., Ren K. (1999) Endogenous mechanisms of sensory modulation. Pain 82:45–53. 1999. https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00137-2
- Briatore E., Ferrari F., Pomero G., Boghi A., Gozzoli L., Micciolo R., Espa G., Calzolari S. (2013) EEG findings in cooled asphyxiated newborns and correlation with site and severity of brain damage. Brain Dev 35: 420–426. https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.03.010

The Impact of Hypoxic Exposures at Different Stages of Prenatal Development on Electrical Activity of the Rabbit Auditory Cortex in the First Month of Postnatal Life

A. G. Guseynov

A.I. Garayev Institute of Physiology, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan e-mail: guseynov alipanah@mail.ru

The spectral composition of the auditory cortex electrocorticogram (ECoG) was studied in 20- and 30-day-old rabbit pups exposed to hypoxia at different stages of prenatal life. Oxygen deficiency had differential effects on the formation of the auditory cortex ECoG spectrum at the embryonic (E1-8), pre-fetal (E8-18), and fetal (E18-28) stages of prenatal development. These differences were mainly manifested in an increased number of slow waves of electrical activity. Both in 20- and 30-day-old rabbit pups exposed to hypoxia at the embryonic stage, ECoG spectral characteristics insignificantly deviated from the normal level. By contrast, hypoxia experienced at the pre-fetal and fetal stages led to more pronounced, though similar, changes in spectral characteristics. These data suggest that neural structures of the rabbit auditory cortex are more sensitive to oxygen deficiency at the pre-fetal and fetal stages of prenatal development compared to the embryonic stage.

Key words: prenatal hypoxia, electrocorticogram, embryonic period, prefetal period, rabbits pups

—— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ГОНАД, ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛИЧИНОК ЧЕРНОЙ И КОРИЧНЕВОЙ МОРФ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

© 2021 г. Л. Л. Капранова^{1,*}, В. И. Рябушко¹, С. В. Капранов¹, В. Н. Лишаев¹, М. В. Нехорошев¹

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

**e-mail: lar_sa1980@mail.ru* Поступила в редакцию 16.06.2021 г. После доработки 16.08.2021 г. Принята к публикации 17.08.2021 г.

В настоящей работе методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой определены концентрации макро- и микроэлементов в гонадах, сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах самцов и самок черной и коричневой морф средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*, собранной в весенний сезон 2019 г. с коллекторов мидийноустричной фермы в Карантинной бухте г. Севастополя (Крым, Черное море). Получены статистически значимые различия в элементном составе гонад, половых продуктов и трохофор различных полов черных и коричневых мидий. В мужских и женских гонадах черных и коричневых мидий отсутствуют достоверные различия в макроэлементном (С, О, N, P, S) составе, тогда как в половых продуктах и личинках различия существенны. Микрофотографии образцов гонад, сперматозоидов, яйцеклеток и личинок черных и коричневых мидий, выполненные с помощью сканирующего электронного микроскопа, отличаются по распределению элементов. В женских гонадах коричневых мидий содержание этих элементов достоверно ниже, чем в черных. Содержание цинка и селена в моллюсках черной морфы выше. Больше всего статистически значимых различий в элементном составе удалось выявить в трохофорах и яйцеклетках черных и коричневых мидий.

Ключевые слова: мидия *Mytilus galloprovincialis*, морфы, гонады, сперматозоиды, яйцеклетки, личинки, макроэлементы, микроэлементы, Чёрное море **DOI:** 10.31857/S004445292106005X

Двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* — важный компонент прибрежных морских экосистем. Он обладает высоким потенциалом поглощения элементов из воды [1], и накопленные в тканях элементы могут превышать их концентрации в окружающей среде на несколько порядков [2]. При накоплении в количествах, превышающих метаболические потребности макро- и микроэлементы могут в конечном итоге выводиться с фекалиями, мочой и половыми продуктами [3, 4]. Поэтому весьма актуально применение мидий в качестве биоиндикаторов состояния прибрежных акваторий.

Элементный состав моллюсков изучают, в основном, в тканях и створках, но мало уделяют внимания определению содержания макро- и микроэлементы в половых продуктах и личинках моллюсков. Макроэлементы включаются в различные биофизические и биохимические процессы и поэтому являются незаменимыми для поддержания жизни. Недостаток даже одного из эссенциальных элементов в организме может остановить его рост или репродукцию. В организме моллюсков макроэлементы являются структурными компонентами основных органических веществ: белков (С, Н, О, N, S); липидов (C, H, O, P, N); углеводов (C, H, O). Макро- и микроэлементы входят в состав биологически активных веществ: аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов, пигментов. Установлена связь концентраций макроэлементов, состоящих из биогенных элементов (C, N, P, S) и основных катионов (Na, Mg, K, Ca), с биоаккумуляцией микроэлементов (Al, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Ba, Pb) в мягких тканях мидий Mytilus edulis и Perna viridis [5]. Было показано, что концентрации макроэлементов в тканях сильно связаны с ростом и размножением животных, а биологические процессы сильно влияют на биоаккумуляцию некоторых микроэлементов. Биологические факторы, влияющие на накопление макроэлементов, включают в себя возраст, размер, пол, генотип, фенотип, активность питания и степень полового созревания моллюсков [6].

