

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 58, номер 1, 2022

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

---

---

## ОБЗОРЫ

Современные представления о клетках периневрия:  
особенности происхождения, структура и функции

*Е. С. Петрова, Е. А. Колос*

3

---

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Соотношение возбуждающих и тормозных синаптических процессов  
в антиноцицептивном ядре Raphe Magnus на модели болезни Паркинсона  
в условиях протекции гидрокортизоном

*М. В. Погосян, М. Э. Овсепян, М. А. Даниелян, Л. Э. Амбарцумян,  
Л. П. Манукян, Дж. С. Саркисян*

24

Роль LIMK1 дофаминовых и серотониновых нейронов в стабильности генома,  
обучении и памяти у дрозофилы при стрессорной реакции  
на ослабление геомагнитного поля

*А. В. Медведева, А. В. Реброва, Е. С. Заломаева, С. К. Тураева, Е. А. Никитина,  
Е. В. Токмачева, С. А. Васильева, Б. Ф. Щеголев, Е. В. Савватеева-Попова*

34

Влияние краткосрочной ранжированной гипоксии  
на функциональные и морфологические показатели гемоцитов  
тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

*Е. С. Кладченко, А. Ю. Андреева, Т. А. Кухарева*

43

Сравнительное изучение стероидогенного эффекта  
5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилтио)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-  
6-карбоксамид и хорионического гонадотропина  
при различных способах введения самцам крыс

*А. А. Степочкина, А. А. Бахтюков, К. В. Деркач,  
В. Н. Сорокоумов, А. О. Шпаков*

51

Активность пищеварительных ферментов у американских норок (*Neovison vison*)  
при отборе на агрессивное и ручное поведение

*С. Н. Калинина, В. А. Илюха, О. В. Трапезов, А. В. Морозов,  
Л. И. Трапезова, М. А. Некрасова, М. А. Степанова, Е. А. Сысоева*

61

---

---

# Contents

---

---

Vol. 58, No. 1, 2022

---

---

## REVIEWS

Current Views on Perineurial Cells: Unique Origin, Structure, Functions

*E. S. Petrova, E. A. Kolos*

3

---

## EXPERIMENTAL ARTICLES

A Correlation of Excitatory and Inhibitory Synaptic Processes  
in the Antinociceptive Raphe Magnus Nucleus in Hydrocortisone-Protected Model  
of Parkinson's Disease

*M. V. Poghosyan, M. E. Hovsepyan, M. H. Danielyan, L. E. Hambarzumyan,  
L. P. Manukyan, J. S. Sarkissian*

24

Role of LIM Domain Kinase 1 in Dopaminergic and Serotonergic Neurons  
in Drosophila Genome Stability, Learning and Memory during Stress Response  
to Weakening of Earth's Geomagnetic Field

*A. V. Medvedeva, A. V. Rebrova, E. S. Zalomaeva, S. K. Turaeva, E. A. Nikitina,  
E. V. Tokmacheva, S. A. Vasileva, B. F. Shchegolev, E. V. Savvateeva-Popova*

34

Effect of Ranged Short-Term Hypoxia on Functional and Morphological Parameters  
of Hemocytes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

*E. S. Kladchenko, A. Yu. Andreyeva, T. A. Kukhareva*

43

A comparative study of the steroidogenic effect of 5-amino-n-tert-butyl-2-(methylthio)-4-(3-  
(nicotinamido)phenyl)thieno[2,3-d]-pyrimidine-6-carboxamide and chorionic gonadotropin  
with different methods of administration to male rats

*A. M. Steepochkina, A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach,  
V. N. Sorokoumov, A. O. Shpakov*

51

Activity of Digestive Enzymes in the American Mink (*Neovison vison*) Selected  
for Tameness and Defensive Aggression toward Humans

*S. N. Kalinina, V. A. Ilyukha, O. V. Trapezov, A. V. Morozov, L. I. Trapezova,  
M. A. Nekrasova, M. A. Stepanova, E. A. Sysoeva*

61

---

---

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛЕТКАХ ПЕРИНЕВРИЯ: ОСОБЕННОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

© 2022 г. Е. С. Петрова<sup>1,\*</sup>, Е. А. Колос<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: iempes@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.10.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 11.11.2021 г.

Целью настоящей обзорной статьи явилось обобщение современных представлений о клетках одной из оболочек периферического нерва – периневрия. Актуальность темы связана с недостатком фундаментальных знаний об участии этих клеток в восстановлении поврежденных нервных проводников, а также с необходимостью выяснения молекулярных механизмов стимуляции регенерации нервов после повреждений. В обзоре представлены данные последних лет о морфофункциональных особенностях периневрия, о происхождении клеток периневрия в фило- и онтогенезе, о молекулярных особенностях регуляции гемато-неврального барьера. Подчеркивается уникальность онтогенетического происхождения периневрия. Дана характеристика иммуногистохимических маркеров, используемых для идентификации клеток периневрия. Описаны особенности периневрия спинномозговых ганглиев и корешков спинного мозга.

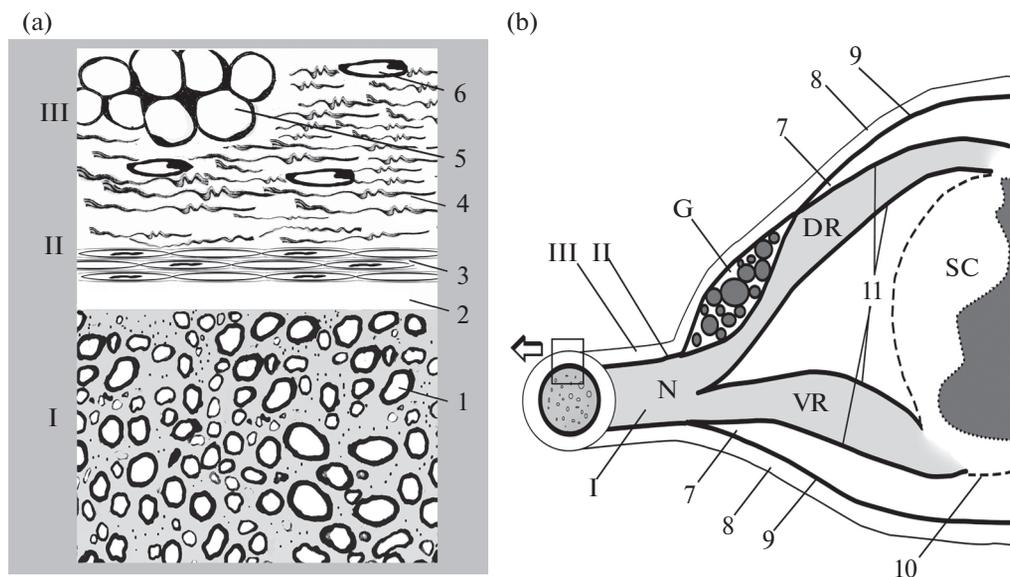
*Ключевые слова:* периневрий, периферический нерв, спинномозговой ганглий, спинномозговой корешок, гемато-невральный барьер, клаудин, окклюдин, клетки нервного гребня, мезенхима

**DOI:** 10.31857/S0044452922010053

Периневрий является одной из оболочек нерва и состоит из клеток, обладающих рядом морфофункциональных особенностей, отличающих его от других структур в организме животных и человека. Актуальность исследования клеток периневрия связана с недостатком фундаментальных знаний об их участии в восстановлении поврежденных нервных проводников, а также с необходимостью выяснения молекулярных механизмов стимуляции регенерации нервов после повреждений. Несмотря на высокую способность периферических нервных волокон к регенерации, полного функционального восстановления нерва после травмы с помощью разработанных хирургических способов не всегда удается достичь [1, 2]. Успешность применяемых в клинической практике методов нейропластики и шовной техники зависит от степени поврежденности нервного проводника. В настоящее время активно ведется поиск новых методов оценки степени поражения нервных проводников и способов стимуляции их регенерации [1–5]. Для разработки и совершенствования этих способов необходимо изучение молекулярных механизмов, которые регулируют репаративные процессы в поврежденном нерве, и взаимоотношения клеток, обеспечиваю-

щих эндоневральный гомеостаз и функционирование гемато-неврального барьера.

Исследования морфофункциональных особенностей нервов в норме и после повреждения проводятся в течение многих десятилетий, начиная с классических работ английского гистолога Августа Валлера (1816–1870) и испанского нейробиолога Сантьяго Рамон-и-Кахаля (1852–1934). Результаты исследований последних лет, выполненные с применением иммуногистохимических методов, электронной, конфокальной и флуоресцентной микроскопии, вестерн-блота, ПЦР и др., обобщены в ряде монографий и обзоров [2, 6–12]. Особое внимание в современных работах уделяется глияльным элементам ПНС – шванновским клеткам (ШК) [8, 11, 13, 14]. Менее изученными остаются другие клеточные элементы нерва, в частности, периневральные клетки, которые, наряду со ШК, участвуют в создании необходимого для роста и регенерации аксонов микроокружения. Обобщение имеющихся в современной научной литературе данных о клетках периневрия, их происхождении в фило- и онтогенезе, реакции на повреждение и их регенеративного потенциала явилось целью настоящего обзора.



**Рис. 1.** Схема оболочек нерва (а) и спинномозговых корешков (б). I – эндоневрий; II – периневрий; III – эпиневрй; 1 – нервное волокно; 2 – субпериневральное пространство; 3 – базальная мембрана; 4 – коллагеновое волокно; 5 – жировая клетка; 6 – кровеносный сосуд; 7 – субарахноидальный угол; 8 – твердая мозговая оболочка; 9 – паутинная мозговая оболочка; 10 – мягкая мозговая оболочка; 11 – оболочки корешков; SC – спинной мозг; G – спинномозговой ганглий; DR – дорзальный корешок; VR – вентральный корешок; N – нерв. Модификация схем [46, 49] с использованием собственных препаратов.

## ОБОЛОЧКИ НЕРВА

Оболочки, создающие микроокружение, обеспечивающее нормальное функционирование нервного волокна (эпиневрй, периневрий и эндоневрий), описаны еще в девятнадцатом веке. Они являются продолжением твердой, паутинной и мягкой мозговых оболочек соответственно [15, 16]. В современных зарубежных исследованиях их порой называют не оболочками, а частями или слоями нервных проводников [17]. Термин “оболочки” объясняет тонкую структуру нерва (рис. 1а). Отдельные нервные волокна, окруженные шванновскими клетками, находятся в эндоневрии. Среди них имеются миелиновые и немиелиновые волокна. Пучки таких волокон окружает периневральная оболочка. Нервный ствол, состоящий из нескольких пучков нервных волокон, с внешней стороны окружен эпиневрием [7, 9, 10].

Эндоневрий содержит помимо нервных волокон, шванновских клеток, капилляров и отдельных артериол с небольшим числом перицитов, тучные клетки, резидентные макрофаги, фибробласты и коллагеновые волокна, состоящие из коллагена I и III типов, которые продуцируются фибробластами и шванновскими клетками [18]. Кровеносные сосуды проникают в эндоневрий из эпиневральной внешней оболочки через периневрий, обретая окружение из слоя периневральных клеток [15]. Механическую прочность нервного ствола обеспечивают коллагеновые волокна. Процентное соотношение клеток эндоневрия таково: 10% составля-

ют фибробласты, 2–9% – макрофаги, небольшое количество тучных клеток, остальные клетки относятся к периферической глии – миелинизирующим и немиелинизирующим ШК [18]. Сосуды эндоневрия в большинстве своем не иннервируются. Важно отметить, что эндотелиальные клетки сосудов эндоневрия соединяются между собой плотными контактами и участвуют, наряду с клетками периневрия, в формировании специфического гемато-неврального барьера [9, 19].

Эпиневрй является наружной соединительнотканной оболочкой нервного ствола и содержит фибробласты, тучные клетки, жировую клетчатку, большое количество коллагеновых (коллаген I типа) и эластических волокон, кровеносные и лимфатические сосуды [9, 20]. На всем протяжении нерва эпиневрй имеет различную толщину, так как жировая клетчатка, входящая в его состав, наблюдается в определенных участках в виде островков, а не сплошным слоем по всей длине. Жировая ткань защищает нервные пучки от сдавливания. Показано, что уменьшение количества жировой клетчатки в эпиневрйи при общем истощении приводит к развитию параличей [18]. Эпиневральная оболочка позволяет нерву сохранять некоторую подвижность, удлиняться и укорачиваться в незначительной степени. Кровеносные сосуды эпиневрйя являются достаточно проницаемыми. Разного диаметра эпиневральные артериальные и венозные сосуды образуют анастомозы, формируя сосудистую сеть, которая связана с крупными арте-

риями и венами, проходящими вдоль нервного ствола. Сосуды эпиневрия богато иннервируются: симпатические адренергические и пептидергические нервные терминалы обеспечивают их тонус, сужение и расширение [9]. В иннервации оболочек нерва участвуют тонкие немиелинизированные аксоны, выходящие из эндоневрия нервного ствола (*nervi nervorum*) [9, 21]. В эпиневрии присутствуют несвязанные с сосудами *nervi nervorum*, выявляемые с помощью иммуногистохимических реакций на кальцитонин (CGRP) и периферин [21]. Лимфатические сосуды эпиневрия имеют связь с регионарными лимфатическими узлами. Следует отметить, что лимфатические сосуды имеются только в эпиневрии, в других структурах нерва они отсутствуют [9, 18]. Проникая сквозь периневральную оболочку, сосуды эпиневрия формируют сосудистую сеть внутренней оболочки нервного ствола — эндоневрия.

Сложные нервы, состоящие из чувствительных и двигательных волокон и связанные с большой зоной иннервации, по поверхности эпиневальной оболочки покрыты параневрием. Это соединительнотканная структура, располагающаяся между нервом и мышцами [22]. В его состав в большом количестве входят жировая клетчатка и коллагеновые волокна. В работах последних лет параневрий часто называют “циркумневрий” (*circumneurium*) [22]. Проблема изучения параневрия по ряду причин является очень актуальной и имеет высокую практическую значимость [22–25]. Во-первых, она связана с выяснением процессов, происходящих внутри и снаружи нервного ствола после хирургических вмешательств или интраневральных инъекций. Во врачебной практике важно изучать распространение местных анестетиков, используемых в анестезиологии, а также последствия непреднамеренных интраневральных инъекций [26]. Во-вторых, изменения, происходящие в параневрии, могут приводить к дегенеративным процессам в самом нервном стволе.

Все оболочки нерва и параневрий структурно и функционально связаны между собой. Средняя оболочка нервного ствола — периневрий, отличается рядом морфофункциональных особенностей, не свойственных другим оболочкам нерва.

### ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ПЕРИНЕВРИЯ

*Первые светоптические исследования.* Анализ результатов исследований строения нервных проводников и их оболочек, которые были выполнены в девятнадцатом веке и в более ранний период, приводится в ряде обзорных статей и монографий [17, 27–29]. Первые гистологические описания периневральной оболочки связаны с исследованиями нескольких ученых: немецким анатомом Фридрихом Густавом Якобом Генле (1809–1885), шведскими исследователями Эрнстом Акселем

Генриком Кеем (1832–1901) и Магнусом Густавом Ретциусом (1842–1919) и французским гистологом Луи Антуаном Ранвье (1835–1922). В разные годы в литературе можно было встретить различные названия периневральной оболочки, например, “слой Генле”, “оболочка Ранвье”, “нейротелий”, “перилемма” и др. Ранвье, исследуя три оболочки нервных проводников, назвал их следующим образом: внутривисочковая ткань, ламинарная оболочка и перифасцикулярная ткань. Термины “эндо-, пери- и эпиневральный”, которые используются в нейробиологии по сегодняшний день, были введены Кеєм и Ретциусом.

Исследования середины прошлого века, сделанные на нескольких видах позвоночных животных [15, 30], продемонстрировали, что периневральная оболочка окружает как общие нервные стволы, так и их отделы, нервные пучки периферических нервов. Было показано, что она состоит из уплощенных клеток, которые располагаются в несколько слоев. В те же годы было доказано, что оболочки нерва обладают барьерной функцией [27].

Периневральная оболочка нервов у разных животных имеет некоторые особенности. Она подробно изучена у рыб, находящихся на разных эволюционных уровнях: у хрящевых пластиножаберных (акула, *Ginglymostoma cirratum*) и у костных (*Danio rerio*). Установлено, что периневрий акулы состоит всего из трех слоев клеток [30]. У зебрании (*Danio rerio* или *Zebrafish*) периневральная оболочка обнаруживает структурное сходство с периневрием млекопитающих. На зебрании было показано, что в эмбриогенезе периневральные клетки-предшественники у личинок рыб мигрируют из вентрального отдела развивающегося спинного мозга [31, 32]. У земноводных, в частности, у лягушки в отличие от млекопитающих, для которых описано 4–5 слоев периневральных клеток [15], и человека, у которого число слоев составляет от 8 до 18 [10] (по некоторым данным — до двадцати), периневрий не является ламинарной структурой и состоит из двух слоев, окрашивающихся на гистологических препаратах по методу Маллори в разные цвета [27]. Морфология периневрия у птиц имеет сходство с периневрием у млекопитающих. Исследования седалищного нерва, проведенные на куриных эмбрионах и цыплятах, показали, что особенности периневрия, свойственные взрослой особи, формируется у цыплят в возрасте 10–20 сут [33]. Следует отметить, что в литературе отсутствуют работы, обобщающие данные об эволюционных закономерностях развития периневрия в филогенезе. Имеются лишь отдельные работы, посвященные сравнению структур параневрия (циркумневрия) у животных разных таксономических групп [24, 34].

*Исследование ультраструктуры клеток периневрия.* Более подробно структура периневральной оболочки у разных животных и человека была изучена с помощью применения электронной микроскопии и метода замораживания-скальвания [6, 7, 10, 18, 35]. Было установлено, что периневрий, окружающий нервный пучок, состоит из нескольких слоев уплощенных клеток, между которыми располагаются коллагеновые волокна соединительной ткани. Каждый слой представлен клетками полигональной формы, плотно связанными друг с другом специфическими контактами. Количество слоев периневральных клеток зависит от толщины пучка [17]. У человека в седалищном нерве число слоев периневральных клеток варьирует от 8 до 18 [10], а толщина периневральной оболочки достигает 20 мкм. Ламинарное строение периневрия, описанное ранее в работах, выполненных на светооптическом уровне, было подтверждено и детализировано в исследованиях, проведенных с применением электронной микроскопии. Было установлено, что каждый слой периневральных клеток с двух сторон окружен базальной мембраной. Между слоями периневральных клеток наряду с коллагеновыми (IV тип) волокнами (диаметром от 675 до 765 нанометров) присутствуют белки экстрацеллюлярного матрикса: фибронектин, ламинин, а также гликозаминогликаны [36, 37]. Ядра клеток периневрия, как правило, имеют уплощенную форму, как и сами клетки. Электронномикроскопические исследования периневральных клеток позволили выявить в их цитоплазме актин-содержащие структуры, имеющие сходство с актиновыми филаментами гладкомышечных клеток [18]. Функция этих структур в периневральных клетках не совсем ясна. Предположительно они обеспечивают сократительные свойства периневральной оболочки, служат для сохранения формы нервного пучка и позволяют ее менять при повреждении. Возможно также, что благодаря перистальтическим движениям клетки периневрия способствуют перемещению эндоневральной жидкости вдоль нервных пучков.

Между соседними периневральными клетками в пределах слоя базальные мембраны отсутствуют, клетки соединяются плотными контактами. Они образуются путем инвагинации выступов краевой части цитоплазмы соседних клеток, образуя связь по типу “замка” [7]. Исследования методом замораживания-скальвания продемонстрировали, что плотные контакты гораздо более распространены в периневрии, чем показывают исследования на ультратонких срезах [18]. Встречаются и редкие щелевые контакты, свидетельствующие о наличии активного диффузионного барьера. Показано, что такие контакты более характерны для ранних периодов онтогенеза, поэтому незрелые нервы оказываются более чувствительными к токсинам и инфекционным агентам [18]. Электронно-микро-

скопически во внешних слоях периневрия обнаруживаются интрацитоплазматические пиноцитозные везикулы и кавеолы [10, 18]. Периневральные клетки способны поглощать путем пиноцитоза и транспортировать из эндоневрального пространства различные вещества.

Между периневрием и эндоневрием располагается субпериневральное пространство, заполненное слабо базофильным гомогенным матриксом, в состав которого входят гликозаминогликаны [38]. В нем также содержатся тонкие коллагеновые волокна и кровеносные сосуды, участвующие в формировании эндоневрального кровеносного микроциркуляторного русла. Предположительно субпериневральное пространство обеспечивает гомеостаз и молекулярный транспорт [38].

Как отмечалось ранее, периневрий связан с паутинной (арахноидальной) оболочкой спинного мозга (СМ). По мере удаления нерва от оболочек спинного мозга в дистальном направлении увеличивается количество нервных пучков, и периневральная оболочка становится все тоньше. Ее окончание на дистальном конце зависит от типа волокна. В немиелинизированных волокнах периневрий исчезает в области нервных терминалей.

В миелиновых нервных волокнах эта оболочка заканчивается вблизи нервно-мышечных синапсов на расстоянии 1–1.5 мм [17]. Заканчиваясь вблизи нервных окончаний, периневрий постепенно изменяется. Он теряет базальные мембраны и плотные контакты, и нервные волокна оказываются окруженными только скоплением одиночных фибробластов.

В некоторых инкапсулированных сенсорных окончаниях периневральные клетки не исчезают, а входят в состав их капсул. Это характерно для телец Руффини и телец Фатера-Пачини, а также подобных им телец Тимофеева, которые встречаются в организме человека в поздний пренатальный и ранний постнатальный периоды [39]. Показано, что в инкапсулированных сенсорных окончаниях периневрий представлен сплошным внешним, но не внутренним слоем. Так, с помощью иммуногистохимического исследования доказано, что внешние слои капсулы тельца Пачини, действительно, являются производными периневральных клеток, тогда как клетки внутренних слоев экспрессируют белок S100<sup>+</sup> и Leu-7<sup>+</sup> и, следовательно, происходят из шванновских клеток [40].