Известно, что в черноморской популяции мидии *M. galloprovincialis* наблюдается полиморфизм по цвету раковины. Увеличение количества мидий с раковиной черного цвета можно рассматривать как физиологический отклик моллюсков на изменения окружающей среды [7]. До сих пор отсутствуют сведения о накоплении макро- и микроэлементов на протяжении всего жизненного цикла мидий, относящихся к разным цветовым морфам, включая их половые продукты и личинки. Изменение элементного состава в процессе нереста черной и коричневой морф мидии также еще не было изучено.

Поэтому целью данной работы является анализ элементного состава мужских и женских гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф мидии *M. galloprovincialis* из Черного моря.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Милии отбирали в весенний сезон 2019 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в Карантинбухте г. Севастополя (44°61'83.46" ной N. 33°50'33.80" Е) при температуре воды в море 8°С на глубине 6 м, визуально разделяя по цвету створок. Длина раковин черных и коричневых мидий варьировала в диапазоне от 6.5 до 7.5 см. Пол моллюсков и стадию их полового созревания определяли путем изучения мазков гонад под микроскопом [8]. Моллюски находились преимущественно на преднерестовой стадии развития. После механической очистки раковин мидий от обрастаний их тщательно промывали в фильтрованной морской воде и сразу извлекали мягкие ткани, чтобы избежать частичной потери элементов [9]. Выстилающие обе створки гонады мидий отделяли от раковин с использованием пластмассового скальпеля и промокали фильтровальной бумагой, предварительно вымоченной в деионизированной воде и высушенной. Яйцеклетки и сперматозоиды одноразмерных мидий получали по методике, разработанной ранее Л.Л. Никоновой и соавт. [8]. Яйцеклетки собирали с помощью дозатора и переносили в пробирки, сперматозоиды осаждали с помощью центрифуги при 1500 об/мин в течение 5 мин. Для получения личинок в лабораторных условиях проводили нерест и оплодотворение черных и коричневых морф одноразмерных моллюсков по методике, указанной в работе Л.Л. Капрановой и соавт. [10]. Биомассу личинок, полученную на третьи сутки эксперимента, отделяли от воды с помощью фильтра с размером пор 84 мкм. Все подготовленные образцы гонад, половых продуктов и личинок трехкратно промывали деионизированой водой и высушивали до постоянной массы при 105 ± 5°С. Высушенные образцы измельчали в ступке до однородной массы и просеивали через сито.

Качественный анализ для обнаружения макроэлементов проводили с помощью энергодисперси-

онного рентгеновского анализатора сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) "SU3500" ("Hitachi High-Technologies Corporation", Япония). Лиапазон измерений массовой доли элементов составлял от 0.5% до 100%. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений массовой доли элементов в диапазонах составляли: от 0.5 до 1.5-20%; от 1.5 до 10-15%; от 10 до 20-10%; от 20 до 100-5%. Количественный анализ микроэлементов проводили на масс-спектрометре с индуктивносвязанной плазмой ("Plasma Quant MS Elite", "Analytik Jena", Германия), с параметрами, приведенными в работе [9]. Перед микроэлементным анализом лабораторную посуду выдерживали в течение двух суток в 2% растворе азотной кислоты, очищенной перегонкой без кипения в установке "DST-1000" ("Savillex", США), с последующим ополаскиванием деионизированной водой. Биологические пробы минерализовали путем мокрого сжигания в очищенной 65% азотной кислоте во фторопластовых пробирках и затем разбавляли деионизированной водой так, чтобы разбавление было в пределах 1000-2000 мл г⁻¹ (в пересчете на сухую массу). Калибровочные кривые строили по стандартным растворам, полученным путем разбавления деионизированной водой многоэлементного стандарта "IV-ICPMS-71А-С" ("Inorganic Ventures", США, 10 мг π^{-1}). Коэффициенты детерминации линейной регрессии для всех калибровочных графиков были не менее 0.998.

Биологическая повторность (количество вариантов одного и того же опыта) – пятикратная. Аналитическая (количество анализов, взятых с одного образца) - трехкратная. Всего было проанализировано 150 образцов мидий: 5 мужских и 5 женских гонад черной и коричневой морфы, половые продукты, полученные от 5 самок и 5 самцов черных и коричневых мидий, а также их личинки. Погрешность трехкратных измерений макро- и микроэлементов в каждом образце не превышала допустимых значений. Статистические различия оцениваπи в программе PAST 4.01, применяя однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный попарный анализ по критерию Тьюки. Различия между средними значениями в выборках считали статистически значимыми при p < 0.05. Результаты представлены как среднее ± доверительный интервал с вероятностью 95% (n = 15, где n - 15) количество измерений).

Работа выполнена с соблюдением биоэтических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях, с участием мидий, соответствовали этическим стандартам и утвержденным правовыми актами РФ, а также принципам Базельской декларации.

| Элементы | Гонад | цы о | Гона | ды 9 | Спермат | гозоиды | Яйцев | слетки | Трохофоры | | | | |
|----------|------------------|-------------|----------------|--------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|--|--|--|
| | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | | | |
| | Массовая доля, % | | | | | | | | | | | | |
| С | 55.7 ± 2 | 52 ± 0.6 | 65.5 ± 5.7 | 59.5 ± 4.9 | 57.7 ± 1.0 | 57.1 ± 6.3 | $77.5\pm1.0^*$ | $55.7 \pm 1.4*$ | $58.1 \pm 6.6^*$ | $81.4 \pm 0.4*$ | | | |
| 0 | 24.0 ± 0.3 | 25 ± 0.6 | 20.1 ± 3.7 | 22.8 ± 3.2 | 19.7 ± 1.6 | $16.8\pm\!1.5$ | $12.9\pm1.4^*$ | $24.1\pm0.2^*$ | $22.4\pm3.5^*$ | $2.5\pm0.1*$ | | | |
| Ν | 10.0 ± 2 | 13 ± 0.6 | 5.4 ± 1.7 | 8.7 ± 2.5 | $11.4\pm0.1*$ | $3.0 \pm 1.2^*$ | $1.8\pm0.8^*$ | $11.1\pm1.0^*$ | $9.9\pm3.2^*$ | <0.1* | | | |
| Р | 2.0 ± 0.3 | 2.5 ± 0.5 | 1.3 ± 0.4 | 1.4 ± 0.5 | $4.6\pm0.6^*$ | < 0.1* | 0.5 ± 0.1 | 1.4 ± 0.1 | 1.5 ± 2.5 | < 0.1 | | | |
| S | 1.5 ± 0.4 | 1.1 ± 0.2 | 1.1 ± 0.4 | 1.3 ± 0.4 | $0.6\pm0.1^*$ | 3.1 ± 2.3* | 0.4 ± 0.1 | 1.3 ± 0.1 | 1.1 ± 0.3 | 0.1 ± 0.1 | | | |

Таблица 1. Макроэлементный состав и значимые различия (p < 0.05, n = 15) в элементном составе (C, O, N, P, S) черной и коричневой морф мидии *Mytilus galloprovincialis*

Примечание: кор. — коричневая морфа раковины мидии; чер. — черная морфа раковины мидии; \pm — доверительный интервал с вероятностью 95% (n = 15); * — достоверные различия между морфами (p < 0.05, n = 15).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим элементный состав коричневой и черной морфы мидии. Для сравнения макроэлементного состава коричневой и черной морфы мидии выбраны мужские и женские гонады, находящиеся на пятой стадии полового созревания (до нереста), сперматозоиды, яйцеклетки и трохофоры. Полученные экспериментальным путем данные пересчитывали на массу органического вещества, состоящего из углерода, кислорода, азота, фосфора и серы (табл. 1). Так как водород не имеет характеристических пиков в рентгеновском спектре, то рассчитывали теоретически возможное минимальное и максимальное содержание водорода в белках, липидах и углеводах (в виде гликогена) мягких тканей мидий. Полученное значение составило от 6.06 до 6.56% и учтено в табл. 1. Статистический анализ показал значимые различия в содержании C, O, N, P, S в сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах коричневых и черных мидий (в табл. 1 обозначены звездочкой). Следует отметить, что спектры СЭМ отображают элементный состав поверхностного слоя исследуемых образцов толщиной несколько микрон.

Углерод. Различий в содержании углерода в гонадах черных и коричневых мидий не обнаружено. При этом в мужских гонадах черных мидий углерода на 10% меньше, чем в женских гонадах коричневых мидий. В сперматозоидах коричневой и черной морф количество углерода одинаковое ($58.0 \pm 0.5\%$ и 57 ± 3%), но наблюдаются статистически значимые различия по N, P и S. В яйцеклетках коричневой морфы содержание углерода на 20% выше, чем в черной, что, вероятно, связано с более высоким содержанием жирных кислот в половых продуктах коричневых мидий (табл. 1) [11]. В личинках черных мидий содержание углерода на 30% выше, чем в личинках коричневых моллюсков.

Кислород. Количество кислорода в мужских и женских гонадах и сперматозоидах черных и ко-

ричневых мидий примерно одинаковое. Так как в яйцеклетках коричневых мидий содержание липидов выше из-за более высокого содержания жирных кислот, то массовая доля кислорода — в два раза ниже, чем в черных, у которых, видимо, более высокое содержание углеводов. В трохофорах коричневых мидий, наоборот, кислорода на порядок больше, чем в черных личинках.

Азот. В мужских гонадах черных и коричневых мидий содержание азота в два раза больше, чем в женских, что указывает на большее содержание в липидах женских гонад насыщенных жирных кислот [11]. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий количество азота на порядок больше, чем в черных. В яйцеклетках наоборот. Повышенное содержание азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий можно объяснить различием в количестве белков в половых продуктах черной и коричневой морф.