Структура периневрия неоднородна. Pinã-Oviedo и Ortiz-Hidalgo [17] выделяют в нем три зоны: внутреннюю зону, которая отделена от эндоневрия субпериневральным пространством и образована одним слоем периневральных клеток, для которых характерны межклеточные соединения — интердигитации и плотные контакты; промежуточную зону, состоящую из нескольких слоев клеток (их количество зависит от размера нервного пучка, и ко-

леблется от 3 до 15 концентрических слоев (шириной от 5 до 20 мкм) и внешнюю зону, переходную между периневрием и эпиневрием. Третья зона имеет не слоистую структуру, а состоит из нескольких широких пучков коллагена, сходных с пучками коллагена в эпиневрии [17]. В современной отечественной гистологической номенклатуре выделены две части периневрия: “эпителиоидная часть (*pars epitheloidea*)” и “волоконистая часть (*pars fibrosa*)” [41].

*Особенности периневрия корешков спинного мозга и спинномозговых ганглиев.* Периневральная оболочка характерна не только для нервов, но и для корешков спинного мозга и ганглиев, где ее строение имеет ряд особенностей. Передний корешок спинного мозга сформирован из аксонов двигательных нейронов. Задний корешок состоит из отростков чувствительных нейронов, расположенных в спинномозговых ганглиях. Их оболочки защищают нервные волокна корешков только от химических и механических воздействий, но не от деформации и растяжения, поскольку недостаточно эластичны. В отличие от оболочек нерва, они также не подходят для наложения швов [42]. Область корешков СМ является переходной зоной между ПНС и ЦНС. Особенности перехода мозговых оболочек СМ в оболочки нервов до настоящего момента выяснены не полностью. Пограничная зона между ЦНС и ПНС также требует дальнейших исследований [43].

Вне субарахноидального пространства вентральные и дорзальные корешки СМ обладают тремя типичными оболочками, характерными для периферических нервов: эпиневрием, периневрием и эндоневрием. В области субарахноидального угла эпиневрий периферического нерва переходит в твердую мозговую оболочку спинного мозга (рис. 1, б). Эндоневрий остается неизменным до области контакта корешков со спинным мозгом. В области субарахноидального угла структура периневральной оболочки нерва претерпевает значительные изменения [44, 45]. В этой зоне внешняя часть периневральной оболочки нерва проходит между твердой мозговой оболочкой СМ и паутинной оболочкой СМ, и паутинная оболочка СМ сливается с наружными периневральными слоями корешков [42, 44, 45]. Внутренние же слои периневрия в составе оболочки корешков СМ достигают ЦНС. Электронно-микроскопическое исследование взаимного расположения оболочек нерва и оболочек спинного мозга [46] показало, что внутренние слои оболочки корешка напоминают периневрий нервного ствола. Внешняя же часть этой оболочки структурно напоминает паутинную, а в некоторых местах — мягкую, мозговую оболочку [42, 46]. Типичная оболочка корешка СМ крысы состоит из трех или четырех слоев уплощенных клеток, причем клетки внутренних слоев содержат большое количество пиноцитозных пузырьков и

цитоплазматических вакуолей. В отличие от периневрия нервного ствола в корешке спинного мозга базальные мембраны могут иметь прерывистую структуру [46]. В корешках вблизи спинного мозга периневральные клетки постепенно утрачивают базальную мембрану, уменьшается число коллагеновых волокон, клетки становятся похожими на клетки менинготелия, уплощенные клетки, образующие выстилки мозговых оболочек [7].

Взаимосвязь субарахноидального пространства с эндоневрием спинномозгового корешка и периферического нерва мало изучена. Ранее считалось, что клетки периневрия отделяют корешки СМ от субарахноидального пространства, и благодаря этому прямое сообщение между субарахноидальным пространством и эндоневрием отсутствует [47]. В настоящее время в исследованиях с применением различных трейсеров установлено, что спинномозговая жидкость (СМЖ) субарахноидального пространства распространяется вдоль всех нервов, и может транспортировать различные антигены [48]. Некоторые исследователи предполагают, что зона входа и выхода корешков СМ может являться местом контакта субарахноидального пространства с эндоневрием корешков и является местом контакта эндоневральной жидкости и СМЖ [49]. По-прежнему остается невыясненным вопрос о том, как осуществляется ток СМЖ: через периневральное пространство между слоями периневрия [33], через периневральное пространство между периневрием и эпиневрием [48, 50] или непосредственно через эндоневрий [49, 51].

Актуальность решения этого вопроса связана с проблемой проникновения патогенов в органы ЦНС. Исследования, выполненные на черепных и спинномозговых нервах, показали, что наряду с гематогенным путем проникновения существует периневральная инвазия ряда патогенов и патологических опухолевых клеток [52–55]. Считается также, что связь субпериневрального пространства со СМЖ субарахноидального пространства обеспечивает проникновение в головной и спинной мозг лекарственных препаратов.

Относительно капсулы вегетативных и спинномозговых ганглиев известно, что она состоит из двух частей. Внутренняя часть является эквивалентом периневрия периферических нервов, а внешняя представляет собой расширенный эпиневрий, содержащий коллагеновые волокна и фибробласты [56]. Экспериментальное применение трейсеров (пероксидазы хрена и ферритина) показало, что внутренняя часть оболочки верхнего шейного ганглия у крыс и мышей, состоящая из нескольких слоев периневральных клеток, формирует барьер, сходный с гемато-невральным барьером нерва [57]. При этом кровеносные сосуды ганглия оказываются более проницаемыми, чем эндоневральные сосуды нерва. Среди них встречаются фенестриро-

ванные капилляры. Показано, что пероксидаза хрена (но не крупные молекулы ферритина) проходит через такие сосуды и присутствует в периваскулярных макрофагах.

Согласно современным представлениям, каждый слой периневральных клеток чувствительных ганглиев, как и периневрий нервных проводников, ограничен базальными мембранами с обеих сторон, клетки каждого слоя имеют множество плотных контактов и десмосом и немногочисленные щелевые контакты [58]. Между клеточными слоями расположены внеклеточные пространства, содержащие коллаген. Периневрий спинномозговых ганглиев состоит из большего числа клеток, чем периневрий нерва. Например, у крысы, кошки, кролика в периневрии ганглия имеется 7–11 слоев клеток, в то время как в седалищном нерве — до 5. Кроме того, сами слои периневрия оказываются более толстыми, чем слои периневральных клеток в нерве [7].

*Исследование периневрия с применением иммуногистохимических маркеров.* Новый этап в изучении морфофункциональных особенностей периневрия начался с появлением современных иммуногистохимических методов исследования, которые позволяют идентифицировать разные типы клеток благодаря визуализации их специфических белковых молекул. В настоящее время для исследования структур периферической нервной системы (нервных сплетений, волокон, терминалей, нейронов и глиальных клеток) широко применяется множество нейрональных и глиальных маркеров [12, 59–61]. Число же иммуногистохимических маркеров для идентификации клеток периневрия невелико.

Имуногистохимические исследования показали, что клетки периневрия экспрессируют белок промежуточных филаментов соединительных тканей виментин, переносчик глюкозы-1 (GLUT-1), антиген эпителиальных мембран (EMA) и не содержат свойственный ШК белок S100 и маркеры нервных клеток — белки нейрофиламентов [17].

Как отмечалось ранее, перекрывающиеся полигональные клетки периневрия связаны плотными контактами. Специфические белки, входящие в состав этих контактов, и используются в качестве маркеров для периневральных клеток. Методом непрямой иммунофлуоресценции и иммуноэлектронной микроскопии показано, что в периневрии нерва млекопитающих и человека экспрессируются белки плотных контактов — клаудины, ZO-1 и окклюдин [62].

Клаудины — молекулы межклеточной адгезии, располагающиеся в области плотных клеточных контактов, участвуют в сохранении клеточного гомеостаза, в передаче межклеточных сигналов и в организации цитоскелета [63]. Клаудин-1 (Cldn1) экспрессируется в периферической и центральной нервной системе как основной белок гемато-

неврального барьера и гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). Исследования периферических нервов показали высокую экспрессию Cldn1 в периневрии периферических нервов, а также в насечках Шмидта-Лантермана и мезаксоне [64]. При повреждении седалищного нерва крысы путем наложения лигатуры экспрессия маркеров Cldn1, Cldn5 и других белков плотных контактов снижается [65]. С помощью внутривенного и локального введения азокрасителя синего Эванса (Evans blue) было установлено, что гемато-невральный барьер при этом нарушается, а его восстановление происходит только через неделю [65]. Отмечено, что при травме спинномозгового ганглия такой закономерности не наблюдается [66].

В нервной системе млекопитающих отмечены видовые отличия в наличии определенных клаудинов. Кроме того, с помощью применения ПЦР в реальном времени показано, что клаудин-11 экспрессируется в клетках центральной нервной системы, а клаудин-19 более специфичен для периферической нервной системы. Клаудин-19 идентифицирован в периневрии, а также — в ШК в области мезаксона [64, 67]. В спинномозговом ганглии этот белок присутствует в зоне концентрации отростков чувствительных нейронов [66]. Значение клаудинов очень велико: у нокаутных мышей с дефицитом клаудина-19 наблюдается нарушение нормальной проводимости седалищного нерва [64, 68].

Белок плотных контактов ZO-1, образующий комплексы с Cldn1, окклюдинами и цитоскелетным актином, является неотъемлемой частью гемато-неврального барьера и экспрессируется не только в периневрии, но и в стенках эндоневральных кровеносных сосудов. При иммуногистохимическом окрашивании на ZO-1 наблюдается отчетливый зигзагообразный узор, при невропатии четкость этого узора теряется [69]. В седалищном нерве мыши и человека описана экспрессия белка ZO-1 также в миелинизирующих шванновских клетках [64].

Окклюдин — интегральный белок с молекулярной массой 65 кДа, состоящий из четырех доменов. N-концевой и C-концевой участки молекулы окклюдина расположены на внешней поверхности цитоплазматической мембраны. Окклюдин выполняет регуляторную функцию и связан с другими белками плотных контактов [70]. Окклюдин экспрессируется в периневрии периферических нервов, в эндотелиальных клетках эндоневральных сосудов, а также в насечках Шмидта-Лантермана и мезаксоне миелинизирующих шванновских клеток [64]. Показана колокализация окклюдина с другим белком плотных контактов — трицеллулином [67].

Такие, свойственные клеткам периневрия структурные белки цитоскелета, как талин и винкулин участвуют в формировании контактов пери-

невральных клеток с другими клеточными элементами и межклеточным матриксом через интегриновые рецепторы. Установлено, что количество талина снижается в периневрии при диабете [71].

В иммуногистохимических исследованиях периневрия, наряду с маркерами клеточных контактов, используются белки межклеточного пространства. Как отмечалось ранее, между периневральными клетками располагаются базальные мембраны, в состав которых входит коллаген IV типа. Использование двойного маркирования с применением антител к коллагену IV типа и к Cldn1 (и другим белкам плотных контактов) позволило изучить эмбриональное развитие периневральных оболочек седалищного нерва человека [62]. Иммуногистохимическое выявление ламинина и белков-интегринов также используется в исследованиях периневральной оболочки [72]. Установлено, что в условиях культивирования *in vitro* все изоформы ламинина могут экспрессироваться как клетками периневрия, так и эндоневральными фибробластами. При этом отмечено, что в условиях *in vivo* эти типы клеток экспрессируют его разные изоформы: для периневрия характерны цепи A, B2 и S; для эндоневральных фибробластов – цепи B1, B2, M и S [17].

В качестве иммуногистохимического маркера клеток периневрия в сочетании с реакцией на окклюдин или ламинин применяли также реакцию на белок клеточных контактов коннексин 43 [73].

Некоторые авторы считают, что помимо Cldn1, лучшими маркерами периневрия являются EМА и GLUT-1 [17]. EМА принадлежит к гетерогенному семейству высокогликозилированных трансмембранных белков, которые первоначально были обнаружены на поверхности эпителиальных клеток молочной железы, и которые также присутствуют в клетках практически всех эпителиальных опухолей. Установлено, что этот белок содержится в цитоплазме клеток периневрия, паутинной и мягкой оболочек мозга в норме. Белок GLUT-1 относится к группе транспортеров глюкозы и обнаруживается во многих типах клеток. Показано, что GLUT-1 встречается во всех зонах периневрия, а также в эндотелии эндоневральных кровеносных сосудов. Распределение GLUT-1 изучали в ПНС и ЦНС молодых и старых животных в норме, используя иммуногистохимические методы, гибридизацию *in situ* и перфузию с применением синего Эванса [74]. Показано, что в ранние сроки после рождения GLUT-1 в периневрии не экспрессируется и появляется лишь у взрослых животных в периневральной оболочке нервов, спинномозговых корешков, в капсуле ганглиев задних корешков, а также в мягкой мозговой оболочке. Для человека отмечено, что на ранних стадиях онтогенеза в периневрии плода GLUT-1 отсутствует, и экспрессируется в достаточном количестве для визуализации с 22–

26-й недели беременности [75, 76]. После травмы нерва его количество уменьшается и восстанавливается в процессе регенерации [74, 77].

На сегодняшний день исследования с применением иммуногистохимического выявления описанных белков в ряду позвоночных выполнены, главным образом, на периневрии лабораторных животных (у крыс и мышей). Отсутствуют данные о наличии и особенностях маркеров клеток периневрия у представителей других видов животных.

Таким образом, исследование клеток периневрия с помощью применения классических гистологических методов окраски и электронной микроскопии показало их структурное сходство у разных позвоночных животных и человека. Отмечается усложнение структуры периневрия в ряду земноводные–млекопитающие, выражающееся в увеличении слоев периневральных клеток. В доступной литературе отсутствуют работы, посвященные другим закономерностям развития периневральной оболочки в филогенезе. Отсутствие таких работ может быть связано с тем, что до сих пор вопрос о принадлежности периневральных клеток к какому-то определенному типу ткани является дискуссионным. В 1876 г. Кей и Ретциус нашли сходство клеток, образующих оболочку, окружающую нервные пучки, с эндотелиальными и назвали их “эндотелиально-подобными”. Раньше, описав ламинарность периневрия, подчеркнул, что каждая его пластинка состоит из “фибрилярной стромы и эндотелия”. Действительно, структура клеток той части периневрия, которая непосредственно граничит с эндоневрием, имеет сходство с эндотелием микрососудов эндоневрия [78]. Наблюдается также сходство в структуре межклеточных соединений периневральных клеток и эндотелиоцитов. В то же время ламинарное строение периневрия и чередование между клетками плотных (*zonula occludens*) и адгезивных контактов (*zonula adherens*) характерны для эпителиальных тканей. В связи с этим в исследованиях, выполненных в середине прошлого века, периневрий относили к эпителиальным тканям [15], позднее, в 80-е годы, его называли “эпителиоморфной” структурой [7], а периневральные клетки “эпителиоидными клетками нейротелия” [79]. В исследованиях, выполненных *in vitro*, подчеркивается эпителиальный рост клеток периневрия [80]. Одни исследователи называют клетки периневрия модифицированными фибробластами [18, 81], другие – эпителиоидными миофибробластами [19]. В современных работах периневральные клетки нередко относят к клеткам периферической глии [75, 82–84]. Таким образом, вопрос о природе и происхождении клеток периневрия до сих пор обсуждается. Изучение развития периневрия в эмбриогенезе отчасти проливает свет на этот вопрос.

## РАЗВИТИЕ ПЕРИНЕВРИЯ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Развитие клеток периневрия в онтогенезе изучалось на эмбрионах птиц [33] и грызунов [7] и плодах человека [62, 72, 76, 85]. Показано, что на начальном этапе эмбрионального развития разделение нервных волокон на пучки осуществляется рыхло расположенными фибробластами. Позднее наблюдается созревание периневральной оболочки в нерве, т.е. формирование характерных плотных контактов между клетками и базальных мембран между слоями периневральных клеток. Этот процесс совпадает с началом миелинизации аксонов.

Электронно-микроскопические исследования, выполненные на крысах [7], показали, что на 10–11-е сутки пренатального развития вокруг эмбриональных закладок периферических нервов и спинномозговых ганглиев периневральные оболочки отсутствуют. На 15-е сутки эмбриогенеза, в период, когда растущие аксоны вступают во взаимоотношения с предшественниками ШК, на поверхности развивающихся нервов и ганглиев появляются уплощенные клетки. Вокруг них концентрируются коллагеновые волокна. На 18-е сутки развития, когда в развивающихся нервных стволах крысы появляются отдельные миелинизированные волокна, на периферии уже имеется 1–2 слоя предшественников периневральных клеток. Они имеют сильно уплощенную цитоплазму и ядро и соединяются между собой плотными контактами. Через 2–3 нед после рождения структура периневрия сходна с периневрием взрослых животных. Через месяц после рождения периневрий начинает выполнять барьерную функцию [86, 87].

Du Plessis и соавт. [33] при исследовании формирования периневрия у курицы выделили три фазы в его развитии. Ранний период, когда эмбриональный периневрий лишь начинает организовываться, второй период, включающий в себя дифференцировку и образование многослойной структуры, и третий — фаза созревания, которая связана с формированием барьера. Авторы подчеркивают, что дифференцировка периневрия происходит в период активной пролиферации нейролеммоцитов (шванновских клеток) и тесно связана с развитием комплексов аксон-нейролеммоцит. Проследив дифференцировку периневрия на всех стадиях развития курицы, авторы установили, что периневральные клетки имеют мезенхимальное происхождение, а не образуются из ШК, как предполагалось ранее. Было показано, что на дифференциацию клеток периневрия из клеток окружающей мезенхимы могут оказывать влияние факторы, выделяемые растущими аксонами и нейролеммоцитами. На 17-е сутки развития в периневрии образуются базальные мембраны, и на этом же сроке формируются кровеносные сосуды в области эндоневрия. Этот срок авторы считают нача-

лом формирования гемато-неврального барьера. Однако свойственная взрослому организму периневральная ламинарная структура и особенная ультраструктура периневральных клеток наблюдаются только у десятидневных цыплят.

Становление периневрия у эмбрионов и плодов человека изучали с использованием разных методов (электронной микроскопии, иммуногистохимии, вестерн-блоттинга) [62, 72, 76, 85]. Было установлено, что базальные мембраны в развивающемся седлищном и большеберцовом нерве формируются сначала вокруг шванновских клеток (уже на 11-й неделе) и только в период с 17-й по 35-ю неделю постепенно образуются вокруг периневральных клеток, плотные межклеточные контакты появляются в периневрии на 14-й неделе развития, экспрессия GLUT-1 — в период с 22-й по 26-ю неделю. Показано, что в период от 11-й до 35-й недели диаметр седлищного нерва плодов возрастает. Это объясняется увеличением диаметра пучков, что в свою очередь связано с началом миелинизации аксонов и увеличением количества эндоневрального внеклеточного матрикса. В эти сроки тонкие перегородки, отходящие от периневрия в эндоневральное пространство, подразделяют пучки на более мелкие. Ядра клеток периневрия в этот срок имеют уплощенную форму, сходную с ядрами периневральных клеток взрослых. По мере развития наблюдается постепенное увеличение количества слоев клеток в периневрии.

Исследование появления в эмбриогенезе седлищного нерва человека белков плотных контактов Cldn1 и Cldn3, ZO-1 и окклюдина [62] показало, что первым экспрессируется Cldn1, который уже на 11-й неделе плода идентифицируется в периневрии, образуя интенсивный точечный рисунок. Cldn3 и окклюдин показали более рассеянную точечную маркировку периневральной оболочки. ZO-1 очевидно определялся к 35-й неделе развития. Таким образом, в работах этих исследователей показано, что периневральная барьер в развивающихся периферических нервах созревает в эмбриогенезе достаточно поздно, в третьем триместре. В более ранний период барьер остается проницаемым.

Относительно происхождения клеток периневрия в эмбриогенезе в литературе нет единого мнения. В качестве источников развития периневрия приводятся клетки следующих эмбриональных зачатков: нервного гребня и эктомезенхимы, мезенхимы (мезодермы) и нервной трубки.

*Происхождение из клеток нервного гребня.* Первоначально считалось, что клетки периневрия имеют нейральное происхождение и образуются из клеток нервного гребня [29]. Нервный гребень в эмбриогенезе позвоночных животных формируется из дорзальной части нервной трубки. Нейральные стволовые клетки нервного гребня (NCSCs)

являются мультипотентными и дают начало многим нервным и ненервным структурам [88–90]. В настоящее время показано, что некоторые производные нервного гребня, например, предшественники ШК сохраняют свойство мультипотентности и после рождения и могут дифференцироваться в клетки не только нейральной, но и мезенхимной природы [91]. Относительно клеток периневрия нет полной ясности о возможности его происхождения из NCSCs. Так, Joseph и соавт. [92] изучали развитие периферического нерва, используя технологию Cre-Lox рекомбинации для отслеживания судьбы мигрирующих клеток. Они установили, что в развивающемся нерве из NCSCs дифференцируются, главным образом, шванновские клетки (более 75%) и фибробласты эндоневрия. Авторы подчеркивают, что ни клетки периневрия, ни перициты, ни эндотелиальные клетки не образуются из NCSCs. Однако в сводной таблице результатов исследования отмечено, что небольшая часть периневральных клеток (около 3%) в той его части, которая непосредственно прилежит к эндоневрию, может иметь происхождение из NCSCs.

Anderson и соавт. [83] для доказательства происхождения периневрия из клеток нервного гребня поставили оригинальные эксперименты с использованием трехмерной модели развивающегося нерва. Спинномозговые ганглии эмбрионов крысы культивировали в капиллярном альгинатном геле (Cargel™). Эксплантаты ганглиев, помещенные в Cargel, сохраняли жизнеспособность в течение 35 сут и состояли из нейронов и клеток-сателлитов. Аксоны клеток ганглия врастали в параллельные капилляры диаметром 30–50 мкм. На внутреннюю поверхность гелевых капилляров наносили ламинин — белок внеклеточного матрикса, способствующий росту аксонов. Аксоны чувствительных нейронов прорастали через капилляры на расстоянии 1 см в виде пучков. Исследование динамики формирования такого пучка позволило выявить, что наряду с аксонами и шванновскими клетками в капилляре формировались уплощенные клетки, располагающиеся по периферии пучка. С помощью иммуногистохимических методов было показано, что эти клетки содержали клаудин-1, маркер зрелого периневрия GLUT-1 и маркер базальных мембран — коллаген IV типа. По мнению авторов, поскольку культуры состояли только из эксплантата спинального ганглия, клетки которого имеют происхождение из нервного гребня, вполне вероятно, что, по крайней мере, некоторые клетки образованного периневрия в этой системе также происходят из клеток нервного гребня.