Фосфор. Гонады самцов мидий имеют более высокое содержание фосфора по сравнению с самками. Вероятно, данная особенность может быть связана с повышенной концентрацией фосфатных эфиров, в первую очередь $AT\Phi$, который служит основным источником энергии для обеспечения подвижности сперматозоидов. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора больше, чем в черных. В яйцеклетках наоборот. Видимо, в сперме коричневых и в яйцеклетках черных мидий также больше $AT\Phi$, что можно объяснить разной интенсивностью работы ферментов.

Сера. В сперматозоидах черных мидий содержание серы в несколько раз больше, чем в коричневых. Вероятно, это связано с повышенным количеством серосодержащих аминокислот в моллюсках (цистеина, метионина, цистина). В трохофорах коричневых и черных мидий значимых различий в содержании S не найдено. Обнаружено, что у двустворок *M. edulis* и *Rangia cuneata* метионин может преобразовываться в цистеин и окисляться до продуктов, дающих начало синтезу таурина, но с принципиальными отличиями [12, 13]. Одно из них заключается в механизме окисления цистеина в таурин. У *R. cuneata* наблюдали большое количество меченой цистеиновой кислоты, образующейся при окислении цистеина, что указывало на дальнейшее окисление цистеинсульфиновой кислоты в цистеиновую кислоту, в результате декарбоксилирования которой образуется таурин. У *M. edulis* цистеиновая кислота не образовалась, зато появился меченный промежуточный продукт - гипотаурин. Таурин образовывался и оставался в тканях мидии, в то время как у *R. cuneata* таурин в течение нескольких часов исчезал из организма. Концентрацию аминокислот в организме связывают с соленостью воды. При сравнении содержания аминокислот в двух видах морских моллюсков M. edulis и Ostrea edulis с пресноводным видом Anodonla cvgnea оказалось, что пресноводный вид имеет более низкие концентрации аминокислот, чем морские моллюски [14]. Аналогичные результаты получены при сравнении концентрации аминокислот в тканях пресноводных и морских ракообразных. Различия двух морф мидии по элементному составу также можно объяснить адаптацией моллюсков к условиям обитания [15].

Рассмотрим распределение элементов в половых продуктах и трохофорах мидии, полученное с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (рис. 1). Для наглядности на рис. 1 a-j представлены наиболее подходящие масштабы сканирования.

Цвета клеток и тканей черных и коричневых морф мидии имеют разнообразный характерный морфотип, образующий яркие орнаменты. Цветные узоры тканей мужских и женских гонад, половых продуктов и личинок черных и коричневых моллюсков отличаются по секторам различной ширины, концентрических полос, пятен, шевронов или зигзагообразных сложных мозаик, состоящих из геометрических фигур разных размеров. Во-первых, это может быть связано с различной структурой тканей. Во-вторых, особенно отличаются по цвету и структуре сперматозоиды, яйцеклетки и трохофоры мидий, принадлежащие к разным цветовым морфам.

Красным цветом на зеленом фоне обозначены зоны с максимальным содержанием кислорода. Возможно, это вызвано тем, что содержание гликогена и сахаров в мужских гонадах коричневых и черных мидий различное. Представленные изображения отличаются текстурой поверхности. Образцы, относящиеся к черной морфе, более текстуированы. На всех изображениях отчетливо видны оттенки от бледно-зеленого (рис. 1*d*) до темно-фиолетового (рис. 1*i*) и изумрудного (рис. 1*j*) цвета, что показывает различия в элементном составе гонад, половых продуктов и личинок черной и коричневой морф. Отмечены фиолетовые включения различного размера в трохофорах мидий (рис. 1 *i*, *j*). Эти включения можно наблюдать на зеленом фоне (рис. 1a-h). Вероятно, это факт свидетельствует об ответной реакции трохофор на влияние экзогенных факторов, например, соленость, температуру [16] или загрязнения водной среды [10].

У трохофор черных мидий фиолетовым цветом обозначены атомы серы (рис. 1*j*). Массовая доля серы в трохофорах коричневых мидий на порядок больше, чем в черных: $1.1 \pm 0.1\%$ и $0.1 \pm 0.1\%$ соответственно.

Различия двух морф мидий по элементному составу обусловлены биохимическими характеристиками их тканей [17]. Активности альдолазы в жабрах темно-коричневых мидий ниже, чем у черных мидий [18], что связано с особенностями условий обитания мидий.

Цветовые морфы характерны и для других видов морских моллюсков. Так, при изучении размерновозрастных и фенотипических особенностей соматического роста черноморского гребешка выделено 7 цветовых морф [19]. Бежевый, фиолетовый и серо-коричневый фенотипы имеют высокий уровень синтеза белка. Моллюски, относящиеся к фенотипу смешанного типа, имели показатели тканевого биосинтеза примерно в 2.5 раза ниже, чем представители других морф. Полученные результаты свидетельствуют о сопряженности ростовых процессов с окрасом раковин моллюска. Окраска раковины мидий зависит от гемэритрина - фиолетового пигмента, что непосредственно связано с экспрессией определенных генов [7]. Так, при изучении цвета раковин устриц Crassostrea gigas впервые обнаружили эндогенные порфирины, определяющие пигментацию раковин [16]. Наличие ге-MOB, чьими предшественниками являются порфирины, объясняло пурпурный цвет раковин, а также темный цвет мышц моллюсков. Эти исследования показали, что различный окрас раковин устриц связан с трансляцией генов, так как у некоторых моллюсков обнаружены псевдогены или неактивные гены, которые не могли приводить к экспрессии определенного белка.