Известно, что из клеток нервного гребня образуется некоторая часть мезенхимы, которая называется эктомезенхимой. В некоторых зарубежных исследованиях ее называют мезоэктодермой [93, 94]. Из клеток эктомезенхимы образуются адипо-

циты, хондроциты, остециты, гладкомышечные клетки, перициты, кожные фибробласты лица и многие другие клеточные типы [95, 96]. Ранее считалось, что эктомезенхима дает начало оболочкам головного и спинного мозга, а также периневральной оболочке. В настоящее время установлено, что оболочка головного мозга происходит из клеток краниального отдела нервного гребня, в то время как оболочка спинного мозга имеют мезодермальное происхождение [43, 90]. Это свойство распространяется и на периневрий: часть его клеток образуется из эктомезенхимы (т.е. являются производными нервного гребня), а другая часть имеет мезодермальное происхождение.

*Происхождение из мезодермы.* О мезодермальном (мезенхимном) происхождении клеток периневрия свидетельствуют результаты исследований, выполненных *in vitro*. По данным некоторых авторов при длительном культивировании клетки периневрия приобретают морфологические особенности, присущие фибробластам, и становятся фибробластоподобными [97, 98]. Однако при сравнении периневральных клеток с фибробластами Kusenias [29] справедливо замечает, что они имеют значительные отличия от последних. Например, они окружены базальной мембраной с двух сторон, а фибробласты — лишь с одной. Кроме того, они соединяются друг с другом с помощью плотных контактов, образуя характерные слои, что не свойственно фибробластам ни в каких органах. Автор подчеркивает еще одну особенность клеток периневрия: одна единственная периневральная клетка может окружать маленький пучок аксонов, что не характерно для фибробластов. Тем не менее в оригинальных исследованиях [99], выполненных *in vitro*, показана тесная взаимосвязь фибробластов (точнее их предшественников) с периневральными клетками. При культивировании полученных из надкостницы черепа эмбриональных фибробластов совместно со шванновскими клетками и сенсорными нейронами [99] было установлено, что вокруг формирующихся в эксплантатах нервных пучков образуется оболочка, подобная периневрию. Задача авторов состояла в определении, из каких клеток этой культуры может формироваться периневрий: из ШК (производных нервного гребня) или из фибробластов (клеток мезодермальной природы). Для этого поочередно метили ретровирусом ШК и фибробласты. Было показано, что формирующиеся периневральные клетки содержали метку только в том случае, если предварительно мечеными были фибробласты, но не ШК. Следовательно, клетки периневрия в созданных условиях *in vitro* дифференцировались из фибробластов, а не из ШК или их предшественников.

Еще одним доказательством мезодермального происхождения клеток периневрия служат тельца Рено. Эти цилиндрические или округлые структуры, описанные французским врачом Жозефом Луи

Рено (1844–1917) еще в девятнадцатом веке, образуются из внутреннего слоя периневрия путем его инвагинации в эндоневрий [17, 100]. Тельца Рено встречаются в периферических нервах человека и животных (чаще у лошадей и ослов), и их число увеличивается при компрессионных и ряде других невропатий. В составе телец Рено содержатся типичные структурные компоненты соединительной ткани: фибробласты, гликозаминогликаны, базальные мембраны и эластические волокна. Иммуногистохимически доказано, что тельца Рено имеют положительную иммуногистохимическую реакцию на маркеры периневрия ЕМА и GLUT-1 и отрицательную реакцию на маркер ШК белок S100.

Доказательством мезодермального происхождения клеток периневрия могут служить результаты современных исследований по разработке новых технологий для стимуляции регенерации периферических нервных проводников с использованием стволовых клеток (нейтральных стволовых/прогениторных клеток, мезенхимных стволовых клеток, полученных из разных источников, стволовых клеток волосных фолликулов и др.) [см. обзоры: 101–103]. Используя разные способы оценки степени восстановления нерва (поведенческие тесты, электрофизиологические методы изучения проводимости, гистоморфометрический анализ), показано, что такая терапия, действительно, может способствовать регенерации нерва реципиента. Эти исследования имеют не только важное прикладное значение, но и позволяют выявить дифференцировочный потенциал пересаженных клеток, развивающихся в условиях измененного микроокружения. Некоторые исследователи в качестве экспериментальной клеточной терапии применяют стволовые клетки нервного гребня [104–106]. Установлено, что большинство пересаженных клеток дифференцируется в ШК и экспрессирует специфические для этих клеток маркеры (S100 $\beta$ , GFAP) [104, 105]. В некоторых работах показано, что часть пересаженных клеток нервного гребня могут дифференцироваться не только в S100 $\beta$ <sup>+</sup> шванновские клетки, но и в FSP1<sup>+</sup> фибробласты и CD31<sup>+</sup> эндотелиоциты растущих кровеносных сосудов [104]. При этом отсутствуют работы, в которых было бы показано, что из пересаженных стволовых клеток нервного гребня образуются клетки периневрия. При использовании же в качестве клеточной терапии поврежденного нерва мезенхимных стволовых клеток костного мозга показано, что часть из них способна мигрировать в периневрий крысы-реципиента и дифференцироваться в периневральные клетки [107, 108]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что хотя бы часть клеток периневрия может иметь мезодермальное происхождение.

*Происхождение из нейроэктодермы.* При исследовании миграции предшественников периневральных клеток в эмбриогенезе у рыб данио бы-

ло установлено, что эти клетки берут начало из вентральной области формирующегося спинного мозга и мигрируют на периферию вместе с ростом аксонов вентрального корешка [32, 109]. Установлено также, что миграцию и дальнейшую дифференцировку предшественников регулируют Notch-зависимые сигнальные пути [32].

Оказалось, что у рыбок данио периневрий двигательного нерва состоит из Nkx2.2a-содержащих клеток, производных ЦНС [31, 109]. Недавно это было еще раз подтверждено в работе, посвященной исследованию глиальных клеток зоны выхода двигательного нерва, выполненных с использованием трансгенной модели ZebraBow (Brainbow-конструкция, инструмент мультиспектральной маркировки клеток, разработанный для отслеживания и анализа клонов) [84]. На этой модели было доказано, что определенная популяция глиальных клеток нервных корешков СМ, которая происходит из Nkx2.2a<sup>+</sup> предшественников вентрального домена спинного мозга, в процессе эмбриогенеза мигрирует из ЦНС. Такая субпопуляция периферической глии центрального происхождения формирует периневрий вдоль двигательных нервов.

В настоящее время установлено, что не только у рыб, но и у млекопитающих часть периневральных клеток происходит из Nkx2.2-иммунопозитивных предшественников, располагающихся в эмбриональном спинном мозге [82]. С использованием трансгенных мышей было установлено, что на E15.5 Nkx2.2<sup>+</sup> клетки присутствуют в непосредственной близости к  $\alpha$ -тубулин-содержащим аксонам двигательных нейронов на периферии. Кроме того, отмечено, что у нокаутных мышей, лишенных Nkx2.2, наблюдаются дефекты периневрия. Было сделано заключение о том, что часть клеток периневрия вентрального корешка происходит из предшественников Nkx2.2<sup>+</sup>, располагающихся в вентральной области спинном мозге (вероятно, р3 домен предшественников). Происходящие из клеток ЦНС периневральные клетки покидают спинной мозг через формирующуюся зону выхода переднего корешка и объединяются со своими периферически-генерируемыми аналогами, образуя непрерывную оболочку вокруг двигательных нервов [43]. Важно отметить, что такие клетки характерны только для периневрия вентрального корешка аксонов мотонейронов, а происхождение периневральных клеток заднего корешка остается неизвестным [29].

Таким образом, периневрий является уникальной структурой, клетки которой могут происходить в онтогенезе из разных эмбриональных зачатков [29, 82, 83, 110]. Тем не менее у разных видов животных и человека периневрий и его составляющие имеют сходную структуру, что обусловлено выполнением этими клетками сходных функций.

## ФУНКЦИИ ПЕРИНЕВРИЯ

*Защитная функция.* Одной из функций оболочек нервов является механическая защита нервных волокон, поскольку нервные проводники постоянно подвергаются механическим нагрузкам из-за изменений положения тела, особенно конечностей. Структура нервов и их оболочек позволяет контролировать локальную среду нервных волокон и модулировать физические нагрузки [37]. Нервы обладают способностью выдерживать растяжение и сжатие, скольжение (экскурсию) и компрессию [111]. Изменения биомеханических свойств нервов изучали при разных условиях: при различном позиционировании конечностей, во время движений, в позднем онтогенезе, а также при патологии (сахарном диабете) [111]. Показано, что периневрий модулирует внешнее влияние, защищая нерв от механического повреждения, и обеспечивает его механическую прочность [17]. Это отражается на его структуре: наибольшая толщина периневральной оболочки (т.е. наибольшее число слоев клеток в ее составе) наблюдается у нервов, испытывающих наибольшую нагрузку, а также в местах разветвления нервных стволов [37]. Вероятно, одним из приспособлений к механическим нагрузкам, наблюдаемым при осуществлении движений и изменении положения тела, является ультраструктурное содержание в цитоплазме периневральных клеток сократительных филаментов и везикул [18, 112].

Периневрий выполняет также защитную иммунологическую функцию. Его клетки экспрессируют ряд белков-регуляторов системы комплемента. К ним относятся ингибиторы системы комплемента (C1INH и C4b-связывающий белок), ингибиторы мембраноатакующего комплекса комплемента (гликопротеин CD59) и фактор ускорения распада комплемента DAF [113, 114].

*Поддержание гомеостаза нерва.* Клетки периневрия, соединенные плотными контактами, и эндотелиоциты капилляров эндоневрия создают необходимую для функционирования нервных волокон окружающую среду и помогают поддерживать необходимое давление эндоневральной жидкости — 2–3 мм рт.ст. [17, 37]. При нарушении капилляров вследствие травмы наблюдается изменение давления эндоневральной жидкости, что ведет к гиперфузии, ишемии, повреждению шванновских клеток и аксонов. Удаление лишней жидкости происходит очень медленно, поскольку в эндоневрии отсутствуют лимфатические сосуды [37].

*Барьерная функция.* Гисто-гематические барьеры описаны в различных органах, к ним относятся гемато-энцефалический, гемато-офтальмический, гемато-тестикулярный и другие. В формировании гисто-гематических барьеров любого органа принимают участие клеточные и неклеточные составляющие: эндотелиоциты, перициты, базаль-

ные мембраны, перикапиллярное пространство, клетки самих органов [115]. Барьерная функция периневральной оболочки периферических нервных проводников была выявлена во второй половине прошлого века [30, 47, 116]. Гемато-невральный барьер, имеющий место в органах ЦНС, некоторые авторы называют также “blood-nerve interface” [49]. В настоящее время установлено, что главными компонентами гемато-неврального барьера в органах ЦНС являются внутренние слои периневрия, контролирующие поток элементов интерстициальной жидкости между эпиневрием и эндоневрием, и эндоневральные микрососуды, которые контролируют проникновение из кровотока в эндоневральное пространство ионов, растворенных питательных веществ, воды, макромолекул и лейкоцитов [19, 66]. Эндоневральное пространство простирается от спинномозгового корешка до периферических нервных окончаний и защищено от проникновения веществ, которые могут нарушать или блокировать нервную проводимость, а также от проникновения потенциальных канцерогенов [17].

Исследования степени проницаемости периневрального барьера с использованием ферритина [117] или пероксидазы хрена [118, 119] показали, что трейсерные молекулы не способны проникать через периневрий или достигают только наиболее поверхностного его слоя [118]. По мнению А.Р. Mizisin и А. Weerasuriya, высокая избирательность периневрального барьера связана с тем, что эта структура является многослойной [38]. Тем не менее по проницаемости нервно-тканевой барьер ЦНС уступает ГЭБ. Наиболее проницаемым периневральный барьер оказывается в области нервных окончаний, где может происходить проникновение относительно крупных молекул в аксоплазму, и в местах проникновения эпиневральных сосудов, проходящих через периневрий в эндоневрий [17, 38, 49]. Кроме того, барьер отсутствует в дорзальных корешках спинного мозга и в некоторых вегетативных ганглиях [17]. Отсутствие ламинарного периневрия, а следовательно и периневрального барьера, характерно для ганглиев нервных сплетений, располагающихся в стенках органов желудочно-кишечного тракта.

Актуальность исследования молекулярных механизмов регуляции проницаемости гемато-неврального барьера обусловлена тем, что его нарушение приводит к серьезным заболеваниям. Основное внимание ученых уделяется эндотелиальной составляющей гемато-неврального барьера. Показано, что плотные контакты между эндотелиоцитами кровеносных сосудов эндоневрия образованы такими же белками, как контакты между соседними периневральными клетками, это окклюдин, клаудин-5, белки ZO-1 и ZO-2 [120]. Исследования последних лет, проведенные на культурах эндотелиоцитов эндоневрия, позволили

идентифицировать 133 молекулы межклеточного соединительного комплекса эндотелиальных клеток эндоневрия человека. В условиях *in situ* в эндотелии эндоневральных микрососудов икроножного нерва человека идентифицированы такие белки, как катенин  $\alpha 1$  (CTNNA1), кадгерин-5 (CDH5), кадгерин-6 (CDH6), Cldn4, Cldn5, протокадгерин-1, везатин [121]. Используя конфокальную лазерную микроскопию, установлено, что Cldn4 связан с плотными контактами гемато-неврального барьера, CDH5 – с адгезивными контактами. Белки ZO-1 и Cldn5 идентифицируются как каркасные белки, которые связывают мембраны эндотелиальных клеток с цитоскелетом [19].

Современные данные, полученные в работах, выполненных на моделях *in vitro* и *in situ*, позволяют выдвинуть ряд гипотез о влиянии на проницаемость гемато-неврального барьера шванновских клеток, перицитов и других структурных элементов нервных проводников. Так, эндотелиальные клетки сосудов эндоневрия обладают рецепторами к ростовым и нейротрофическим факторам (глиальному нейротрофическому фактору (GDNF; GFR $\alpha 1$ ), фактору роста эндотелия сосудов, основному фактору роста фибробластов, трансформирующему фактору роста- $\beta$  [120], которые синтезируются клетками эндоневрия: нейролеммоцитами, перицитами, тучными клетками, фибробластами. Существует гипотеза о регуляции проницаемости гемато-неврального барьера синтезирующими GDNF шванновскими клетками через RET тирозинкиназа-митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK) путь [122], предполагается, что ШК, вырабатывая GDNF, оказывают влияние на формирование гемато-неврального барьера в период онтогенеза, GDNF также индуцирует специализацию периневральных клеток [19]. Функционирование гемато-неврального барьера обеспечивают белки-переносчики (509 транскриптов), среди них GLUT-1, переносчик монокарбоксилата-1, транспортер креатина и др. [120].

Для нормальной работы гемато-неврального барьера важен водный баланс эндоневрия, регуляцию которого осуществляют аквапорины – интегральные мембранные протеины, формирующие поры в мембранах клеток (AQP1, AQP3 и AQP11) [120]. Выработка AQP1 осуществляется не только эндотелиоцитами и перицитами, но и клетками периневральной оболочки. Отмечено участие в регуляции барьерной функции нерва иммунокомпетентных клеток, однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

При повреждении нервных проводников происходит нарушение гемато-неврального барьера и изменение функции эндотелиальных клеток микрососудов эндоневрия [66, 123]. Показано, что разрушение сосудистого барьера вызывает дисфункция сигнального пути Hedgehog уже через час по-

сле травмы, это приводит к изменению экспрессии Cldn5 и других молекул [124]. Moreau и соавт. [123], используя модель хронического сдавливания нерва, показали, что в нарушении гемато-неврального барьера также участвует сигнальный путь Wnt/b-катенин во взаимодействии с активацией toll-подобного рецептора 4 (TLR4). Установлено, что к хроническому нарушению гемато-неврального барьера после повреждения нерва приводит активация пути Wnt/b-катенин и торможение передачи сигналов Hedgehog в эндотелии микрососудов эндоневрия. Важно отметить, что нарушение проницаемости наблюдается до проникновения в поврежденный нерв макрофагов в процессе валлеровской дегенерации. Изменение синтеза белка адгезивных контактов кадгерина и одновременное подавление синтеза белков плотных контактов Cldn-1, Cldn-5 и окклюдина предшествуют инфльтрации иммунных клеток и токсичных молекул при локальном воспалении и развитии нейропатической боли.

*Метаболическая функция.* Периневрий является метаболически активной структурой [18, 62]. Большое количество базальных мембран в его составе обеспечивает высокую избирательность проникновения в эндоневрий из эпинеургия различных молекул [75]. Одним из способов транспортировки необходимых молекул через периневрий является транцитоз (эндо- и экзоцитоз в одной и той же клетке, характерен для клеток уплощенной формы, например, эндотелиоцитов [125]). Для доказательства факта прохождения макромолекул через периневральную оболочку путем транцитоза применяли методы автордиографии, электронной микроскопии и молекулярные трейсеры [62, 126, 127].

*Морфогенетическая функция.* В процессе эмбрионального развития клетки-предшественники формирующихся периферических нервов (предшественники нейронов, шванновских клеток, эндоневральных фибробластов и периневральных клеток) находятся в тесных взаимоотношениях. Показано, что на развитие и дифференцировку периневрия в эмбриогенезе оказывают влияние ШК. Установлено, что дифференциация клеток периневрия, формирование характерной для него ламинарной структуры, образование гемато-неврального барьера обусловлены сигнальной молекулой “desert hedgehog” (Dhh), которая экспрессируется шванновскими клетками [128, 129]. Оказалось, что клетки периневрия в свою очередь тоже влияют на развитие и функционирование ШК. Показано, что генетическое удаление периневральных клеток на ранней стадии развития приводит к затруднению в развитии ШК и к дефектам двигательных нервов [109]. Взаимодействие периневральных клеток со ШК на разных этапах развития двигательных нервов продемонстрировано на нокаутных животных с нарушением сигналов Notch [32, 82]. Установлено, что клетки периневрия необходимы не только

для выживания и дифференцировки ШК, но и для осуществления ими миелинизации аксонов [32].

Морфогенетическая функция периневрия в онтогенезе проявляется также в период выхода аксонов развивающихся мотонейронов на периферию [31]. На границе между ЦНС и ПНС клетки периневрия выполняют функции, сходные с клетками пограничной “шапочки” (boundary caps cells): они препятствуют миграции тел предшественников мотонейронов за пределы ЦНС, контролируют барьер, участвуют в регуляции направленности аксонов [82, 130].

*Участие в регенерации нерва.* Как отмечалось ранее, структурные изменения периферических нервных проводников при репаративной регенерации впервые описаны в классических нейробиологических исследованиях А. Валлера и С. Рамон-и-Кахалы. Позднее с помощью электронной микроскопии были выяснены ультраструктурные особенности изменений, происходящих в нервных проводниках после повреждения. Большое число исследований показало, что неотъемлемыми участниками процессов дегенерации и восстановления нервных волокон являются ШК, которые после травмы подвергаются дедифференцировке, пролиферируют, вырабатывают ростовые факторы, белки внеклеточного матрикса и цитокины, обеспечивая рост регенерирующих аксонов [см. обзоры: 2, 11, 131, 132]. Меньше внимания уделяется реакции на повреждение нерва клеток периневрия.

На модели повреждения большеберцового нерва кролика показано, что клетки периневрия в ответ на повреждение отделяются друг от друга и от своих базальных мембран и приобретают морфологию фибробластов. Затем они окружают маленькие пучки регенерирующих аксонов, восстанавливая свою структуру [81].

При изучении периневрия в дистальном сегменте диафрагмального нерва мыши после сдавливания было показано, что в первую неделю после повреждения (в период валлеровской дегенерации) часть периневральных клеток выглядела гипертрофированной [33]. Многие клетки пролиферировали, фигуры митозов наблюдались в течение одной недели. В цитоплазме периневральных клетках определялись внутриклеточные микрополости, что связано с увеличением пиноцитозных пузырьков. Ближайшие к эндоневрию периневральные клетки содержали липидные капли, количество которых со временем увеличивалось.

Для изучения реакции периневрия на травму нерва была разработана удобная модель, называемая “периневральным окном” [134]. Эта модель позволяет исследовать реакцию нерва на ограниченное периневральное повреждение, которое приводит к демиелинизации близлежащих нерв-

ных волокон и к нарушению проводимости нерва [47]. Имеются данные о том, что на регенеративные потенции периневрия влияет микроокружение: так, при трансплантации сегмента нерва в поврежденный спинномозговой корешок, периневрий не регенерирует, в то время, как при трансплантации сегмента корешка в нерв наблюдается его регенерация [47, 135].

В исследованиях последних лет на модели лазерной аксотомии нерва у зебрафиш показано, что одними из первых (наряду со ШК) клетками, реагирующими на повреждение, оказываются клетки периневрия. Они образуют “мост”, соединяющий проксимальный и дистальный сегменты нервного ствола еще до начала фрагментации аксонов в дистальном конце [29, 136].

По современным данным репаративная регенерация периневрия связана с белками межклеточных соединений, количество которых снижается после травмы, наблюдается подавление синтеза Cldn1, Cldn5, ZO-1 и других белков клеточных контактов [66, 137]. Показано, что через 7 сут после травмы нерва восстанавливается иммунореактивность к окклюдину и ZO-1. Только через 21 сут наблюдается восстановление иммунореактивности к коннексину 43. Отмечено, что восстановление щелевых соединений задерживается по сравнению с восстановлением плотных контактов [137].

Исследование молекулярных механизмов регенерации нервов показало, что несмотря на то, что периневральные клетки во время онтогенетического развития нервов активно используют передачу сигналов Notch, этот механизм отсутствует при репаративной регенерации [32].

Регенеративный потенциал периневральных клеток можно проследить при анализе работ, выполненных на клиническом материале патологии нерва. Показано, что клетки периневрия способны пролиферировать и образовывать доброкачественные и злокачественные опухоли (периневриомы) [17, 138]. Кроме того, они входят в состав таких гетерогенных опухолей, как нейрофибромы, шванномы и злокачественные опухоли оболочек нерва. Для идентификации периневральных клеток в нейрофибромах, в состав которых входят также ШК и фибробласты, применяют иммуногистохимическое выявление Cldn1, EMA, GLUT-1 и других маркеров периневрия [139, 140]. Установлено, что в нейрофибромах локализация клеток периневрия не является случайной, периневрий формируется вокруг рудиментарных нервных пучков [139]. Это свидетельствует о том, что как и в онтогенезе, образование периневральных клеток происходит под влиянием формирующихся нервных волокон и окружающих их ШК. Предполагается, что при нейрофиброматозе-1 нарушение клеточных контактов между периневральными клетками приводит к нарушению их барьерной функции и проник-

новению из окружающих тканей в периневрий факторов роста и цитокинов, которые стимулируют пролиферацию и опухолевый рост клеток периневрия [139].