Мидии накапливают металлы из воды независимо от того, являются ли эти элементы незаменимыми для их жизнедеятельности или ксенобиотиками. Поэтому представляет интерес изучить микроэлементный состав гонад, половых продуктов и трохофор мидий, относящихся к разным цветовым морфам (табл. 2).

Гонады самок отличаются от гонад самцов повышенным содержанием As, Mn и Zn на разных стадиях полового созревания (за исключением стадии 4). Это дает сильный довод в пользу биохимической вовлеченности этих элементов в оогенез мидий.

Особое внимание следует уделить элементам, которые играют существенную функциональную роль в гаметогенезе мидий. Например, селен и



Рис. 1. Микрофотографии в СЭМ половых продуктов и трохофор мидии *Mytilus galloprovincialis*: а – гонады с коричневой морфы, b – гонады с черной морфы, c – гонады с коричневой морфы, d – гонады с черной морфы, e – сперматозоиды коричневой морфы, f – сперматозоиды черной морфы, g – яйцеклетки коричневой морфы, h – яйцеклетки черной морфы, i – трохофоры коричневой морфы, j – трохофоры черной морфы.

| 06- | концентрация микроэлементов, мкг/г _{сух.} | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| 00ъ- ект | Cu | | As | | Fe | | Al | | Mg | | Ca | | Si | | Se | | Zn | |
| | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. | Kop. | Чер. |
| Гď | $80 \pm$ | $95 \pm$ | $7.0 \pm$ | $15 \pm$ | $65 \pm$ | $55 \pm$ | $50 \pm$ | $30 \pm$ | 757 ± | $450 \pm$ | $115 \pm$ | 71 ± | $30 \pm$ | $22 \pm$ | $1.0~\pm$ | $1.0 \pm$ | $17 \pm$ | $20 \pm$ |
| | 9 | 12 | 0.4* | 3* | 8 | 4 | 3* | 2* | 230* | 30* | 26 | 12 | 10 | 5 | 0.1 | 0.1 | 3 | 1 |
| ΓŶ | $347 \pm$ | 173 ± | 14 ± | 18 ± | $117 \pm$ | $145 \pm$ | $73 \pm$ | $84 \pm$ | 398 ± | $207 \pm$ | 91 ± | $53 \pm$ | 46 ± | $42 \pm$ | $2.0 \pm$ | $0.7 \pm$ | $57 \pm$ | 51 ± |
| | 65* | 14* | 1 | 5 | 33 | 24 | 13 | 13 | 54* | 46* | 25 | 18 | 12 | 9 | 0.4* | 0.1* | 8 | 10 |
| Сп. | $764 \pm$ | $2139 \pm$ | $29 \pm$ | $3\pm$ | $189~\pm$ | $232 \pm$ | $253 \pm$ | $473 \pm$ | $171 \pm$ | $1292\pm$ | $363 \pm$ | $233 \pm$ | $95\pm$ | $110 \pm$ | $2.0 \pm$ | $0.6 \pm$ | $28 \pm$ | $62 \pm$ |
| | 99* | 256* | 5* | 1* | 20* | 16* | 13* | 13* | 28* | 136* | 65* | 48* | 15 | 30 | 0.1* | 0.1* | 1* | 12* |
| Я | $373 \pm$ | $213 \pm$ | 12 ± | 17 ± | $83 \pm$ | $52 \pm$ | $137 \pm$ | $63 \pm$ | $141 \pm$ | $163 \pm$ | $139 \pm$ | 94 ± | $63 \pm$ | $44 \pm$ | $0.5 \pm$ | $1.0 \pm$ | $45 \pm$ | 56 ± |
| | 89* | 13* | 3 | 3 | 16 | 11 | 24* | 9* | 19 | 37 | 12* | 13* | 2 | 6 | 0.1* | 0.1* | 2 | 10 |
| Т | $613 \pm$ | $439 \pm$ | н.о. | $0.3 \pm$ | 49 ± | $75 \pm$ | $103 \pm$ | $106 \pm$ | $45 \pm$ | $109 \pm$ | 93 ± | $239 \pm$ | $26 \pm$ | $28 \pm$ | $0.3 \pm$ | $0.8 \pm$ | $2.0\pm$ | $5.0 \pm$ |
| | 14* | 42* | | 0.2 | 2* | 11* | 2 | 12 | 11* | 9* | 2* | 17* | 9 | 5 | 0.1 | 0.4 | 0.1* | 0.1* |

Таблица 2. Концентрация некоторых микроэлементов в черных и коричневых морфах мидии Mytilus galloprovincialis

Примечание: Данные представлены как среднее \pm доверительный интервал с вероятностью 95%, n = 15; н.о. – не обнаружено; кор. – коричневая морфа раковины мидии; чер. – черная морфа раковины мидии; Г \circ – мужские гонады; Г \circ – женские гонады; Сп.– сперматозоиды; Я – яйцеклетки; Т – трохофоры; * – достоверные различия между морфами (p < 0.05, n = 15).

цинк необходимы для поддержания функций репродуктивной системы. Цинк, полученный из пищи, связан, в основном, с мягкими тканями мидий, а Zn из морской воды – с раковинами [20]. В общем, не менее 30% микроэлементов поглощается с пищей, а в случае Se эта доля составляет 98% [21].

Различия в распределении Se между органами, а также его влияние на репродуктивную функцию моллюсков плохо изучены. Концентрации Se в гонадах и половых продуктах самок и самцов мидий изменяются аналогично концентрациям стероидных гормонов и зависят от репродуктивного цикла моллюсков [9, 10].

Данные о роли Se в метаболизме мидий, к сожалению, отсутствуют. Селен и селенопротеины обеспечивают жизнеспособность сперматозоидов и защиту организма от активных форм кислорода. Исследования селенопротеинов на генном уровне показали, что их отсутствие во время сперматогенеза приводит к аномальному развитию сперматозоидов, что, в свою очередь, влияет на качество спермы [22]. Селен в основном влияет на репродуктивные параметры и плодовитость животных [23]. Существуют доказательства того, что размер моллюсков может играть роль в поглощении Se. Обнаружено, что концентрация селена в моллюсках C. amurensis, подвергшихся воздействию растворенных источников Se (IV), снизилась на 50%, когда средняя длина раковины моллюсков увеличилась на 30% [24].

Цинк важен для всех форм жизни. Особенно много его в тканях морских животных. Известна специфическая функция цинка в репродуктивной системе амфибий, например, существование "цинковых искр", контролирующих оплодотворение [25]. Цинк является кофактором большой группы ферментов, катализирующих гидролиз пептидов, белков и сложных эфиров, полимеризацию ДНК и РНК. Наличие цинка стимулирует рост и деление клеток [26].

Настоящее исследование показало, что в гонадах и личинках черной морфы мидии содержание Zn больше, чем в коричневых моллюсках. Также наблюдается отличие концентраций Zn в аналогичных тканях самцов и самок. Но только по этим данным нельзя установить, с какими субклеточными структурами или биохимическими процессами связаны более высокие концентрации элементов. Наиболее явные отличия в содержании Zn можно наблюдать в сперматозоидах, яйцеклетках и трохофорах. В мужских и женских гонадах содержание Zn примерно одинаковое. Видимо, мидии поглощают микроэлементы, в том числе Zn, из окружающей среды, где они, подобно стероидным гормонам, депонируются в мягких тканях, а затем экскретируются вместе с половыми продуктами [4, 23].

Содержание Se в женских гонадах и сперматозоидах коричневых мидий в два раза выше, чем в черных моллюсках. А в яйцеклетках и трохофорах наоборот. Можно предположить, что различия в содержании Se и Zn в мягких тканях и половых продуктах черных и коричневых мидий влияют на биохимический состав как самих моллюсков, так и их половых продуктов и личинок. В целом многие элементы накапливаются в больших количествах в гонадах самок, что согласуется с измерениями в мягких тканях в преднерестовый период [9]. Это дает сильный довод в пользу биохимической вовлеченности этих элементов в оогенез мидий. Несмотря на то что пока не известна специфическая функция этих элементов в репродуктивной системе самок мидий, имеются сообщения об эссенциальности цинка в развитии ооцитов и эмбрионов.

Можно предположить, что максимальную концентрацию микроэлементов в гонадах мидии можно наблюдать на преднерестовой стадии полового созревания, когда масса гонад максимальна. Тем не менее, как показали результаты наших исследований, содержание Mg и Ca выше в мужских гонадах. В мужских и женских гонадах коричневых мидий Mg и Ca выше, чем у черных (табл. 2).

В женских гонадах коричневых и черных мидий, в отличие от мужских, преобладают Cu, Fe и As, но в гонадах коричневых моллюсков содержание этих элементов ниже, чем в черных (табл. 2). Наиболее важными факторами снижения концентрации элементов в тканях является перераспределение элементов по всему организму в процессе интенсивного роста гонад и выведение с половыми продуктами [4, 9].

Содержание К и Na в данной работе не рассматривали, так как морская вода, в которой выращивали личинок, является "матрицей" для этих элементов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно отметить, что при оценке содержания металлов в тканях мидий следует учитывать пол моллюсков, их возраст и репродуктивный цикл, который оказывает влияние на межсезонные изменения массы ткани и цвет раковин. В мужских и женских гонадах черных и коричневых мидий не наблюдали достоверных различий в макроэлементном составе, тогда как в половых продуктах и личинках различия были существенные. В гонадах, половых продуктах коричневых мидий содержание углерода, следовательно, содержание органических соединений выше, чем в черных мидиях.