**Фагоцитарная функция.** Фагоцитоз является важнейшим клеточным процессом для периферических нервных проводников после их повреждения. В ответ на травму в дистальном сегменте нерва наблюдаются процессы валлеровской дегенерации, включающие в себя разрушение аксонов и их миелиновых оболочек. Для осуществления последующей регенерации нервных волокон необходимо очищение эндоневрия от продуктов распада аксонов и миелина, которое осуществляется, главным образом, макрофагами гематогенного происхождения [141]. Кроме того, в процессе фагоцитирования продуктов распада миелина участвуют резидентные макрофаги и ШК [11, 142]. В отдельных работах было показано, что клетки периневрия также могут принимать участие в этом процессе [136, 141, 143]. Это демонстрируют результаты исследований, выполненных на разных экспериментальных моделях (при холодом поражении, введении ЛПС, передавливании нерва зажимом и др.) [143]. Высказываются предположения о трансформации клеток периневрия в макрофаги при их участии в фагоцитозе [7]. В работах, выполненных с помощью электронной микроскопии, на некоторых электронограммах, приводимых авторами, можно видеть клетки периневрия с характерными для фагоцитирующих клеток вакуолями [141] и липидными каплями [143] в цитоплазме. Правда, есть предположение, что это могут быть мигрирующие при повреждении нерва из эндоневрия в эпиневррий, макрофаги [18]. Вопрос о фагоцитарной функции периневриальных клеток требует дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая обзорная статья охватывает круг вопросов, связанных с особенностями одной из оболочек нервных стволов – периневриальной. В обзоре обобщены имеющиеся в литературе данные о структуре и функциях клеток периневрия, об их происхождении в фило- и онтогенезе, реакции на повреждение, возможные способы идентификации этих клеток с помощью иммуногистохимических реакций. Анализ имеющейся научной литературы показал, что несмотря на то, что оболочки нерва исследуются в течение нескольких десятилетий, многие вопросы, касающиеся структурных и функциональных особенностей периневрия, по-прежнему, остаются нерешенными. Так, имеется недостаточная информация об эволюционных закономерностях развития периневрия. Показано, что в ряду позвоночных животных периневриальная оболочка является универсальной структурой, свойственной любым нервам. В ряду земновод-

ные–млекопитающие наблюдается усложнение ее структуры, что выражается в увеличении слоев периневриальных клеток. Электронно-микроскопически показано, что ультраструктурные особенности периневриальной оболочки сходны у представителей разных видов. При этом исследования периневриальной оболочки с применением современных иммуногистохимических методов осуществлены лишь у человека и лабораторных животных, и практически не проводились у представителей других видов. Вероятно, это связано с тем, что селективные иммуногистохимические маркеры, свойственные только клеткам периневрия, не найдены. Большинство антигенов, с помощью которых проводится иммуногистохимическая идентификация периневриальных клеток, являются белками плотных контактов.

Углубленные исследования структуры периневрия с применением современных методов и с использованием экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo* позволили расширить представление о периневрии как о защитной оболочке и прояснить некоторые регуляторные механизмы гемато-невриального барьера. При анализе имеющихся в литературе данных выяснилось, что клетки периневрия осуществляют не только механическую и барьерную функции, но и иммунологическую защиту нерва, принимают участие в регуляции метаболических процессов, играют важную морфогенетическую роль в раннем онтогенезе, а также принимают активное участие в репаративной регенерации нервных проводников.

В настоящем обзоре представлены имеющиеся в современной литературе данные о морфофункциональных особенностях клеток периневриальной оболочки корешков спинного мозга и ганглиев в сравнении с периневрием нервного ствола. Проанализированы доказательства о происхождении клеток периневрия в онтогенезе из различных эмбриональных зачатков. На разных экспериментальных моделях было показано, что периневрий в эмбриогенезе может происходить из клеток нервного гребня, мезодермы и нейроэктодермы. Долгое время вопрос о происхождении периневрия считался дискуссионным и противоречивым. Сегодня многие исследователи пришли к заключению, что периневрий – уникальная структура, состоящая из клеток, сходных структурно и функционально, но имеющих разное происхождение. Пока неясно, от чего зависит, из какого эмбрионального зачатка образуется периневрий разных нервов, корешков и ганглиев, и имеются ли отличительные особенности гистобластических потенциалов клеток, формирующихся из разных зачатков. Опубликованные данные за последние несколько лет свидетельствуют о том, что клетки периневрия вентральных корешков образуются из нейроэктодермы и могут, в связи с этим, относиться к периферической глии. При этом отсутствуют представления об источнике

происхождения периневральных клеток дорзального корешка. Дальнейшие исследования, направленные на выяснение особенностей происхождения этих клеток у млекопитающих и человека, могут привести к пересмотру представлений о происхождении периферической глии. Проанализировав имеющиеся в литературе доказательства происхождения клеток периневрия из разных эмбриональных зачатков, можно заключить, что периневрий состоит из разных популяций клеток. Все изложенное свидетельствует о необходимости продолжения углубленных исследований в этом направлении.

Одной из наиболее важных функций периневрия является его участие в формировании гемато-неврального барьера. Наряду с эндотелиоцитами микрососудов эндоневрия периневрий участвует в создании микросреды, благоприятной для роста и развития нервных волокон, и в сохранении эндоневрального гомеостаза. В настоящее время имеется недостаточно сведений о молекулярных механизмах регуляции этого барьера. Практически отсутствуют данные о формировании гемато-неврального барьера у представителей разных видов животных. Возможно, сравнительное исследование молекулярных механизмов регуляции гемато-неврального барьера в будущем позволит выявить совершенствование механизмов функционирования этого барьера в эволюции.

Следует отметить, что изучение гемато-неврального барьера имеет важное практическое значение. Показано, что нарушение барьерной функции предвещает развитие травматических и метаболических невропатий, а также опухолей. В связи с этим понимание молекулярных механизмов регуляции гемато-неврального барьера будет способствовать дальнейшим разработкам новых терапевтических подходов для лечения хронических периферических невропатий и невропатической боли.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась из средств государственного задания ФГБНУ ИЭМ.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы информируют об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Е.С.П. — идея работы, участие в подготовке части текста обзора, Е.А.К. — участие в подготовке части текста обзора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Берснев ВП, Хамзаев РИ, Борода ЮИ* (2009) Результаты эпиневрального шва седалищного нерва. Вестник хирургии им. И.И. Грекова 168 (1): 61–63 [Bersnev VP, Hamzaev RI, Boroda JuI (2009) Rezul'taty jepinevral'nogo shva sedalishhnogo nerva. Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova 168 (1): 61–63 (In Russ)].
2. *Щаницын ИН, Иванов АН, Бажанов СП, Нинель ВГ, Пучиньян ДМ, Норкин ИА* (2017) Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы. Успехи физиол наук 48 (3): 92–112 [Shchanitsyn IN, Ivanov AN, Bazhanov SP, Ninel VG, Puchin'jan DM, Norkin IA (2017) Stimulation of peripheral nerve regeneration: current status, problems and perspectives. Uspekhi fiziologicheskikh nauk 48 (3): 92–112 (In Russ)].
3. *Shchudlo NA, Borisova IV, Shchudlo MM* (2013) Morphometric assessment of the effectiveness of post-traumatic regeneration of peripheral nerves using single and repeated courses of electrostimulation. Neurosci and Behav Physiol 43 (9): 1097–1101. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9855-4>
4. *Литвиненко ИВ, Одинак ММ, Живолупов СА, Булатов АР, Рашидов НА, Бардаков СН* (2018) Клинико-инструментальные характеристики травматических поражений периферических нервов конечностей. Вестник Рос Военно-мед акад 3 (63): 50–56 [Litvinenko IV, Odinak MM, Zhivolupov SA, Bulatov AR, Rashidov NA, Bardakov SN (2018) Clinical and instrumental characteristics of traumatic lesions of peripheral nerves of limbs. Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii 3 (63): 50–56 (In Russ)].
5. *Ништ АЮ, Чирский ВС, Фомин НФ* (2019) Морфологические основы восстановления двигательной иннервации при травмах периферических нервов. Журн анатомии и гистопатол 8 (4): 66–73 [Nisht AYU, Chirskii VS, Fomin NF. (2019) Morphological foundations of restoration of motor innervation in injuries of peripheral nerves. J Anatomy and Histopathology 8 (4): 66–73 (In Russ)]. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-4-66-73>
6. *Pannese E* (1981) The satellite cells of the sensory ganglia. Adv Anat Embryol Cell Biol 65: 1–111. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-67750-2>
7. *Ноздрачев АД, Чумасов ЕИ* (1999) Периферическая нервная система. СПб: Наука [Nozdrachev AD, Chumasov EI (1999) Perifericheskaja nervnaja sistema. SPb: Nauka (In Russ)].
8. *Чельшев ЮА, Сaitкулов КИ* (2000) Развитие, фенотипическая характеристика и коммуникации шванновских клеток. Успехи физиол наук 31 (3): 54–69 [Chelyshev Yu.A., Saitkulov K.I. Development, phenotypic characteristics and communication of Schwann cells (2000) Uspekhi fiziologicheskikh nauk 31 (3): 54–69 (In Russ)].
9. *Zochodne DW* (2008) Neurobiology of peripheral nerve regeneration. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, Sao Paulo: Cambridge University Press.
10. *Reina MA, Arriazu R, Collier CB, Sala-Blanch X, Izquierdo L, de Andrés J* (2013) Electron microscopy of human peripheral nerves of clinical relevance to the practice of nerve blocks. A structural and ultrastructural review

- based on original experimental and laboratory data. *Rev. Esp Anestesiol Reanim* 60 (10): 552–562.  
<https://doi.org/10.1016/j.redar.2013.06.006>
11. *Petrova ES* (2019) Current views on Schwann cells: development, plasticity, functions. *J Evol Biochem Phys* 55: 433–447.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060012>
  12. *Чумасов ЕИ, Колос ЕА, Петрова ЕС, Коржевский ДЭ* (2020) Иммуноморфология периферической нервной системы. СПб: СпецЛит [Chumasov EI, Kolos EA, Petrova ES, Korzhevskij DE (2020) Immunomorfologiya perifericheskoy nervnoy sistemy. SPb: SpecLit (In Russ)]
  13. *Bhatheja K, Field J* (2006) Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1995–1999.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.007>
  14. *Salzer JL* (2015) Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 7 (8): a020529.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020529>
  15. *Shanthaveerappa TR, Bourne GH* (1966) Perineural epithelium: a new concept of its role in the integrity of the peripheral nervous system. *Science* 154 (3755): 1464–1467.
  16. *Kundalić B, Ugrenović S, Jovanović I, Stefanović N, Petrović V, Kundalić J, Stojanović V, Živković V, Antić V* (2014) Morphometric analysis of connective tissue sheaths of sural nerve in diabetic and nondiabetic patients. *Biomed Res Int*: 870930.  
<https://doi.org/10.1155/2014/870930>
  17. *Pinã-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C* (2008) The normal and neoplastic perineurium. A review *Adv Anat Pathol* 15:147–164.  
<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31816f8519>
  18. *Berthold C-H, Fraher JP, King RHM, Rydmark M* (2005) Microscopic anatomy of the peripheral nervous system, in *Peripheral Neuropathy*, PJ Dyck and PK Thomas Eds, Elsevier Health Sciences: 35–91.
  19. *Ubogu EE* (2020) Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. *Exp Neurol* 328: 113272.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113272>
  20. *Barros CS, Franco SJ, Müller U* (2011) Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (1): a005108.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005108>
  21. *Bove GM, Light AR* (1995) Calcitonin Gene-Related peptide and peripherin immunoreactivity in nerve sheaths. *Somatosensory and Motor Research* 12 (1): 49–57.  
<https://doi.org/10.3109/08990229509063141>
  22. *Reina MA, Boezaart AP, Tubbs RS, Zsimevich Y, Fernandez-Domínguez M, Fernández P, Sala-Blanch X* (2019) Another (internal) epineurium: beyond the anatomical barriers of nerves. *Clin Anat* 33 (2): 199–206.  
<https://doi.org/10.1002/ca.23442>
  23. *Sala-Blanch X, Reina MA, Ribalta T, Prats-Galino A* (2013) Sciatic nerve structure and nomenclature: epineurium to paraneurium: is this a new paradigm? *Reg Anesth Pain Med* 38 (5): 463–465.  
<https://doi.org/10.1097/AAP.0b013e3182a1b6c5>
  24. *Затолокина МА* (2016) Морфогенез изменений параневральных соединительнотканых структур периферических нервов в эволюционном аспекте. Курск: КГМУ [Zatolokina M.A. (2016) Morfogenez izmenenij paranevral'nyh soedinitel'notkannyh struktur perifericheskikh nervov v jevoljucionnom aspekte. Kursk: KGMU (In Russ)].
  25. *Murthy NK, Spinner RJ* (2020) Letter to the editor: the paraneurium (circumneurium) and its clinical implications with benign and malignant nerve lesions. *Clin Anat*. Online ahead of print.  
<https://doi.org/10.1002/ca.23639>
  26. *Reina MA, Boezaart A, Nin OC, Zsimevich Y, Sala-Blanch X* (2020) Yet another perineural layer: so what? *Reg Anesth Pain Med* 45 (6):483–484.  
<https://doi.org/10.1136/rapm-2019-100765>
  27. *Krnjevic K* (1954) The connective tissue of the frog sciatic nerve. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 39 (1): 55–72.  
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1954.sp001048>
  28. *Marani E, Lakke EAJF* *Peripheral Nervous System* In: JK Mai and G Paxinos *The human nervous system*. Elsevier, Amsterdam 2012: 82–140
  29. *Kucenas S* (2015) Perineurial glia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (6): a020511.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020511>
  30. *Shanthaveerappa TR, Bourne GH* (1963) Demonstration of perineural epithelium in whale and shark peripheral nerves. *Nature* 197: 702–703.  
<https://doi.org/10.1038/197702a0>
  31. *Kucenas S, Takada N, Park HC, Woodruff E, Broadie K, Appel B* (2008) CNS-derived glia ensheath peripheral nerves and mediate motor root development. *Nat Neurosci* 11:143–151.  
<https://doi.org/10.1038/nn2025>
  32. *Binari LA, Lewis GM, Kucenas S* (2013) Perineurial glia require Notch signaling during motor nerve development but not regeneration. *J Neurosci* 33 (10):4241–4252.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4893-12.2013>
  33. *Du Plessis DG, Mouton YM, Muller CJ, Geiger DHJ* (1996) An ultrastructural study of the development of the chicken perineurial sheath. *Anat*: 189 (Pt 3): 631–641.
  34. *Server A, Reina MA, Boezaart AP, Prats-Galino A, Esteves Coelho M, Sala-Blanch X* (2018) Microanatomical nerve architecture of 6 mammalian species: Is trans-species translational anatomic extrapolation valid? *Reg Anesth Pain Med* 43 (5):496–501.  
<https://doi.org/10.1097/AAP.0000000000000772>
  35. *Чумасов ЕИ* (1975) О структуре периневрия периферической нервной системы. *Арх анатомии гистологии и эмбриологии* 68 (4): 29–34 [Chumasov EI (1975) On the structure of the perineurium of the peripheral nervous system. *Arch of Anatomy, Histology and Embryology* 68 (4): 29–34 (In Russ)].
  36. *Takebe K, Nio-Kobayashi Y, Takashi-Iwanaga H, Iwanaga T* (2006) Histochemical demonstration of a monocarboxylate transporter in the mouse perineurium with special reference to GLUT1. *Biomedical Res* 29 (6): 297–306.  
<https://doi.org/10.2220/biomedres.29.297>
  37. *Topp KS, Boyd BS* (2012) Peripheral nerve: from the microscopic functional unit of the axon to the biomechanically loaded macroscopic structure. *J Hand Ther* 25 (2): 142–151; quiz 152.  
<https://doi.org/10.1016/j.jht.2011.09.002>

38. Должиков АА, Должикова ИИ (2018) Периневрий периферических нервов: фундаментальные и прикладные вопросы его морфологии и функций. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук 9: 54–62. [Dolzhiikov AA, Dolzhikova IN (2018) Perinevrij perifericheskikh nervov: fundamental'nye i prikladnye voprosy ego morfologii i funkcij. Aktual'nye problemy gumanitarnyh i estestvennyh nauk 9: 54–62 (In Russ)].
39. Dixon JS, Jen PY, Gosling JA (1998) Immunohistochemical characteristics of human paraganglion cells and sensory corpuscles associated with the urinary bladder. A developmental study in the male fetus, neonate and infant. *J Anat* 192 (3): 407–415. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19230407.x>
40. Vega JA, Del Valle ME, Haro JJ, Naves FJ, Calzada B, Uribe-larrea R (1994) The inner-core, outer-core and capsule cells of the human Pacinian corpuscles: an immunohistochemical study. *Eur J Morphol* 32 (1): 11–18.
41. Terminologia histological. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов (2009) Под ред. ВВ Банина, ВЛ Быкова. М.: ГЭОТАР-Медиа [Terminologia histological. Mezhdunarodnye terminy po citologii i gistologii cheloveka s oficial'nym spiskom russkikh ekvivalentov (2009) Pod red. VV Banina, VL Bykova. M.: GEOTAR-Media (In Russ)].
42. Matejíček V, Haviarová Z, Kuruc R, Šteňo A, Šteňo J (2019) The composition and structure of peripheral nerves. In: *Intraspinal Variations of Nerve Roots*. Springer, Cham: 3–13.
43. Suter TACS, Jaworski A (2019) Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system. *Science* 365 (6456): eaaw8231. <https://doi.org/10.1126/science.aaw8231>
44. Andres KH (1967) On the fine structure of the arachnoidea and dura mater of mammals. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 79 (2): 272–295.
45. McCabe JS, Low FN (1969) The subarachnoid angle: an area of transition in peripheral nerve. *Anat Rec* 164 (1): 15–33. <https://doi.org/10.1002/ar.1091640102>
46. Haller FR, Low FN (1971) The fine structure of the peripheral nerve root sheath in the subarachnoid space in the rat and other laboratory animals. *Am J Anat* 131 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1002/aja.1001310102>
47. Умовист МН, Чайковский ЮБ Современные представления о строении и функции оболочек нерва (1987) Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1: 98–96 [Umovist MN, Tchaikovskiy YB Modern concepts of the structure and function of the nerve sheaths (1987) Archive of anatomy, histology and embryology 1: 98–96 (In Russ)].
48. Bechter K, Schmitz B (2014) Cerebrospinal fluid outflow along lumbar nerves and possible relevance for pain research: case report and review. *Croat Med J* 55 (4): 399–404. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.399>
49. Mizisin AP, Weerasuriya A (2011) Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol* 121 (3): 291–312. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0783-x>
50. Pettersson CA (1993) Sheaths of the spinal nerve roots. Permeability and structural characteristics of dorsal and ventral spinal nerve roots of the rat. *Acta Neuropathol* 85 (2): 129–137. <https://doi.org/10.1007/BF00227759>
51. Zakharov A, Papaiconomou C, Djenic J, Midha R, Johnston M (2003) Lymphatic cerebrospinal fluid absorption pathways in neonatal sheep revealed by subarachnoid injection of Microfil. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29 (6): 563–573. <https://doi.org/10.1046/j.0305-1846.2003.00508.x>
52. Frater JL, Hall GS, Procop GW (2001) Histologic features of zygomycosis: emphasis on perineural invasion and fungal morphology. *Arch Pathol Lab Med* 125 (3): 375–378. [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2001\)125<0375:HFOZ>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2001)125<0375:HFOZ>2.0.CO;2)
53. Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St John JA, Ekberg JA, Batzloff M, Ulett GC, Beacham IR (2014) Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clin Microbiol Rev* 27 (4): 691–726. <https://doi.org/10.1128/CMR.00118-13>
54. Schmitt M, Neubauer A, Greiner J, Xu X, Barth TF, Bechter K (2011) Spreading of acute myeloid leukemia cells by trafficking along the peripheral outflow pathway of cerebrospinal fluid. *Anticancer Res* 31 (6): 2343–2345.
55. Brown IS (2016) Pathology of perineural spread. *J Neurol Surg B Skull Base* 77 (2): 124–130. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571837>
56. Reale E, Luciano L, Spitznas M (1976) Freeze-fracture aspects of the perineurium of spinal ganglia. *J Neurocytol* 5: 385–394. <https://doi.org/10.1007/BF01181646>
57. Arvidson B (1979) A study of the perineurial diffusion barrier of a peripheral ganglion. *Acta Neuropathol* 46 (1-2): 139–144. <https://doi.org/10.1007/BF00684815>
58. Weerasuriya A, Mizisin AP (2011) The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 686: 149–173. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_6)
59. Masliukov PM, Emanuilov AI, Madaliev LV, Moiseev KY, Bulibin AV, Korzina MB, Porseva VV, Korobkin AA, Smirnova VP (2014) Development of nNOS-positive neurons in the rat sensory and sympathetic ganglia. *Neuroscience* 256: 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.013>
60. Nikolaev SI, Gallyamov AR, Mamin GV, Chelyshev YuA (2014) Poly (ε-caprolactone) nerve conduit and local delivery of VEGF and FGF2 genes stimulate neuroregeneration. *Bull Exp. Biol Med* 157 (1): 155–158. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2513-1>
61. Емануїлов АІ, Маслюков ПМ, Ноздрачев АД (2019) Симпатическая иннервация сердца в раннем постнатальном онтогенезе. *Рос физиол журнал им. И.М. Сеченова* 105 (9): 1133–1141. [Emanuylov AI, Maslyukov PM, Nozdryachev AD (2019) Sympathetic innervation of the heart in early postnatal ontogenesis.

- Russian Journal of Physiology 105 (9): 1133–1141 (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S086981391909005X>
62. *Pummi KP, Heape AM, Grenman RA, Peltonen JT, Peltonen SA* (2004) Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem* 52 (8): 1037–1046.  
<https://doi.org/10.1369/jhc.3A6217.2004>
  63. *Tsukita S, Tanaka H, Tamura A* (2019) The claudins: from tight junctions to biological systems. *Trends Biochem Sci* 44 (2): 141–152.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.008>
  64. *Alanne MH, Pummi K, Heape AM, Grenman R, Peltonen J, Peltonen S* (2009) Tight junction proteins in human Schwann cell autotypic junctions. *J Histochem Cytochem* 57 (6): 523–529.  
<https://doi.org/10.1369/jhc.2009.951681>
  65. *Hirakawa H, Okajima S, Nagaoka T, Takamatsu T, Oyama M* (2003) Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res* 284 (2): 196–210.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00035-6)
  66. *Lux TJ, Hu X, Ben-Kraiem A, Blum R, Chen JT, Rittner HL* (2020) Regional differences in tight junction protein expression in the blood-DRG barrier and their alterations after nerve traumatic injury in rats. *Int J Mol Sci*: 21 (1). pii: E270.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21010270>
  67. *Sauer RS, Krug SM, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, Niedermirtl B, Bosten J, Günther R, Dabrowski S, Doppler K, Sommer C, Blasig IE, Brack A, Rittner HL* (2014) Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release* 185: 88–98.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.029>
  68. *Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S* (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169 (3): 527–538.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200501154>
  69. *Reinhold AK, Schwabe J, Lux TJ, Salvador E, Rittner HL* (2018) Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy. *Front Neurosci* 12: 936.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00936.eCollection2018>
  70. *Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S* (1996) Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133 (1): 43–47.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.133.1.43>
  71. *Mazzeo A, Rodolico C, Monici MC, Migliorato A, Aguenouz M, Vita G* (1997) Perineurium talin immunoreactivity decreases in diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 197 146 (1): 7–11.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(96\)00285-7](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(96)00285-7)
  72. *Jaakkola S, Savunen O, Halme T, Uitto J, Peltonen J* 1993 Basement membranes during development of human nerve: Schwann cells and perineurial cells display marked changes in their expression profiles for laminin subunits and beta 1 and beta 4 integrins. *J. Neurocytol.* 22 (3): 215–230.  
<https://doi.org/10.1007/BF01246360>
  73. *Nagaoka T, Oyama M, Okajima S, Takamatsu T* (1999) Differential expression of gap junction proteins connexin26, 32, and 43 in normal and crush-injured rat sciatic nerves. Close relationship between connexin43 and occludin in the perineurium. *J Histochem Cytochem* 47 (7): 937–948.  
<https://doi.org/10.1177/002215549904700711>
  74. *Stark B, Carlstedt T, Cullheim S, Risling M* (2000) Developmental and lesion-induced changes in the distribution of the glucose transporter Glut-1 in the central and peripheral nervous system. *Exp Brain Res* 131 (1): 74–84.  
<https://doi.org/10.1007/s002219900300>
  75. *Muona P, Sollberg S, Peltonen J, Uitto J* (1992) Glucose transporters of rat peripheral nerve. Differential expression of GLUT1 gene by Schwann cells and perineurial cells in vivo and in vitro. *Diabetes* 41: 1587–1596.  
<https://doi.org/10.2337/diab.41.12.1587>
  76. *Muona P, Jaakkola S, Salonen V, Peltonen J* (1993) Expression of glucose transporter 1 in adult and developing human peripheral nerve. *Diabetologia* 36: 133–140.  
<https://doi.org/10.1007/BF00400694>
  77. *Tserentsoodol N, Shin BC, Koyama H, Suzuki T, Takata K* (1999) Immunolocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GLUT1 in the cells of the blood-nerve barrier. *Arch Histol Cytol* 62 (5): 459–469.  
<https://doi.org/10.1679/aohc.62.459>
  78. *Takebe K, Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T* (2008) Histochemical demonstration of a monocarboxylate transporter in the mouse perineurium with special reference to GLUT1. *Biomed Res* 29 (6): 297–306.  
<https://doi.org/10.2220/biomedres.29.297>
  79. *Achtstätter T, Fouquet B, Rungger-Brändle E, Franke WW* 1989 Cytokeratin filaments and desmosomes in the epithelioid cells of the perineurial and arachnoidal sheaths of some vertebrate species. *Differentiation*. 40 (2): 129–149.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1989.tb00822.x>
  80. *Kovalenko VL, Shevtsov VI, Shchudlo MM, Shchudlo NA* (2000) Reactive properties of epi- and perineurium: experimental and morphological basis for nerve suture technique. *Bul Exp Biol Med* 130 (2): 793–797.  
<https://doi.org/10.1007/BF02766098>
  81. *Thomas PK, Bhagat S* (1978) The effect of extraction of the intrafascicular contents of peripheral nerve trunks on perineurial structure. *Acta Neuropathol (Berl)* 43: 135–141.  
<https://doi.org/10.1007/BF00685008>
  82. *Clark JK, O'Keefe A, Mastracci TL, Sussel L, Matise MP, Kucenas S* (2014) Mammalian Nkx2.2+ perineurial glia are essential for motor nerve development. *Dev Dyn* 243 (9): 1116–1129.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24158>
  83. *Anderson WA, Willenberg AR, Bosak AJ, Willenberg BJ, Lambert S* Use of a capillary alginate gel (Capgel™) to study the three-dimensional development of sensory nerves reveals the formation of a rudimentary perineurium.

- J Neurosci Methods 2018. 305: 46–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.05.003>
84. Fontenas L, Kucenas S (2021) Spinal cord precursors utilize neural crest cell mechanisms to generate hybrid peripheral myelinating glia. *Elife* 10: e64267.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.64267>
  85. Peltonen S, Alanne M, Peltonen J (2013) Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers* 1:e24956.  
<https://doi.org/10.4161/tisb.24956>
  86. Sima A, Sourander P (1973) The effect of perinatal undernutrition on perineurial diffusion barrier to exogenous protein. An experimental study on rat sciatic nerve. *Acta Neuropathol* 24 (3): 263–272.  
<https://doi.org/10.1007/BF00687596>
  87. Sima A, Sourander P (1974) The permeability of perineurium to peroxidase after early undernutrition. An ultrastructural study on rat sciatic nerve. *Acta Neuropathol* 28 (1): 15–23.  
<https://doi.org/10.1007/BF00687514>
  88. Le Douarin NM (1986) Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 231: 1515–1522
  89. Le Douarin NM, Dupin E (2012) The neural crest in vertebrate evolution. *Curr Opin Genet Dev* 22 (4): 381–389.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.06.001>
  90. Etchevers HC, Dupin E, Le Douarin NM (2019) The diverse neural crest: from embryology to human pathology. *Development* 146 (5): dev169821.  
<https://doi.org/10.1242/dev.169821>
  91. Petersen J, Adameyko I (2017) Nerve-associated neural crest: peripheral glial cells generate multiple fates in the body. *Curr Opin Genet Dev* 45: 10–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.02.006>
  92. Joseph NM, Mukouyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand E-L, Lee K-F, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ (2004) Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131 (22): 5599–5612.  
<https://doi.org/10.1242/dev.01429>
  93. Dupin E, Sommer L (2012) Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. 366 (2012) 83–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.035>
  94. Le Douarin NM, Dupin E (2018) The “beginnings” of the neural crest. *Dev Biol* 444 (1): S3–S13.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.019>
  95. Graham A (2003) The neural crest. *Curr Biol* 13 (10): R381–384.  
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00315-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00315-4)
  96. Graham A, Begbie J, McGonnell I (2004) Significance of the cranial neural crest. *Dev Dyn* 229 (1): 5–13.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.10442>
  97. Чумасов ЕИ (1976) Морфология периневрия в органотипической культуре чувствительных ганглиев. В кн: Тканевая биология. Тарту. С. 79–82 [Chumasov EI (1976) Morfologiya perinevriya v organotipicheskoj kul'ture chuvstvitel'nyh gangliev. V kn: Tkanevaya biologiya Tartu 79–82 (In Russ)].
  98. Чумасов ЕИ, Коновалов ГВ (1977) Морфология нервной ткани в культуре. Культура нервной ткани. М. Медицина: 63–127. [Chumasov EI, Konovalov GV (1977) Morfologiya nervnoj tkani v kul'ture. Kul'tura nervnoj tkani. M. Medicina: 63–127 (In Russ)].
  99. Bunge MB, Wood PM, Tynan LB, Bates ML, Sanes JR (1989) Perineurium originates from fibroblasts: Demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243: 229–231.  
<https://doi.org/10.1126/science.2492115>
  100. Kazamel M, Boes CJ (2017) Renaut Corpuscles or Peripheral Nerve Infarcts? A Historical Overview. *Can J Neurol Sci* 44 (2): 184–189.  
<https://doi.org/10.1017/cjn.2016.406>
  101. Петрова ЕС (2012) Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва. *Цитология* 54 (7): 525–540. [Petrova E.S. (2012) The use of stem cells to stimulate the regeneration of the damaged nerve. *Tsitologiya* 54 (7): 525–540 (In Russ)].
  102. Petrova ES (2015) Injured nerve regeneration using cell-based therapies: current challenges. *Acta Naturae* 7 (3 (26)): 38–47.  
<https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-3-38-47>
  103. Petrova ES (2018) Differentiation potential of mesenchymal stem cells and stimulation of nerve regeneration. *Russ J Development Biol* 49 (4): 193–205.  
<https://doi.org/10.1134/S1062360418040033>
  104. Huang CW, Huang WC, Qiu X, Fernandes Ferreira da Silva F, Wang A, Patel S, Nesti LJ, Poo MM, Li S (2017) The differentiation stage of transplanted stem cells modulates nerve regeneration. *Sci Rep* 7 (1): 17401.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17043-4>
  105. Du J, Zhen G, Chen H, Zhang S, Qing L, Yang X, Lee G., Mao HQ, Jia X (2018) Optimal electrical stimulation boosts stem cell therapy in nerve regeneration. *Biomaterials* 181: 347–359.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.015>
  106. Xia B, Chen G, Zou Y, Yang L, Pan J, Lv Y (2019) Low-intensity pulsed ultrasound combination with induced pluripotent stem cells-derived neural crest stem cells and growth differentiation factor 5 promotes sciatic nerve regeneration and functional recovery. *J Tissue Eng Regen Med* 13 (4): 625–636.  
<https://doi.org/10.1002/term.2823>
  107. Petrova E, Isaeva E, Kolos E, Korzhevskii D (2018) Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in the epineurium and perineurium of the recipient rat. *Biol Communicat* 63 (2): 123–132.  
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.205>
  108. Petrova ES, Kolos EA, Korzhevskii DE (2021) Changes in the thickness of rat nerve sheaths after single subperineural administration of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med* 4.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05267-4>
  109. Kucenas S, Wang WD, Knapik EW, Appel B (2009) A selective glial barrier at motor axon exit points prevents oligodendrocyte migration from the spinal cord. *J Neurosci* 29: 15187–15194.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4193-09.2009>
  110. Lunn ER, Scourfield J, Keynes RJ, Stern CD (1987). The neural tube origin of ventral root sheath cells in the chick embryo. *Development* 101: 247–254
  111. Boyd BS, Gray AT, Dilley A, Wanek L, Topp KS (2012) The pattern of tibial nerve excursion with active ankle dorsiflexion is different in older people with diabetes

- mellitus. *Clin Biomech* (Bristol, Avon) 27 (9): 967–971. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2012.06.013>
112. Ross MH, Reith EJ (1989) Perineurium: Evidence for contractile elements. *Science* 165: 604–606. <https://doi.org/10.1126/science.165.3893.604>
113. De Jonge RR, Vreijling JP, Meintjes A, Kwa MS, van Kampen AH, van Schaik IN, Baas F (2003) Transcriptional profile of the human peripheral nervous system by serial analysis of gene expression. *Genomics* 82 (2): 97–108. [https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(03\)00124-1](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(03)00124-1)
114. De Jonge RR, van Schaik IN, Vreijling JP, Troost D, Baas F (2004) Expression of complement components in the peripheral nervous system. *Hum Mol Genet* 13 (3): 295–302. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh029>
115. Погорелов ЮВ (2001) Гистогематические барьеры В кн.: Руководство по гистологии. Т. I. СПб: СпецЛит. С. 465–494 [Pogorelov YV (2001) Gistogematicheskie bar'ery V kn.: Rukovodstvo po gistologii. T. I. SPb: SpecLit. 465–494 (In Russ)].
116. Burkel WE (1967) The histological fine structure of perineurium. *Anat Rec* 158 (2):177–189. <https://doi.org/10.1002/ar.1091580207>
117. Hall SM, Williams PL (1971) The distribution of electron-dense tracers in peripheral nerve fibres. *J Cell Sci* 8 (2):541–555.
118. Klemm H (1970) The perineurium: a diffusion barrier for peroxidase in epineurial and endoneurial application. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 108 (3): 431–445.
119. Olsson Y, Reese TS (1971) Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 30 (1):105–119. <https://doi.org/10.1097/00005072-197101000-00011>
120. Palladino SP, Helton ES, Jain P, Dong C, Crowley MR, Crossman DK, Ubogu EE (2017) The Human Blood-Nerve Barrier Transcriptome. *Sci Rep* 7 (1): 17477. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17475-y>
121. Ouyang X, Dong C, Ubogu EE (2019) In situ molecular characterization of endoneurial microvessels that form the blood-nerve barrier in normal human adult peripheral nerves. *J Peripher Nerv Syst* 24 (2):195–206. <https://doi.org/10.1111/jns.12326>
122. Dong C, Ubogu EE (2018) GDNF enhances human blood-nerve barrier function in vitro via MAPK signaling pathways. *Tissue Barriers* 6 (4):1–22. <https://doi.org/10.1080/21688370.2018.1546537>
123. Moreau N, Mauborgne A, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, Villanueva L Pohl M, Boucher Y (2017) Could an endoneurial endothelial crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and Sonic Hedgehog pathways underlie the early disruption of the infra-orbital blood-nerve barrier following chronic constriction injury? *Mol Pain* 13:1744806917727625. <https://doi.org/10.1177/1744806917727625>
124. Moreau N, Mauborgne A, Bourgoin S, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, Villanueva L, Pohl M, Boucher Y (2016) Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development. *Pain* 157 (4): 827–839. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000444>
125. Быков ВЛ (2007) Цитология и общая гистология. Санкт-Петербург: Сотис. [Bykov V.L. (2007) *Citologija i obshhaja gistologija*. Sankt-Peterburg: Sotis (In Russ)].
126. Oldfors A, Johansson BR (1979) Barriers and transport properties of the perineurium. An ultrastructural study with 125I-labeled albumin and horseradish peroxidase in normal and protein-deprived rats. *Acta Neuropathol* 47 (2):139–143. <https://doi.org/10.1007/BF00717037>
127. Oldfors A (1981) Permeability of the perineurium of small nerve fascicles: an ultrastructural study using ferritin in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 7 (3):183–194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1981.tb00088.x>
128. Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR, Mirsky R (1999) Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23 (4): 713–724. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)80030-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)80030-1)
129. Jung J, Frump D, Su J, Wang W, Mozaffar T, Gupta R (2015) Desert hedgehog is a mediator of demyelination in compression neuropathies. *Exp Neurol* 271: 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.014>
130. Fontenas L, Kucenas S (2017) Livin' on the edge: glia shape nervous system transition zones. *Curr Opin Neurobiol* 47:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.008>
131. Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007) Peripheral regeneration. *Annu ReNeurosci* 30: 209–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094337>
132. Monk KR, Feltri ML, Taveggia C (2015) New insights on Schwann cell development. *Glia* 63: 1376–1393 <https://doi.org/10.1002/glia.22852>
133. Ohara S, Takahashi H, Ikuta F (1986) Ultrastructural alterations of perineurial cells in the early stage of Wallerian degeneration. *Lab Invest* 54 (2): 213–221.
134. Spencer PS, Weinberg HJ, Raine CS, Prineas JW (1975) The perineurial window – a new model of focal demyelination and remyelination. *Brain Res* 96: 323–329. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90742-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90742-8)
135. Radek A, Thomas PK, King RH (1986) Perineurial differentiation in interchange grafts of rat peripheral nerve and spinal root. *J Anat* 147: 207–217.
136. Lewis GM, Kucenas S (2014) Perineurial glia are essential for motor axon regrowth following nerve injury. *J Neurosci* 34 (38):12762–12777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1906-14.2014>
137. Ohta M, Okajima S, Hirakawa H, Tokunaga D, Fujiwara H, Oda R, Kobashi H, Hirata M, Kubo T (2005) Expression of tight and gap junctional proteins in the perineurial window model of the rat sciatic nerve. *Int J Neurosci* 115 (10):1469–1481. <https://doi.org/10.1080/00207450591001871>
138. Toyoda T, Ochiai K, Ohashi K, Tomioka Y, Kimura T, Umemura T (2005) Multiple perineuriomas in chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Vet Pathol* 42 (2):176–183. <https://doi.org/10.1354/vp.42-2-176>

139. *Pummi KP, Aho HJ, Laato MK, Peltonen JT, Peltonen SA* (2006) Tight junction proteins and perineurial cells in neurofibromas. *J Histochem Cytochem* 54 (1): 53–61. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6671.2005>
140. *Shelekhova KV, Danilova AB, Michal M, Kazakov DV* (2008) Hybrid neurofibroma-perineurioma: an additional example of an extradigital tumor. *Ann Diagn Pathol* 12 (3): 233–234. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.02.012>
141. *Gibson JD* (1979) The origin of the neural macrophage: a quantitative ultrastructural study of cell population changes during Wallerian degeneration. *J Anat* 129 (1): 1–19.
142. *Hirata K, Kawabuchi M* (2002) Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc Res Tech* 57: 541–547. <https://doi.org/10.1002/jemt.10108>
143. *De la Motte DJ, Hall SM, Allt G* (19 75) A study of the perineurium in peripheral nerve pathology. *Acta Neuropathol* 33 (3): 257–270. <https://doi.org/10.1007/BF00688398>

## Current Views on Perineurial Cells: Unique Origin, Structure, Functions

E. S. Petrova<sup>a,#</sup> and E. A. Kolos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: iempes@yandex.ru*

This review aims to consolidate current views on the cells of one of the peripheral nerve sheath layers, perineurium. The relevance of the subject matter owes the lack of basic knowledge about the involvement of these cells in the restoration of damaged nerve conductors, as well as the need to unravel the molecular mechanisms that stimulate the regeneration of damaged nerves. A review summarizes the recent data on the morphofunctional features of the perineurium, phylogenetic and ontogenetic origin of perineurial cells, and molecular features of the regulation of the blood-nerve barrier. It highlights the uniqueness of the ontogenetic origin of the perineurium, characterizes immunohistochemical markers of perineurial cells, describes the features of the perineurium in the dorsal root ganglia and spinal nerve roots.

*Key words:* perineurium, peripheral nerve, dorsal root ganglion, spinal nerve roots, blood-nerve barrier, claudin, occludin, neural crest cells, mesenchyme

## СООТНОШЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЬНЫХ И ТОРМОЗНЫХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В АНТИНОЦИЦЕПТИВНОМ ЯДРЕ RAPHE MAGNUS НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГИДРОКОРТИЗОНОМ

© 2022 г. М. В. Погосян<sup>1</sup>, М. Э. Овсепян<sup>1</sup>, М. А. Даниелян<sup>1</sup>,  
Л. Э. Амбарцумян<sup>1</sup>, Л. П. Манукян<sup>1</sup>, Дж. С. Саркисян<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА, Ереван, Армения

\*e-mail: johnsarkissyan@gmail.com

Поступила в редакцию 08.10.2021 г.

После доработки 04.11.2021 г.

Принята к публикации 05.11.2021 г.

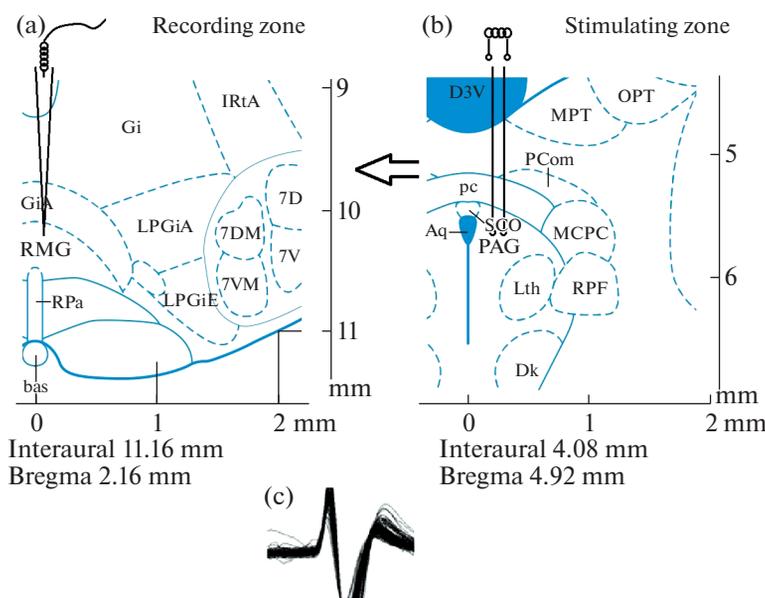
При нейродегенеративных болезнях, чаще при болезни Паркинсона (БП), в нейродегенерацию вовлекаются антиноцицептивные центры, что сопровождается постоянной болью, не снимаемой наркотическими веществами. В 3 сериях экспериментов на 13 белых беспородных крысах проведен анализ импульсной активности 390 одиночных нейронов Raphe magnus nucleus (RMG) при высокочастотной стимуляции (ВЧС) Periaqueductal gray matter (PAG) в норме, на ротеноновой модели БП и с протекцией гидрокортизоном. На основе программного математического анализа усредненной степени частотной выраженности постстимульных депрессорных и возбуждающих синаптических эффектов на модели БП выявлено резкое превышение тетанических и посттетанических возбуждающих эффектов. При этом многократно уменьшилось количество нейронов, отвечающих аналогичными депрессорными синаптическими реакциями, а с увеличением таковых – отвечающих возбуждающими. Отмеченное является результатом чрезмерной возбудимости. В условиях воздействия гидрокортизона депрессорные синаптические реакции резко повысились со значительным повышением количества вовлеченных в них нейронов. Это является свидетельством нейтрализации возбуждающих реакций, с естественным уменьшением последних. С учетом выявленного нами в предыдущих исследованиях протекторного назначения депрессорных реакций очевиден эффект гидрокортизона. Более того, на модели БП в нейронах RMG при ВЧС PAG показано выраженное (3- и 5-кратное) увеличение престаимпульной частоты активности, предшествующей депрессорным постстимульным синаптическим эффектам. В условиях протекции гидрокортизоном получено значительное (7- и 9-кратное и более) снижение частоты престаимпульной импульсной активности, предшествующей возбуждающим постстимульным проявлениям активности, что явно свидетельствует в пользу протекции. Постстимульная частота активности нейронов RMG, на модели БП, сопровождаемая возбуждающими синаптическими эффектами намного (7- и 5-кратно и более) превысила норму, что также свидетельствует о громадном повышении возбудимости нейронов. В условиях протекции произошло мощное (18.3- и 17.7-кратное) снижение постстимульной частоты импульсной активности нейронов RMG на модели БП, сопровождаемой возбуждающими постстимульными эффектами. Следует полагать успешный протекторный эффект гидрокортизона.