В яйцеклетках коричневой морфы кислорода в два раза меньше, а в трохофорах на порядок больше, чем в моллюсках, относящихся к черной морфе. Это показывает, что в трохофорах коричневых мидий содержится большое количество полисахаридов и/или других энергетических доноров и гликогена. Десятикратное превышение азота в сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий, по сравнению с черными, в основном указывает на различный аминокислотный состав моллюсков, что может быть связано как с условиями их обитания, так и заложено генетически. В сперматозоидах и трохофорах коричневых мидий фосфора, и соответственно АТФ, больше, чем в черных моллюсках. В яйцеклетках наоборот.

В сперматозоидах черных мидий содержание серы в пять раз выше, чем в коричневых, вероятно, из-за наличия серосодержащих аминокислот. В мужских и женских гонадах коричневых мидий концентрация марганца, кальция, калия и фосфора выше, чем у черных. В женских гонадах коричневых и черных мидий преобладают медь, железо и мышьяк, но в гонадах коричневых мидий содержание этих элементов ниже, чем в черных. Больше всего статистически значимых различий удалось выявить в трохофорах и яйцеклетках черных и коричневых мидий, что при дальнейшем развитии может отражаться на биохимическом составе моллюсков.

Вероятно, в процессе биохимической эволюции в организмах возникали разнообразные металлопротеины, и эта диверсификация требовала не только химической вариабельности элементов, но и их относительно высоких концентраций в тканях. Этот факт, скорее всего, указывает на то, что мидии двух морф могут развиваться с разной интенсивностью.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН" по темам "Фундаментальные исследования популяционной биологии морских животных, их морфологического и генетического разнообразия" (№ 121040500247-0) и "Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса" (№ 121030300149-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (М.В.Н., Л.Л.К., В.И.Р.), планирование эксперимента, подготовка и обработка проб, сбор данных (Л.Л.К., С.В.К., В.И.Р., В.Н.Л.), обработка данных (Л.Л.К., В.И.Р.), написание и редактирование манускрипта (Л.Л.К., В.И.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Rainbow P.S.* (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environmental Pollution 120 (3): 497–507. https://doi.org/10.1016/S0269–7491(02)00238–5
- Casas S., Gonzalez J.L., Andral B., Cossa D. (2008) Relation between metal concentration in water and metal content of marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*): impact of physiology. Environmental Toxicology and Chemistry (ET&C) 27 (7): 1543–1552. https://doi.org/10.1897/07–418

 Varotto L., Domeneghetti S., Rosani U., Manfrin C., Cajaraville M.P., Raccanelli S., Pallavicini A., Venier P. (2013) DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). PLOS One 8 (1): e54602.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054602

- Bezuidenhout J., Dames N., Botha A., Frontasyeva M.V., Goryainova Z.I., Pavlov D. (2015) Trace elements in mediterranean mussels Mytilus galloprovincialis from the South African West coast. Ecological Chemistry and Engineering Society 22 (4): 489–498. https://doi.org/10.1515/eces-2015-0028
- Fengjie Liu, Wen-Xiong Wang (2015) Linking trace element variations with macronutrients and major cations in marine mussels *Mytilus edulis* and *Perna viridis*. Environmental Toxicology and Chemistry 34 (9): 2041–2050. https://doi.org/10.1002/etc.3027
- Richir J., Gobert S. (2014) The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope–grown Mytilus galloprovincialis. Ecological Indicators 36: 33–47. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.021
- Chelyadina N.S. (2018) Phenotypic and sexual structure of *Mytilus galloprovincialis* Lam., cultivated on the mussel-oyster farm in the outer harbor of Sevastopol city (Crimea, Black Sea). Marine Biological Journal 3 (3): 86–93.

https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.3.09

8. *Nikonova L.L., Nekhoroshev M.V., Ryabushko V.I.* (2017) Total testosterone and estradiol in the gonads and gametes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 53 (6): 519–522.

https://doi.org/10.1134/S0022093017060114

 Kapranov S.V., Karavantseva N.V., Bobko N.I., Ryabushko V.I., Kapranova L.L. (2021) Sex- and sexual maturation-related aspects of the element accumulation in soft tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. collected off coasts of Sevastopol (southwestern Crimea, Black Sea). Environmental Science and Pollution Research 28 (17): 21553–21576. https://doi.org/10.1007/s11356–020–12024–z

10. Kapranova L.L., Malakhova L.V., Nekhoroshev M., Lobko V.V., Ryabushko V.I. (2020) Fatty acid composition in trochophores of mussel Mytilus galloprovincialis grown under contamination with polychlorinated biphe-

- nyls. Marine Biological Journal 5 (2): 38–49. https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.2.04
- Kapranova L.L., Nekhoroshev M.V., Malakhova L.V., Ryabushko V.I., Kapranov S.V., Kuznetsova T.V. (2019) Fatty acid composition of gonads and gametes in the black sea bivalve mollusk Mytilus galloprovincialis Lam. at different stages of sexual maturation. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 55 (6): 448–455. https://doi.org/10.1134/S0022093019060024