*Ключевые слова:* болезнь Паркинсона, одиночная нейрональная активность нейронов RMG, высокочастотная стимуляция PAG, гидрокортизон

DOI: 10.31857/S0044452922010065

Понимание эволюции механизмов и поведения, важных для боли, начинает появляться в результате широкомасштабных исследований клеточных механизмов и поведенческих реакций, связанных с активацией ноцицепторов и повреждением тканей, воспалением и экологическим контекстом этих реакций у различных видов, в особенности у грызунов и людей [1]. В последние годы механизмам боли при нейродегенеративных болезнях (НБ)

начали уделять серьезное внимание [2], в то время как терапевтическая стратегия ограничивается симптоматическими средствами без оценки механизмов [3]. Механизм боли продолжает оставаться сложным и связанным с патологическими изменениями в структурах мозга, вовлекаемых в ноцицептивные механизмы. Необходимо дальнейшее серьезное изучение механизмов ее формирования для организации доступной терапевтической стра-



**Рис. 1.** Схема эксперимента по раздражению PAG и отведению из RMG. Стереотаксическое изображение пункта отведения нейронной активности – (а), зоны стимуляции – (б) и характерного потенциала действия – (с).

тегии [4]. Болезнь Паркинсона (БП), будучи прогрессирующей нейродегенеративной болезнью, затрагивает болевой процесс на многих уровнях, от периферических структур до высших центров [4]. Некоторые из этих структур рано поражаются при БП, как, например, большое ядро шва (*raphe magnus nucleus* – RMG), участок эндогенной болевой тормозной системы в росто-вентральном продолговатом мозге [5]. RMG следует отметить среди структур, играющих важную роль в модуляции спинальной ноцицептивной передачи, наряду с околоводопроводным серым веществом (*Periaqueductal gray matter* – PAG) и голубым пятном (*Locus Coeruleus* – LC). К тому же RMG воспринимает проекции от PAG [6]. Эти структуры участвуют в нисходящей регуляции анти-ноцицептивных путей путем торможения ноцицептивных стимулов от нейронов дорзального рога [7, 8]. Нарушение в этих тормозящих болевых структурах, как правило, вызывает более выраженное ощущение боли [9, 6].

В данной работе исследовали клеточные механизмы активации ноцицепторов на примере соотношения возбудительных и депрессорных синаптических ответов одиночных нейронов RMG при стимуляции PAG, с целью оценки механизмов их поражения на модели болезни Паркинсона, индуцированной односторонним введением ротенона и в условиях протекции гидрокортизоном.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведены электрофизиологические исследования на 13 белых беспородных крысах ( $230 \pm 30$  г): интактных ( $n = 3$ ), на ротеноновой модели БП, ин-

дуцированной унилатеральным введением ротенона, и выдержанных до опыта 4 нед ( $n = 4$ ), и в условиях протекции гидрокортизоном (по 14 инъекций через день в дозе 1.25 мг/кг, 0.1%) ( $n = 6$ ). Введение ротенона осуществляли в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) из расчета 12 мкг в 0.5 мкл Димексида (со скоростью 1 мкл/мин) в “medial forebrain bundle” по координатам стереотаксического атласа [10] ( $AP+0.2$ ;  $L \pm 1.8$ ;  $DV+8$  мм). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [11]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. Стеклообразные микроэлектроды с диаметром кончика 1–2 мкм, заполненные 2M NaCl, вводили в RMG согласно стереотаксическим координатам ( $AP-11.6$ ;  $L+0.2$ ;  $DV+10.3$  мм) для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов (рис. 1). Осуществляли высокочастотную стимуляцию (ВЧС) PAG вольфрамовыми электродами посредством прямоугольных толчков тока длительностью – 0.05 мс, амплитудой 0.12–0.18 мВ, силой тока 0.32 мА и частотой 100 Гц в течение 1 с, согласно стереотаксическим координатам ( $AP-4.92$ ;  $L+0.3$ ;  $DV+5.7$  мм). Операции осуществляли на наркотизированных животных (уретан 1.2 г/кг в/б), зафиксированных в стереотаксическом аппарате.

Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД) с последующей посттетанической потенциацией (ПТП) и депрессией (ПТД) различной латентности, выраженности и длительности. Проводили программный

математический анализ одиночной спайковой активности 390 нейронов. Пре- и постстимульные проявления активности, а также значения фоновой импульсной активности оценивали on-line регистрацией и программным математическим анализом, позволяющим селекцию спайков амплитудной дискриминацией с выводом “растеров” перистимульного спайкинга нейронов, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков. Производили далее многоуровневую статистическую обработку в отдельности для пре- и постстимульного отрезков времени и периода ВЧС. Для сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности, а также произвольно выбранных измерений в отдельном нейроне, строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) с вычислением средней частоты спайков. Однородность двух независимых выборок контролировалась t-критерием Стьюдента. С целью повышения статистической достоверности перистимульных изменений межспайковых интервалов использовали также непараметрический двухвыборочный критерий Манна–Уитни Вилкоксона (Wilcoxon–Mann–Whitney test) [12], оценивающий однородность двух независимых выборок. Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико (до нескольких сотен спайков за 10–20-секундный интервал после действия стимула), использовалась разновидность указанного теста – z-тест, определяющий его асимптотическую нормальность. Учет критических значений в сравнении с таковыми нормально-распределения при уровнях значимости 0.05, 0.01 и 0.001 (для различных испытаний) показывает, что в большинстве случаев спайкинга нейрональной активности при ВЧС статистически значимое изменение достигало как минимум уровня 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

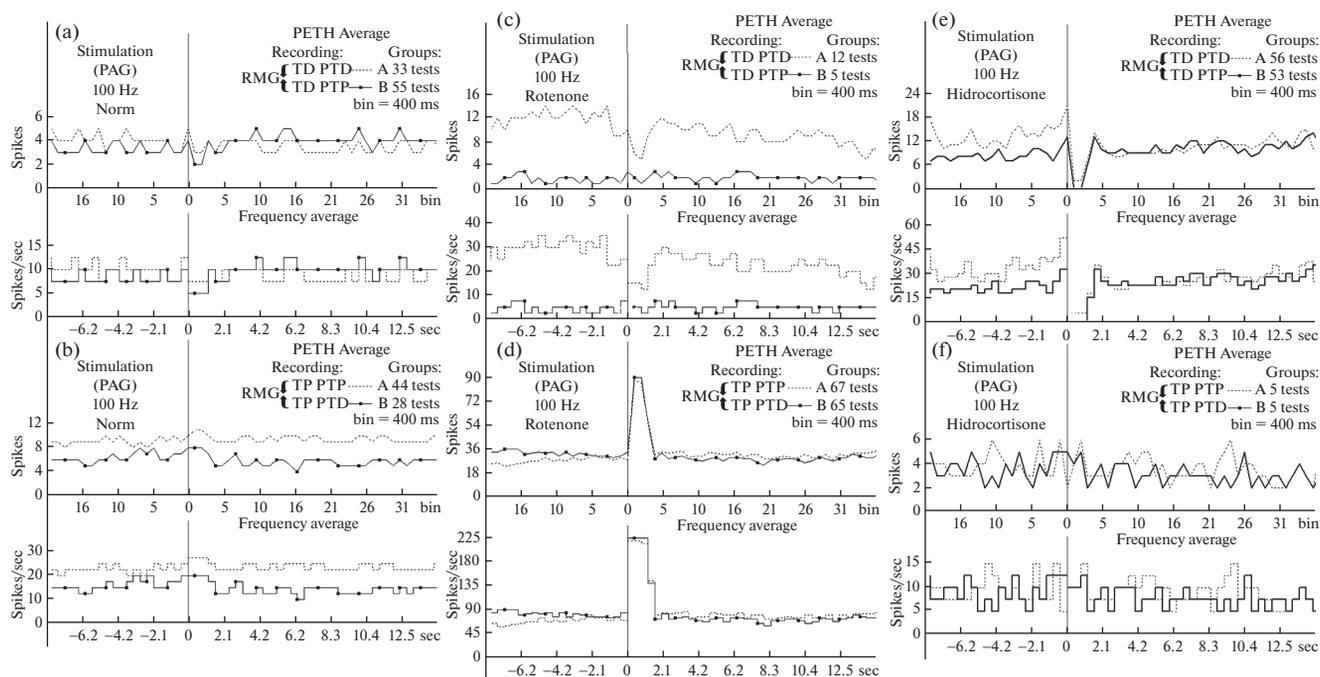
Производили экстраклеточную регистрацию спайковой активности одиночных нейронов RMG в норме (122 нейрона,  $n = 3$ ), на модели БП (149 нейронов,  $n = 4$ ) и с протекцией гидрокортизоном (119 нейронов,  $n = 6$ ). Посредством анализа на основе усредненного количества спайков (PETH), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average), были обнаружены следующие изменения нейрональной активности.

В нейронах RMG в ответ на ВЧС PAQ тетаническая депрессия в обеих последовательностях (ТД ПТД и ТД ПТП) в норме определялась порядком 1.66- и 2.0-кратного занижения престимульной активности соответственно (рис. 2а, группы А, В). Тетаническая потенциация, сопровождаемая посттетанической потенциацией и депрессией (ТП

ПТП и ТП ПТД), выявлялась в пределах 1.1- и 1.14-кратного превышения престимульной активности (рис. 2б, группы А, В). В нейронах RMG при ВЧС PAQ тетаническая депрессия на модели БП определялась в пределах 1.8- и 2.0-кратного снижения престимульной активности в обеих последовательностях соответственно (рис. 2с, группы А, В), а тетаническая потенциация исчислялась порядком 3.33- и 2.66-кратного превышения престимульной активности в обеих последовательностях (рис. 2д, группы А, В). Что же касается депрессорных постстимульных проявлений активности нейронов RMG при ВЧС PAQ, то при наличии почти одинаковых значений, в сравнении с нормой, общее количество нейронов, сопровождаемых депрессорными реакциями, на ротеноновой модели многократно уменьшилось. Очевидно чрезмерное синаптическое возбуждение, содействующее повышению частоты пре- и постстимульной активности в обеих последовательностях, характерное для нейродегенеративного поражения RMG. Наконец, в нейронах RMG при ВЧС PAQ, в условиях воздействия гидрокортизона, ТД в обеих депрессорных последовательностях достигала, соответственно, 10.5- и 13.0-кратного снижения престимульной активности (рис. 2е, группы А, В), а ТП в соответствующих возбуждающих постстимульных последовательностях исчислялась порядком лишь 3.0- и 1.25-кратного превышения престимульной активности (рис. 1ф, группы А, В).

Иными словами, при фактическом отсутствии разницы в постстимульных депрессорных реакциях, в нейронах RMG между нормой и патологией (1.66 и 2.0 против 1.8 и 2.0), резкий сдвиг имел место в постстимульных проявлениях активности (1.10 и 1.14 против 3.33 и 2.66), в то время как после воздействия гидрокортизона депрессорные реакции резко повышались в сравнении с БП (10.5 и 13.0 против 1.8 и 2.0). К тому же количество эффектов, вовлеченных в депрессорные реакции, также значительно повысилось в условиях протекции, достигнув 56 и 53. Очевиден протекторный эффект гидрокортизона с успешной нейтрализацией таковых возбуждающих – 67 и 65, с естественным уменьшением количества последних до 5 и 5 (рис. 2д, ф, группы А, В).

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбуждающих постстимульных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растеров пре- и постстимульных депрессорных, депрессорно-возбуждающих, возбуждающих и возбуждающе-депрессорных проявлений спайковой активности нейронов в норме, на модели БП, и в условиях протекции, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены дисковые диаграммы для более наглядного представления степени выраженности в ча-

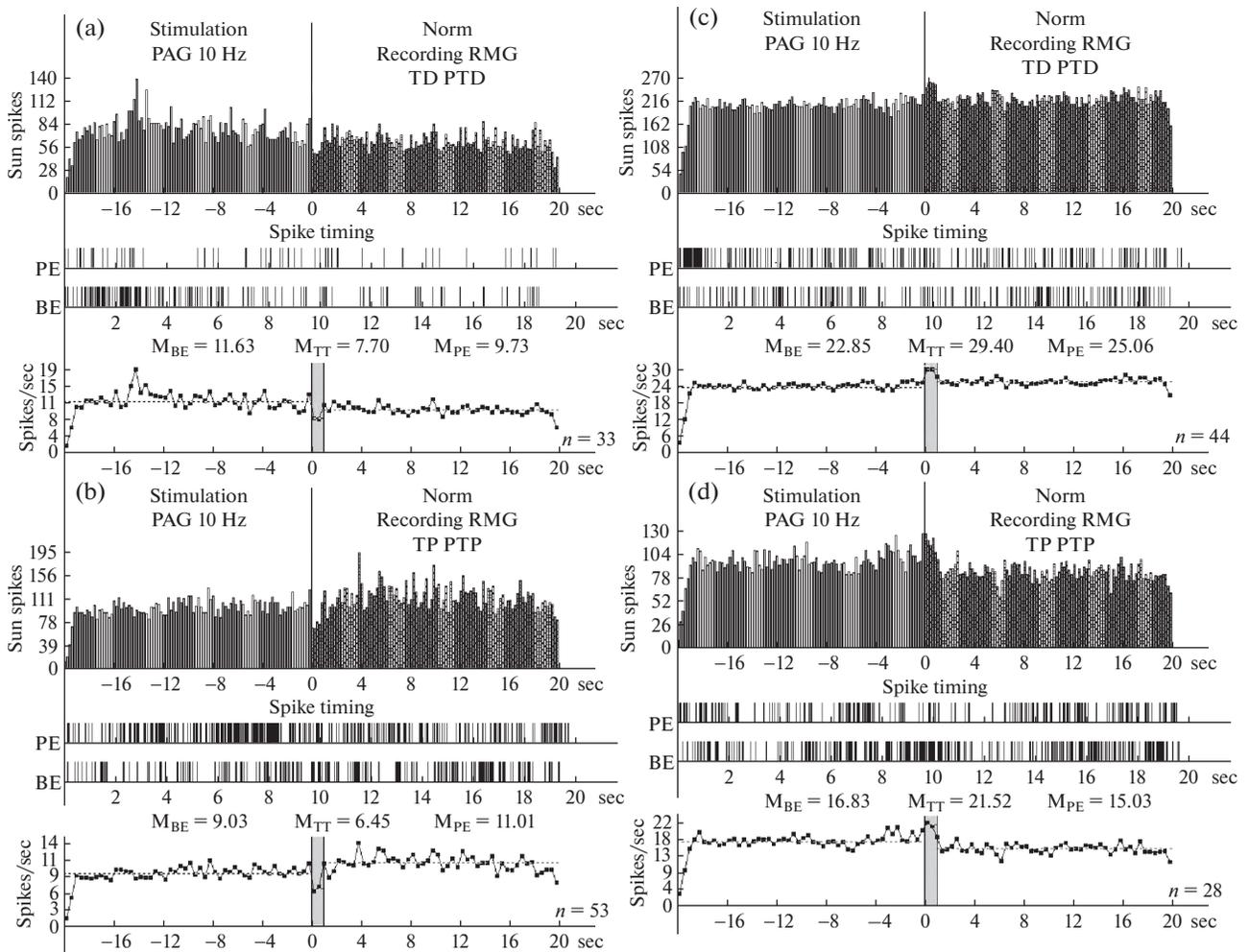


**Рис. 2.** Усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) депрессорных, депрессорно-возбудительных (а, с, е, Группы А, В) и возбудительных, возбудительно-депрессорных постстимульных проявлений активности нейронов RMG (b, d, f, Группы А, В) при ВЧС (100 Гц, 1 с) PAG в норме. (а, b), на модели БП (с, d) и в условиях воздействия гидрокортизона (е, f). Для групп указано количество испытаний (*n*).

стотном отображении (и в %) экспериментальных данных на рис. 6 (на основе рис. 3–5), которые привели к следующему выводу. Значения тетанической депрессии в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни тетанической потенции в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов RMG на ВЧС PAG в норме достигали 1.51- и 1.40-кратного снижения (рис. 3, 4; 6 части а, b), 1.30- и 1.29-кратного превышения (рис. 3, 4; 6 части с, d), в сравнении с престимульным уровнем активности соответственно. Как видно, указанные значения отличались незначительно, что свидетельствует о фактическом балансе депрессорных и возбудительных постстимульных проявлений активности исследуемых нейронов. Значения тетанической депрессии в депрессорной и депрессорно-возбудительной последовательности и уровни тетанической потенции в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности нейронов RMG на ВЧС PAG, в сравнении с престимульным уровнем активности на модели БП, отличались достаточно (2.00- и 1.31- против 3.12- и 2.54-кратного, для депрессорных и возбудительных эффектов соответственно) (рис. 3, 4; 6 части а–d), что указывает на превалирование возбудительных постстимульных проявлений активности над депрессорными (порядка 1.56- и 2.0-кратного. Наконец, в нейронах RMG при ВЧС PAG значения тетанической депрессии в депрессорной и депрес-

сорно-возбудительной последовательности и уровни тетанической потенции в возбудительной и возбудительно-депрессорной последовательности, в сравнении с престимульным уровнем активности на модели БП в условиях протекции, исчислялись в пределах 5.06- и 8.96-кратного занижения и 1.39- и 1.29-кратного превышения престимульной активности (рис. 5; 6 части а–d). Иными словами, с учетом лишь кратности измерений сравнительных показателей указанных постстимульных эффектов в патологии, в сравнении с таковыми в условиях протекции, в депрессорной последовательности имело место увеличение тетанической депрессии (5.06 и 8.96 против 2.0 и 1.31 на модели БП, т.е. 2.53 и 6.84-кратно и против 1.51 и 1.40 в норме, т.е. 3.35 и 6.40-кратно), и уменьшение тетанической потенции в возбудительной и в возбудительно-депрессорной последовательности (1.39 и 1.29 на модели БП с протекцией, против 3.12 и 2.54-кратного на модели БП без протекции, т.е. 2.24- и 2.07-кратно) и с приближением к норме (1.39 и 1.29 против 1.30 и 1.28-кратного).

Интересная картина была обнаружена при сравнении частоты пре- и постстимульной активности нейронов RMG при ВЧС PAG в указанных экспериментальных условиях. Престимульная частота активности, предшествующая депрессорным эффектам в норме и на модели БП, достигала кратных значений 11.63, 9.03 и 28.54, 5.26 соответственно, а предшествуемая возбудительными последова-



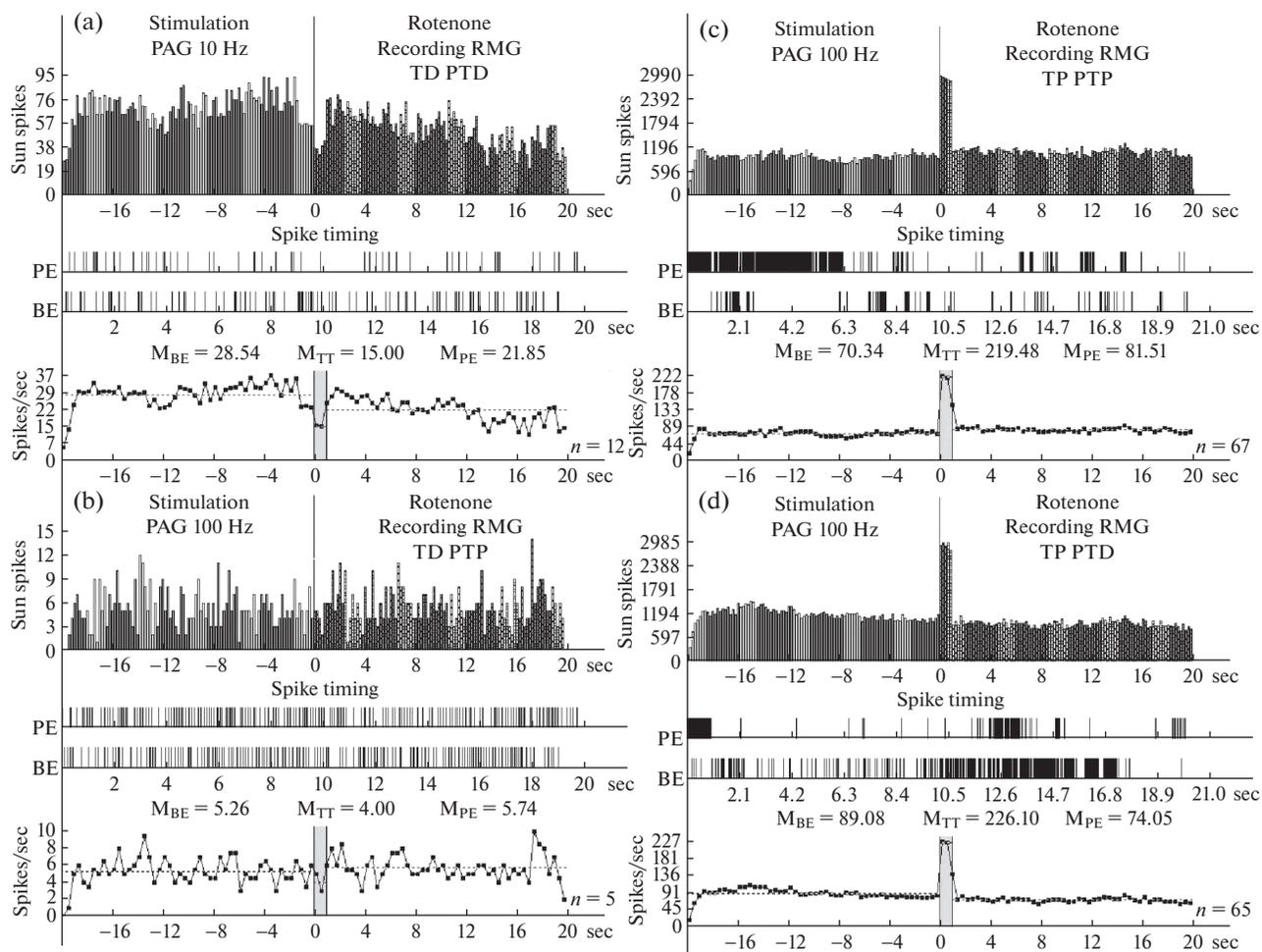
**Рис. 3.** Гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности ТД ПТД (а), в сочетании с посттетаническими возбудительными – ТД ПТП (б), возбудительных – ТП ПТП (с), сопровождаемых депрессорными (д), нейронов RMG, вызванных в ВЧС PAG в норме, в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции). Растеры активности – детальный анализ произвольно избранных одиночных нейронов из данной группы. Диаграммы частоты спайков, представленные в гистограммах, с усредненными значениями (M) для временных отрезков до (BE – before event), на время тетанизации (TT – time tetanization) и после стимуляции (PE – post event). Справа от диаграмм – количество испытаний (n).