- Welborn J.R., Manahan D.T. (1995) Taurine metabolism in larvae of marine molluscs (Bivalvia, Gastropoda). Journal of Experimental Biology 198:1791–1799.
- 13. *Allen K., Awapara J.* (1960) Metabolism of sulfur amino acids in *Mytilus edulis* and *Rangia cuneata*. Biology Bulletin 118: 173–182.
- Ducháteau G., Sarlet H., Camien M.N., Florkin M. (1952) Acides amines non protéiniques des tissus chez les Mollusques Lamellibranches et chez les Vers. Comparaison des formes marines et des formes dulcicoles. Archives Internationales de Physiologie 60 (1): 124–125. https://doi.org/10.3109/13813455209145044
- Slynko Yu.V., Kulikova A.D., Slynko E., Soldatov A.A. (2018) Genetic changeability by loci COI mtDNA for different coloring of shell phenotypes of black sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Russian Journal of Genetics 54 (8): 944–949. https://doi.org/10.1134/S1022795418080112
- Bonnard M., Cantel S., Boury B., Parrot I. (2020) Chemical evidence of rare porphyrins in purple shells of Crassostrea gigas oyster. Scientific Reports 10:12150. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69133-5
- 17. Kulikova A.D., Soldatov A.A., Andreenko T.I. (2015) The activity of transaminases in the tissues of the Black-Sea mollusk *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 51 (1): 23–31. https://doi.org/10.1134/S0022093015010044
- Kulikova A.D., Andreenko T.I., Soldatov A.A. (2015) Activity of aldolase in tissues of *Mytilus galloprovincialis* with different shells color. Hydrobiological Journal 51 (6): 53–59. https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v51.i6
- Shcherban S.A., Melnik A.V. (2020) Size and Age Characteristics and Phenotypic Peculiarities of Somatic Growth of the Black Sea Mollusk Flexopecten glaber ponticus (Bivalvia, Pectinidae). Biology Bulletin 47 (8): 920–929. https://doi.org/10.1134/S1062359020080129
- Fisher N.S., Teyssié J.L., Fowler S.W., Wang W.X. (1996) Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions. Environmental Science & Technology (ES&T) 30 (11): 3232–3242. https://doi.org/10.1021/es960009u
- Wang W.-X., Fisher N.S. (1997) Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series 161: 103– 115.
 - https://doi.org/10.3354/meps161103
- Ahsan U., Kamran Z., Raza I., Ahmad S., Babar W., Riaz M.H., Iqbalb Z. (2014) Role of selenium in male reproduction – A review. Animal Reproduction Science 146 (1–2): 55–62. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009
- 23. *Mehdi Y., Hornick J.-L., Istasse L., Dufrasne I.* (2013) Selenium in the environment, metabolism and involvement in body function. Molecules 18: 3292–3311. https://doi.org/10.3390/molecules18033292

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 6 2021

24. *Lee B.G., Lee J.S., Luoma S.N.* (2006) Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: a bioenergetic modeling approach. Environmental Toxicology and Chemistry 5: 1933–1940.

https://doi.org/10.1897/05-540R.1

25. Seeler J.F., Ajay S., Zaluzec N.J., Bleher R., Lai B., Schultz E.G., Hoffman B.M., LaBonne C., Woodruff T.K., *O'Halloran T.V.* (2021) Metal ion fluxes controlling amphibian fertilization. Nature Chemistry 13: 683–691. https://doi.org/10.1038/s41557–021–00705–2

 Keith A.M., Huang C.-C., Carol A. (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes. The Journal of Nutrition 130 (5): 1437S–1446S. https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1437S

ELEMENTAL COMPOSITION OF GONADS, GAMETES AND LARVAE IN THE BLACK AND BROWN MORPHS OF THE BIVALVE MOLLUSK *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.

L. L. Kapranova^{*a*, #}, V. I. Ryabushko^{*a*}, S. V. Kapranov^{*a*}, V. N. Lishaev^{*a*}, and M. V. Nekhoroshev^{*a*}

^a A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia [#]e-mail: lar_sa1980@mail.ru

Concentrations of the bulk and trace elements were determined in male and female gonads, gametes (sperm and eggs), and larvae (trochophores) of black and brown morphs of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincia-lis* using energy dispersive X-ray spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry. The mollusks were collected in spring 2019 on a mussel-and-oyster farm (Black Sea, Crimea, Sevastopol, Karantinnaya Bay). In the male and female gonads of black and brown morphs, no statistically significant differences were detected in concentrations of the bulk structural elements (C, N, O, P, S), while in gametes and trochophores, these differences were significant. Trace elemental analysis revealed that in the female gonads of black and brown morphs, Cu, Fe, and As were dominant, however in brown morphs, concentrations of these elements were significantly lower than in black mussels. Zn and Se concentrations in the gonads of black morphs were significantly higher than in brown morphs. These data show that the two *M. galloprovincialis* morphs differ in their elemental composition.

Keywords: mussel Mytilus galloprovincialis, morphs, gonads, sperm, eggs, larvae, trace elements, bulk structural elements, Black Sea