тельностью в норме и патологии 22.85, 16.83 и 70.34, 89.08 соответственно (рис. 3, 4; 6e–h). Престимульная частота активности в нейронах RMG, предшествующая депрессорным и возбудительным последовательностям в условиях протекции, исчислялась в пределах 34.70, 20.70, 9.17 и 9.31, соответственно, по сравнению с 11.63, 9.03, 22.85, 16.83 в норме и 28.54, 5.26, 70.34, 89.08 в патологии без протекции (рис. 3–5; 6e–h).

Иными словами, в патологии, по сравнению с нормой, престимульная частота активности, предшествующая депрессорным постстимульным эффектам, повысилась и понизилась 2.45- и 1.71-кратно, а такая частота активности, предшествующая возбудительным, в обоих случаях повысилась и более значительно (3.07- и 5.30-кратно). В условиях протекции, в сравнении с патологией,

имело место очевидное превышение престимульной частоты, предшествующей депрессорным постстимульным проявлениям активности, в пределах 1.21- и 4.03-кратного, а такая предшествующая возбудительным претерпела значительное снижение порядка 7.67 и 9.57 соответственно, что явно свидетельствует в пользу протекции, более чем успешно справляющейся с чрезмерно повышенной токсической синаптической возбудимостью.

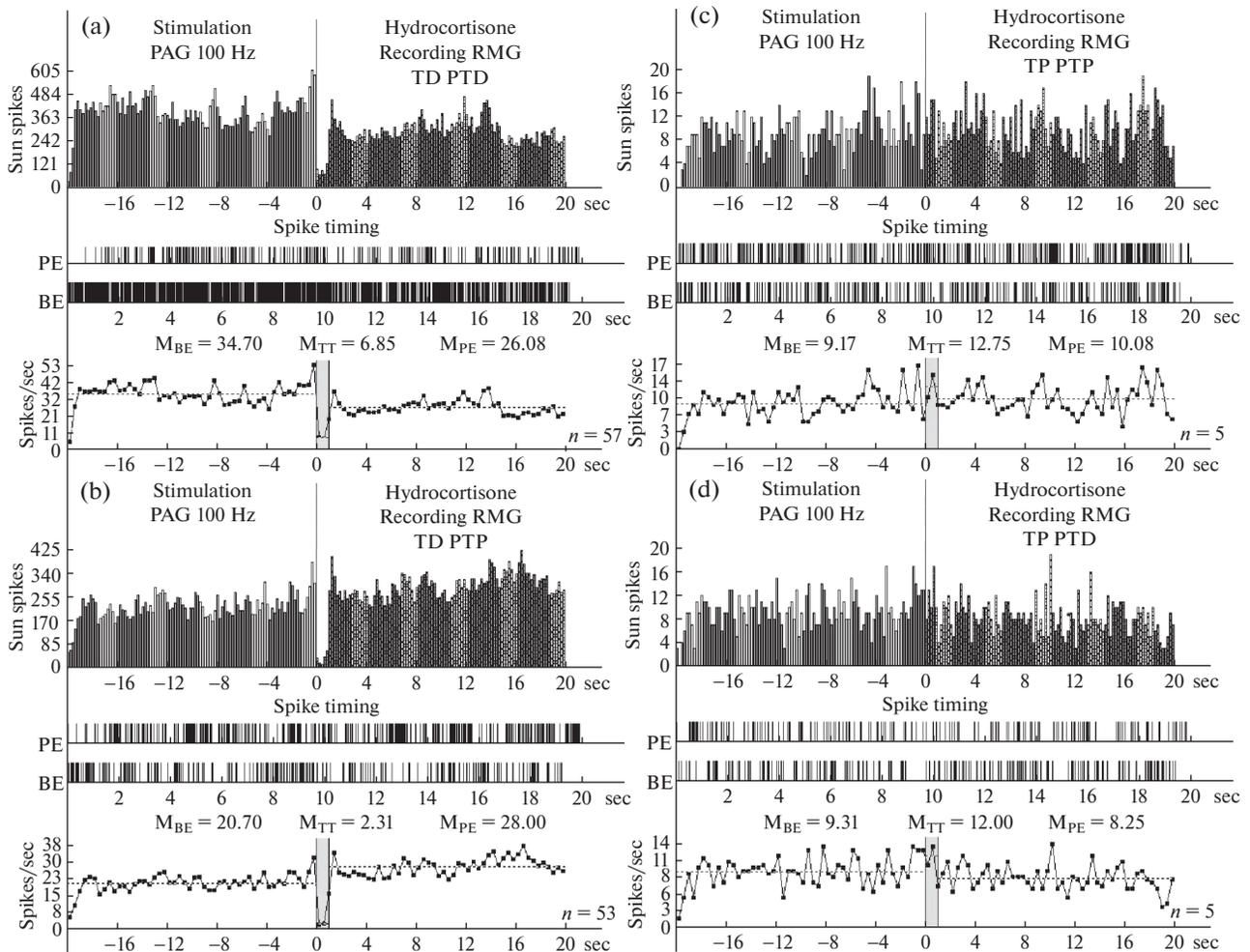
Что же касается постстимульной частоты активности нейронов RMG, то в норме, будучи сопровождаемой депрессорными и возбудительными постстимульными эффектами, она достигала 7.70, 6.45, 29.40 и 21.52, а на модели БП – 15.0, 4.0, 219.48 и 226.10 (рис. 3, 4; 6i–l). Иными словами, на модели БП частоты активности нейронов RMG, сопро-



**Рис. 4.** Гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности ТД ПТД (а), в сочетании с посттетаническими возбудительными – ТД ПТП (б), возбудительных – ТП ПТП (с), сопровождаемых депрессорными (д), нейронов RMG, вызванных на ВЧС PAG на модели БП, в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции). Рasterы активности на а–д – детальный анализ произвольно избранных одиночных нейронов из данной группы. Справа от диаграмм – количество испытаний (*n*).

вождаемая депрессорными реакциями, превысила норму 2.05-кратно и снизилась 1.61-кратно, соответственно, и намного превысилась порядка 7.46- и 10.50-кратно, сопровождаемая возбудительными эффектами. Таким образом, имело место мощное повышение частоты постстимульной активности, свидетельствующее опять, как и в случае претимпульной частоты, о чрезмерном синаптическом возбуждении (рис. 3, 4; бi–l). Наконец, в условиях протекции произошло фактическое приближение депрессорной постстимульной активности к норме (6.85 против 7.70, 2.31 против 6.45) и резкое снижение постстимульной частоты на модели БП, сопровождаемой возбудительными эффектами (12.75 против 219.48 и 12.00 против 226.10, т.е. 17.21- и 18.84-кратно), с приближением к норме (29.40 и 21.52), что свидетельствует об успешном протекторном эффекте гидрокортизона (рис. 3–5; бi–l).

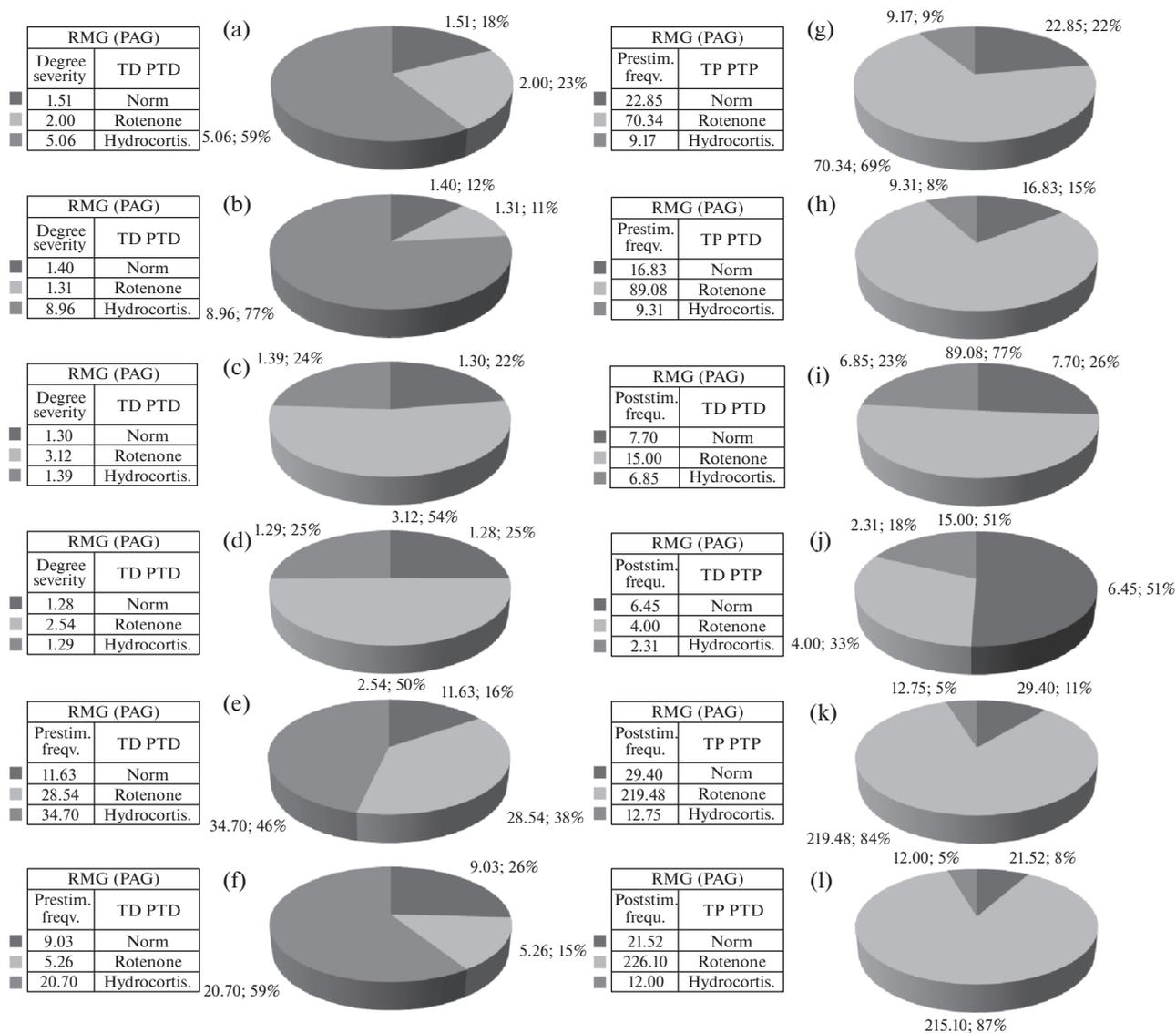
Несмотря на интенсивные исследования путей, передающих боль, недостаточно внимания уделялось тем из них, которые участвуют в восприятии боли и ее модуляции, т.е. антиноцицептивным, важным компонентом которых являются RMG и PAG. Необходима оценка механизмов боли [3, 4]. Интерес к изучению соотношения возбудительных и депрессорных (тормозных) синаптических процессов в отмеченных антиноцицептивных структурах в норме диктуется необходимостью оценки их поражения в условиях НБ, что в настоящее время весьма актуально, поскольку нет доступной терапевтической стратегии для подавления нестерпимой хронической боли, в частности при БП, в которой среди самых частых немоторных сенсорных отклонений ей принадлежит особое место [4]. Что касается клеточно-молекулярных механизмов повреждений, вызываемых ротеноном, и связи этих нарушений с патологическими изменениями, раз-



**Рис. 5.** Гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных тетанических депрессорных проявлений активности ТД ПТД (а), в сочетании с посттетаническими возбудительными – ТД ПТП (б), возбудительных – ТП ПТП (с), сопровождаемых депрессорными (д), нейронов RMG, вызванных при ВЧС PAG на модели БП в условиях протекции гидрокортизоном, в реальном времени 20 сек (до и после стимуляции). Растеры активности на а–д – детальный анализ произвольно избранных одиночных нейронов из данной группы. Справа от диаграмм – количество испытаний ( $n$ ).

вивающимися при БП, то следует отметить следующее. Ротенон, на основании которого получена нами модель БП и которому посвящено настоящее исследование, содействует дегенерации nigrostriatalного дофаминергического пути, избирательному окислительному повреждению стриатного тела и образованию убиквитин- и  $\alpha$ -синуклеин позитивных включений в нигральных клетках, которые сходны с тельцами Леви при БП [13]. К тому же ротеноном индуцированная модель воспроизводит большинство патогенетических механизмов БП, в том числе, формирование нейрональных включений и окислительный стресс [14, 15]. Наконец, на ротеноновой модели получены расстройства, нарушения в эмоционально-чувственной сфере, которые, как известно, являются важнейшими немоторными проявлениями БП [14]. Вместе с LC, RMG, вовлекается в аффективное и когнитивно-

оценочное измерение боли, болевую память и автономные ответы [4]. Хотя точные патогенетические механизмы, приводящие к гибели клеток при БП, не вполне понятны, известен ряд факторов, включающих митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс, эксайтотоксичность, дисфункцию убиквитин-протеасомного пути и апоптоз. В отличие от других моделей, ротенон воспроизводит большинство симптомов расстройства движений и гистопатологические особенности БП (в частности, образования телец Леви) и является мощным ингибитором митохондриального дыхания, а последние эпидемиологические исследования показали важную роль ротенона и других пестицидов в развитии спорадического паркинсонизма у населения сельской местности [16]. Согласно другим данным, при системном введении лишь около 20% введенного ротенона попадает в головной мозг, а 80% обуслов-



**Рис. 6.** Процентное и цифровое соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) (а–д), депрессорных (ТД ПТД), депрессорно-возбудительных возбудительных (ТД ПТП), возбудительных (ТП ПТП) и возбудительно-депрессорных (ТП ПТД) постстимульных эффектов в одиночных нейронах RMG при ВЧС PAG, а также частоты престаимпульной (е–h) и постстимульной (i–l) активности, предшествуемых и сопровождаемых указанными проявлениями постстимульной активации, в норме, на ротеноновой модели БП и в условиях протекции гидрокортизоном.

ливают периферическую токсичность внутренних органов крыс [17]. Но токсическое действие на внутренние органы исчезает при стереотаксическом введении ротенона [18], что собственно и было использовано в настоящем исследовании. В заключение, ротеноновые модели на крысах являются моделями, наиболее приближенными к патогенезу болезни БП у человека, в отличие от других нейротоксических моделей, что важно в эволюционном аспекте возможности оценки патологических отклонений и протекции, тождественных для животных и людей [1]. Как было отмечено выше, из ротеноновых моделей *in vivo* наиболее адекватными являются модели со стереотаксиче-

ским и интрацеребральным введением ротенона в черное вещество среднего мозга, что собственно и было использовано в настоящем исследовании. Таким образом, на модели БП выявлено мощное превышение возбудимости постстимульных синаптических процессов в RMG при ВЧС PAG, являющееся неизбежным результатом БП. Следует полагать ее аналог эксайтотоксичности при НБ, возникающей в качестве компенсаторной реакции на снижение возбуждения в результате гибели нейронов, повреждающей их сверхактивацией глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов [19], тем самым вызывая апоптоз нейронов и последующую гибель [20, 21]. В целом эксайтотоксичность сопро-

вождается нарушением кальциевой буферизации, генерацией свободных радикалов, активацией митохондриальной проницаемости и вторичной экс-айтотоксичностью [22]. Отмеченное, согласно нашему предыдущему сообщению, свидетельствует о необходимости углубления, в условиях нейродегенерации, депрессорных эффектов, несущих проекторную нагрузку и снижающих чрезмерные возбуждающие реакции [23].

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлялось в рамках программы исследований, запланированных в Институте физиологии НАН РА.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.С.С., М.В.П.), сбор данных (М.Э.О., М.А.Д.), обработка данных (Л.Э.А., Л.П.М.), написание и редактирование манускрипта (Д.С.С., М.А.Д.).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность Рубену Эдуардовичу Мегаворяну за содействие в подготовке рисунков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- (2019) Evolution of mechanisms and behaviour important for pain. *Phil. Trans R Soc B* 374 (1785): 20190275. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0275>
- Broen MPG, Braaksma MM, Patijn N, Weber WEJ (2012) Prevalence of pain in Parkinson's disease: a systematic J. review using the modified QUADAS tool. *Movement Disorders* 27 (4): 480–484. <https://doi.org/10.1002/mds.24054>
- de Tommaso M, Arendt-Nielsen L, Defrin R (2016) Pain in Neurodegenerative Disease: Current Knowledge and Future Perspectives. *Behav Neurol* 2016 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/7576292>
- Ramiro-González M, Fernández-de-las-Peñas C (2013) Pain in Parkinson disease: A review of the literature. *Parkinsonism & Related Disorders* 19 (3): 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.11.009>
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66: 355–474. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00009-6)
- Hornung J-P (2012) In *The Human Nervous System (Third Edition)*.
- Kuraishi Y, Fukui K, Shiomi H (1978) Microinjection of opioids into the nucleus reticularis gigantocellularis of the rat: analgesia and increase in the normetanephrine level in the spinal cord. *Biochem Pharmacol* 27: 2756–2758. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(78\)90054-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(78)90054-0)
- Gebhart GF (2004) Descending modulation of pain *Neurosci Biobehav Rev.* 27: 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.008>
- Scherder E, Wolters E, Polman C (2005) Pain in Parkinson's disease and multiple sclerosis: its relation to the medial and lateral pain systems. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1047–1105. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.001>
- Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, Academic Press, 5th ed.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Animal research: Reporting *in vivo* experiments: The ARRIVE guidelines 06 July. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
- Орлов АИ (2004) Прикладная статистика. [Orlov AI (2004) *Prikladnaya statistika* (In Russ)].
- Schmidt W, Alam MJ (2006) Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J Neural Transmis Suppl* 70: 273–276.
- Hoglinger GU, Oertel WH, Hirsch EC (2006) The rotenone model of parkinsonism – the five years inspection. *J Neural Transmis Suppl* 70: 269–723.
- Воронков ДН, Худоерков РМ, Доведова ЕЛ (2013) Изменения нейроглиального взаимодействия в nigrostriатных структурах мозга при моделировании дисфункции дофаминовой системы. *Журн неврол и психиатрии им. С.С. Корсакова* 113 (7): 47–55 [Voronkov DN, Hudoerkov RM, Dovedova EL (2013) *Izmeneniya nejroglialn'nogo vzaimodejstviya v nigrostriatnyh strukturah mozga pri modelirovanii disfunkcii dofaminovoj sistemy. ZHurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* 113 (7): 47–55 (In Russ)]
- Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N (2005) Rotenone Model of Parkinson Disease. Multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem* 280 (51): 42026–44203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508628200>
- Lapointe N, St-Hilaire M, Martinoli M-G (2004) Rotenone induces nonspecific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J* 18: 717–719. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0677fje>
- Xiong N, Huang J, Zhang Z (2009) Stereotaxical Infusion of Rotenone: A Reliable Rodent Model for Parkinson's Disease. *PLoS ONE.* 4 (11): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.000787>
- Matthew RH, Heather LS, Peter RD (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *NCI.* 45 (5): 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.007>
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58 (2): 193–201. <https://doi.org/10.1001/archophth.1957.00940010205006>
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164 (3880): 719–721. <https://doi.org/10.1126/science.164.3880.719>

22. Xiao-xia D, Yang W, Zheng-hong Q (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sinica* 30: 379–387.
23. Саркисян ДжС, Погосян МВ, Даниелян МА, Степанян АЮ, Вардамян АВ (2018) Назначение депрессорных синаптических процессов в условиях специфической

нейродегенеративной патологии и протекции. LAP LAMBERT Academic Publishing RU. 2018. [Sarkissian JS, Poghosyan MV, Danielyan MA, Stepanyan HY, Vardanyan AV (2018) The assign of depressor synaptic processes in condition of specific neurodegenerative pathology and protection. LAP LAMBERT Academic Publishing RU (In Russ.).]

## A Correlation of Excitatory and Inhibitory Synaptic Processes in the Antinociceptive Raphe Magnus Nucleus in Hydrocortisone-Protected Model of Parkinson's Disease

M. V. Poghosyan<sup>a</sup>, M. E. Hovsepyan<sup>a</sup>, M. H. Danielyan<sup>a</sup>, L. E. Hambardzumyan<sup>a</sup>,  
L. P. Manukyan<sup>a</sup> and , and J. S. Sarkissyan<sup>a, #</sup>

<sup>a</sup> *Orbeli Institute of Physiology, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia*

<sup>#</sup>*e-mail: johnsarkissyan@gmail.com*

In neurodegenerative diseases, most often in Parkinson's disease (PD), neurodegeneration involves antinociceptive centers, which is accompanied by persistent pain not relieved by opioids. In this study, in three experimental series carried out on 13 white mongrel rats, we analyzed the impulse activity of 390 single neurons of the raphe magnus nucleus (RMG) elicited by high-frequency stimulation (HFS) of the periaqueductal gray matter (PAG) under normal conditions, in the rotenone model of PD, and under conditions of hydrocortisone protection. Based on the programmatic mathematical analyses of the average degree distribution of all frequency ranges of post-stimulus depressor and excitatory synaptic effects, a sharp exceedance of tetanic and post-tetanic excitatory effects was revealed in the model of PD. At the same time, there was a multiple decrease in the number of neurons responding with analogous depressor synaptic reactions, while responding with excitatory reactions when the number of such increased. This effect was due to excessive excitability, attesting to a well-known compensatory increase in the excitability of the preserved RMG neurons, accompanied by their inevitable degenerative damage. After hydrocortisone exposure, the depressor synaptic reactions increased drastically with a significant increase in the number of the neurons involved, indicating a neutralization of the excitatory reactions that resulted in their natural decay. Considering the protective role of depressor reactions that we found previously, the analogous effect of hydrocortisone is quite evident. Moreover, on the PD model, RMG neurons during HFS of the PAG exhibited a pronounced (3- and 5-fold) increase in the pre-stimulus frequency of activity that preceded the depressor post-stimulus synaptic reactions. Hydrocortisone protection led to a significant (7- and 9-fold) reduction in the frequency of pre-stimulus impulse activity that preceded excitatory post-stimulus manifestations of activity, clearly arguing in favor of the protective effect of hydrocortisone. In the PD model, the post-stimulus frequency of RMG neuronal activity, accompanied by excitatory synaptic effects, far (7–5-fold and more) exceeded the norm, also attesting to a huge increase in the excitability of neurons. Under hydrocortisone protection, there was a sharp (18.3- and 17.7-fold) reduction in the post-stimulus frequency of impulse activity in RMG neurons in the PD model, accompanied by the excitatory post-stimulus effects. The data obtained herein demonstrate a pronounced protective effect of hydrocortisone.

*Key words:* rotenone model of Parkinson's disease, single-neuron activity of RMG neurons, high-frequency stimulation of the periaqueductal gray matter, hydrocortisone

## РОЛЬ LIMK1 ДОФАМИНОВЫХ И СЕРОТОНИНОВЫХ НЕЙРОНОВ В СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА, ОБУЧЕНИИ И ПАМЯТИ У ДРОЗОФИЛЫ ПРИ СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ НА ОСЛАБЛЕНИЕ ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

© 2022 г. А. В. Медведева<sup>1</sup>, А. В. Реброва<sup>2</sup>, Е. С. Заломаева<sup>1,2</sup>, С. К. Тураева<sup>2</sup>,  
Е. А. Никитина<sup>1,2</sup>, Е. В. Токмачева<sup>1</sup>, С. А. Васильева<sup>2</sup>,  
Б. Ф. Щеголев<sup>1</sup>, Е. В. Савватеева-Попова<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: esavvateeva@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2021 г.

После доработки 10.10.2021 г.

Принята к публикации 27.10.2021 г.

Работа продолжает цикл исследований эволюционной связи механизмов формирования стрессорной реакции и когнитивных функций, начатых в 1959 г. М.Е. Лобашевым и В.Б. Савватеевым. Изучается роль LIMK1, ключевого фактора нейропластичности, дофаминовых и серотониновых нейронов в стабильности генома, обучении и памяти дрозофилы в норме и при развитии стрессорной реакции организма в ослабленном статическом магнитном поле Земли (ОСМП). Показано, что низкий уровень LIMK1 способствует обучению, но не формированию среднесрочной памяти, в то же время стрессорное воздействие восстанавливает способность к обучению и формированию памяти у линии с повышенным содержанием LIMK1. Выявлены межлинейные различия частоты двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) и увеличение уровня ДЦР после ОСМП. Полученные данные демонстрируют роль дофаминовых и серотониновых нейронов не только в когнитивных функциях, но и как мишени действия ОСМП при развитии стрессорной реакции.

**Ключевые слова:** LIMK1, дофамин- и серотонинергические нейроны, двухцепочечные разрывы ДНК, ослабленное статическое магнитное поле Земли, обучение, память

**DOI:** 10.31857/S0044452922010041

Исследования М.Е. Лобашева и В.Б. Савватеева, опубликованные в монографии 1959 г. “Физиология суточного ритма животных” [1], о расширении адаптивных возможностей организма при тренировке свойств высшей нервной деятельности путем образования пищевых условных рефлексов, положили начало изучению взаимосвязи между нейропластичностью и развитием стрессорных реакций. Было показано, что формирование условной связи способствует адаптации к рестриктивному, а также стрессорным звуковым (частота 800–850 Гц, сила звука 107 дБ) раздражителям и изменению функционирования нервной системы [1]. В настоящее время экспериментально доказано наличие общих механизмов, лежащих в основе формирования адаптивных процессов – стрессорной реакции и обучения. В частности, выявлена роль белка теплового шока БТШ70 в формировании памяти, помимо его важной роли в фолдинге и деградации белков. В экспериментах с использованием различного числа копий гена *hsp70* у самцов

дрозофилы показано, что для обучения и формирования краткосрочной и долгосрочной памяти в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания необходим низкий конститутивный уровень БТШ70. Проведенные транскриптомные исследования подтвердили, что самцы, различающиеся по числу копий *hsp70*, демонстрируют дифференциальную экспрессию нескольких групп генов, вовлеченных в спаривание, участвующих в формировании и консолидации памяти, включая цАМФ-каскад передачи сигналов. Показано, что транскрипционный фактор, который индуцирует экспрессию *hsp70* и других генов теплового шока, играет центральную роль в синаптической пластичности и консолидации памяти [2]. Все это приводит к выводу о совместном эволюционировании механизмов стрессорной реакции и формировании памяти.

В лаборатории нейрогенетики Института физиологии им. И.П. Павлова РАН была создана мо-

дель синдрома Уильямса на дрозофиле с мутационным повреждением гена *CG1848* LIM-киназы 1 – *agnostic* (*agn<sup>ts3</sup>*) [3]. LIMK1 за счет наличия в структуре двух доменов LIM и домена PDZ, обеспечивающих белок-белковое взаимодействие, участвует в клеточной сигнализации и “узнает” белки семейств рецепторов и ионных каналов [4]. Помимо этого, LIMK1 фосфорилирует фактор деполимеризации актина – кофилин и таким образом контролирует баланс между мономерным и полимерным актином, что определяет его функции в цитоплазме и ядре. Актин непосредственно взаимодействует с комплексами ремоделирования хромосом, транскрипционными факторами и РНК-полимеразами, регулируя транскрипционный выход клетки [5]. Мутация по этому гену *agn<sup>ts3</sup>* при перmissive температуре нарушает обучение и память при условно-рефлекторном подавлении ухаживания у самцов, тогда как при рестриктивной температуре эти показатели восстанавливаются до уровня дикого типа [6]. Аналогичный эффект, восстанавливающий обучение и память мутанта *agn<sup>ts3</sup>*, был получен нами при воздействии ослабленного статического магнитного поля Земли (ОСМП) [7], при этом отмечено, что именно ремоделирование актинового цитоскелета является мишенью действия ОСМП. Как предложенный И.П. Павловым метод оценки выработки пищевого условного рефлекса по слюноотделению позволил вывести науки о мозге из области теософии, так и ошеломляющие, ломающие традиционные убеждения, открытия последних лет, переводят рассуждения о действии магнитных полей (МП) из категории осмеиваемого в плоскость простых и четких экспериментов, в первую очередь с использованием нашей модели на дрозофиле. При изучении магнитотаксиса у бактерий *Magnetospirillum magneticum*, способных двигаться вдоль магнитного поля Земли в поисках подходящей среды обитания, обнаружена уникальная внутриклеточная органелла магнитосома. Она образована упорядоченными цепями кристаллов Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> или Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> встроенных в мембрану за счет магнитосома-ассоциированных белков (magneto-some-associated proteins, MAPs) актинового цитоскелета. Как и F-актин эукариот, эти белки образуют высоко-динамичные филаментозные структуры как *in vivo*, так и *in vitro*. Их известно 28, они высоко консервативны от прокариот до эукариот, делеции генов, кодирующих MAPs, приводят к потере магнитотаксиса. Как и у эукариот, MAPs вовлечены в процессы обеспечения морфологии и подвижности клетки, клеточного деления и расхождения хромосом [8, 9]. Ключевой фермент ремоделирования актинового цитоскелета LIM-киназа 1 (LIMK1), фосфорилируя кофилин, маленький белок 21Д, определяет баланс между мономерным и полимерным актином. Кофилин – фактор переноса актина в ядро для непосредственного взаимодействия с комплексами ремоделиро-

вания хромосом при формировании 3D-архитектуры ядра. Кроме того, кофилин – биосенсор стрессорных воздействий, сопрягающих актиновый цитоскелет и митохондрии. Поэтому его рассматривают как функциональный узел клеточной биологии, а нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Хантингтона (БХ) и другие называют “кофилинопатиями” [3].

Указанный выше факт, что делеции генов, кодирующих MAPs, приводят к потере магнитотаксиса, описывает основной метод познания нейрофизиологии и биомедицины – противопоставление “норма” – “патология” и генетики “все или ничего”, т.е. мутант-дикий тип. Поэтому следует начинать с “патологии”, а не “нормы”, в случае изучения воздействий магнитного поля Земли – это подразумевает его экранирование или ослабление, т.е. “отсутствие действия” и не предполагает перебор всех факторов его влияния в современной среде обитания человека. Поэтому согласно современным воззрениям, экранирование статического магнитного поля (СМП) является “стрессорным воздействием” [10]. Влияние экранирования СМП описано и нами ранее [11].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили трансгенные Gal4 и UAS линии дрозофилы, представленные в биобанке Bloomington Drosophila Stock Center (США), а также в биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (ЦКП “Биокolleкция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”).

В качестве линий Gal4 – #7009 – *w[1118]; P{w+mC}=Ddc-GAL4.L}Lmpt[4.36]* (экспрессирует GAL4 в дофаминергических и серотонинергических нейронах под контролем *Ddc*). Ассоциированные гены: *Ddc* (регулятор), *Lmpt*, *GAL4*, *w*. Геномная карта: 3L (73D3-73D6).

В качестве линии UAS использовали линию #26294 – *y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]}=TRiP.JF02063}attP2* (под промотором UAS – последовательность RNAi, вызывающая деградацию LIMK1; экспрессирует dsRNA для RNAi LIMK1 (FBgn0283712) под контролем UAS в векторе VALIUM10). Ассоциированные гены: *limk1* (RNAi), *UAS* (регулятор), *y*, *v*. Геномная карта: Chr 3, 68A4, 3L:11070538.

Второй UAS линией (для TRiP RNAi линий) служила #36303 – *y[1] v[1]; P{y[+t7.7]}=CaryP}attP2* (генетический фон идентичен 26294, конструкция UAS-RNAi отсутствует). Ассоциированные гены: *y*, *v*. Геномная карта: Chr 3, 68A4, 3L:11070538.

В системе бинарного скрещивания Gal4-UAS (#7009 x #26294) в дофаминовых нейронах проис-

ходила интерференция иРНК гена *limk* (в тексте линия обозначается DорLIMK-), во второй линии (#7009 x #36303) экспрессия гена *limk* не подавлялась (в дальнейшем- DорLIMK+).

В качестве простых животных моделей в экспериментах использовали мутантные линии дрозофилы с коротким жизненным циклом, дешевым содержанием и отсутствием законодательных ограничений.

Для экранирования магнитного поля Земли совместно с ФГУ ЦНИИ КМ “Прометей” была изготовлена цилиндрическая камера, покрытая экранирующим материалом из аморфного магнетомягкого сплава АМАГ 172. Конструкция съемной крышки цилиндра с аналогичным покрытием позволяет избежать появления “магнитных дыр” в экране. Величина индукции статического МП Земли в Колтушах составляет 50 мкТл. Коэффициент экранирования по постоянной составляющей магнитного поля равен 35 (величина индукции МП внутри камеры составляет 1.4 мкТл, снаружи – 50 мкТл). Особенности физического моделирования ослабленного статического МП Земли описаны ранее [11].

Для изучения влияния ОСМП на характер хромосомных перестроек экранирование МП Земли проводили на стадии личинок 3-го возраста, отбирая их по физиологическому критерию активного перемещения по стенкам пробирок. Чтобы оценить влияние стресс-фактора на способность к обучению и формированию среднесрочной памяти, воздействию подвергали 5-ти суточных самцов в течение 12 ч. Во всех вариантах эксперимента применяли интактный контроль (без воздействия).

**Анализ перестроек анафазных хромосом клеток нервного ганглия личинок дрозофилы.** Анафазный анализ осуществляли с использованием давленных препаратов нервных ганглиев, окрашенных 4%-ным ацетоорсеином. Для каждой особи вычисляли частоту перестроек – отношение числа анафаз с перестройками к общему числу анафазных клеток в нервном ганглии личинки. Кроме того, вычисляли профиль перестроек каждого типа – мостов, фрагментов и отставших хромосом. Для этого рассчитывали отношение числа каждого из типов перестроек к общему числу aberrантных анафаз. Для обработки результатов вычислений применяли двухфакторный рандомизационный анализ. На каждую экспериментальную точку было проанализировано до 30 особей.

**Иммунохимический анализ ДЦР в клетках нервных ганглиев личинок дрозофилы.** Иммунохимическое окрашивание производили согласно протоколу, разработанному для нервных ганглиев личинок дрозофилы [12]. Использовали маркерные для ДЦР антитела к модифицированному гистону Ser137-фосфо-H2Av (Rabbit anti-Other Histone H2AvD Polyclonal Antibody-P08985 (MBS4157014)

product datasheet at MyBioSource). Ядра окрашивали DAPI (1.2 µg/ml на PBS).

Фокальные срезы анализировали в ЦКП “Конфокальная микроскопия” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 Carl Zeiss.

Для оценки способности к обучению и формированию среднесрочной памяти самцов применяли методику условно-рефлекторного подавления ухаживания. Метод основан на естественных стимулах полового поведения дрозофилы, в настоящее время называется “парадигмой отвержения”, “rejection paradigm”. Исчерпывающе описан в последних [2] и первоначальных исследованиях [13]. Суть состоит в том, что достигший половой зрелости к 5-му дню жизни самец, но до того в результате индивидуального содержания не имевший сексуального опыта, после 30 мин опыта отвержения оплодотворенной самкой (тестирование краткосрочной и среднесрочной памяти) перестает ухаживать за новой, тестерной самкой.

Исследования проводили на взрослых 5-суточных самцах при температуре  $22 \pm 0.5$  °C в первой половине дня. В качестве объектов ухаживания для самцов обеих линий использовали 5-суточных самок линии *Canton-S*, оплодотворенных за 1 сутки до эксперимента.

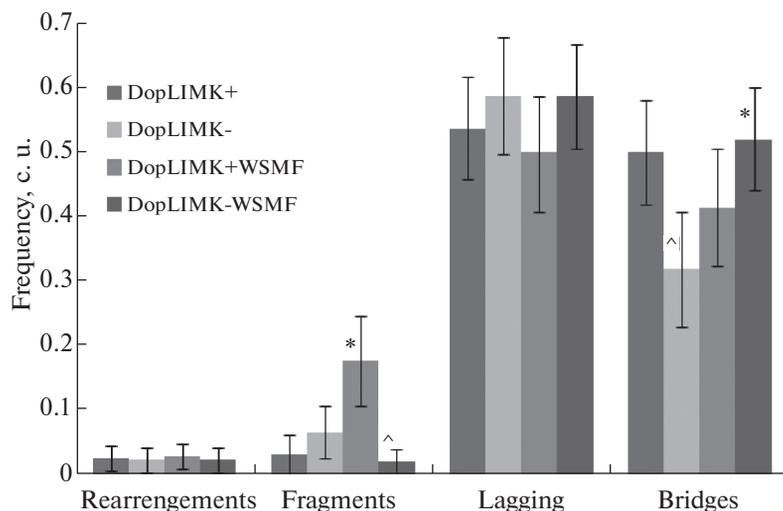
В ходе эксперимента самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру диаметром 15 мм и высотой 5 мм, изготовленную из оргстекла, вместе с оплодотворенной 5-суточной самкой *CS*. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя продолжительность отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, попытка копуляции), а также время выполнения элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Для анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы [13].

Оценку способности к обучению и формированию среднесрочной памяти проводили через разные интервалы времени: сразу после тренировки проводили анализ способности к обучению, через 3 ч оценивали среднесрочную память. В каждой группе тестировали не менее 20 пар мух. Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), т.е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи рандомизационного анализа ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функционирование нейронов тесно связано с активностью LIMK1. Этот фермент, регулируя ба-



**Рис. 1.** Сравнительный анализ частоты и профиля хромосомных перестроек в клетках нервного ганглия личинок *Drosophila melanogaster* линий DopLIMK- (Gal4-UAS (#7009 × #26294), в дофаминовых нейронах подавлена экспрессия гена *limk*) и DopLIMK+ (Gal4-UAS (#7009 × #36303), экспрессия гена *limk* не подавлена) в норме и при действии ОСМП. ^ – достоверные межлинейные различия,  $p < 0.05$ ; \* – достоверные различия от уровня перестроек в норме,  $p < 0.05$ .

ланс мономерного и полимерного актина, участвует в синаптической передаче, пластичности и формировании памяти. Актин регулирует транскрипционный выход нейромедиатора (взаимодействуя с комплексами ремоделирования хромосом, транскрипционными факторами и РНК-полимеразами) [5], а также обеспечивает внутриклеточный трафик, интернализацию и рециклирование дофаминового транспортера [14]. Следовательно, подавление LIMK1 в дофаминовых нейронах отразится как на динамике дофамина, так и функционировании актинового цитоскелета.

#### Анафазный анализ перестроек хромосом клеток нервного ганглия личинок в норме и при стрессорном воздействии ОСМП

На рис. 1 представлены данные анафазного метода регистрации перестроек хромосом во время митотического деления клеток нервного ганглия. В линии без подавления LIMK1 – DopLIMK+ при стрессорном воздействии наблюдается резкое увеличение частоты фрагментов, что позволяет полагать ДЦР мишенью действия ОСМП. Снижение экспрессии гена *limk1* в дофаминовых нейронах приводит к достоверному уменьшению профиля мостов в анафазе митоза клеток нервного ганглия личинок дрозофилы. При этом стрессорное воздействие вызывает увеличение частоты мостов.

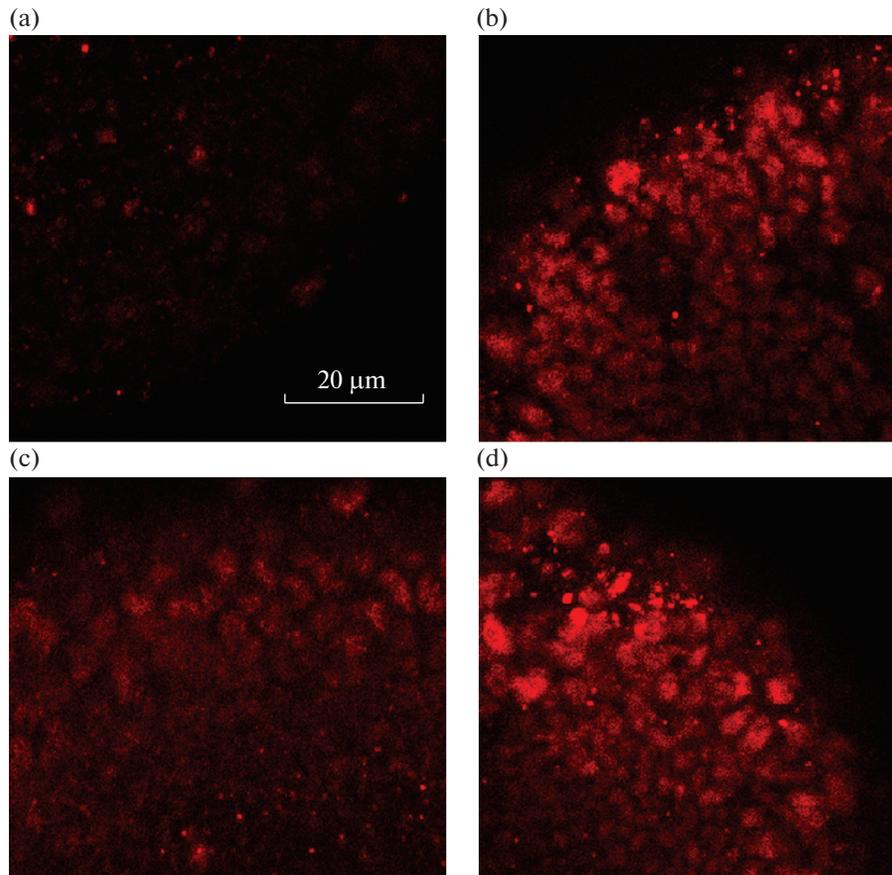
Полученные результаты подкрепляются данными конфокальной микроскопии при иммунохимическом исследовании ДЦР в нервных ганглиях личинок дрозофилы с помощью антител к маркерному модифицированному гистону Ser137-фосфо-H2Av. Как показано на рис. 2, уровень свечения ядер линии DopLIMK- слабее, чем в контрольной линии, что отражает низкий уровень ДЦР, кото-

рый визуализируется в достоверно низком профиле мостов в анафазе. После стрессорного воздействия ОСМП уровень свечения возрастает у DopLIMK-, что отражается на увеличении количества мостов. У линии DopLIMK+ высокий уровень ДЦР после стрессорного воздействия реализуется в достоверном повышении профиля фрагментов при падении числа мостов.

Можно предположить, что хромосомный аппарат клеток нервного ганглия подвержен влиянию как со стороны дофамина, так и актинового цитоскелета. Рассмотрим это более подробно:

а) Оксидативный стресс является естественной частью метаболизма дофамина и сопутствует таким заболеваниям, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и шизофрения. Избыток активных форм кислорода (АФК) сопровождается вредными побочными эффектами, такими как окисление липидов, разобщение цепи переноса электронов или повреждение ДНК, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [15].

Известно, что катехоламины, L-DOPA и дофамин могут индуцировать повреждения ДНК, активируя редокс-активные металлы, например, медь. Катехоламины обладают способностью восстанавливать Cu (II) до Cu (I) и участвовать в окислительно-восстановительном цикле меди. Предполагается, что катехоламины образуют тройной комплекс с ДНК и Cu (II), облегчая окислительно-восстановительный цикл меди и генерируя АФК, что, в свою очередь, может приводить к разрывам ДНК [15]. При стрессорном воздействии ОСМП происходит накопление АФК в клетках с аэробным дыханием [16]. По-видимому, этим и объясняется



**Рис. 2.** Иммунохимический анализ двухцепочечных разрывов в нервных ганглиях личинок дрозофилы с помощью анти-тел к маркерному модифицированному гистону Ser137-фосфо-H2Av. (a) Изображение ядер нервного ганглия линии DopLIMK- без стрессорного воздействия. (b) Изображение ядер нервного ганглия линии DopLIMK- после стрессорного воздействия ОСМП. (c) Изображение ядер нервного ганглия линии DopLIMK+ без стрессорного воздействия. (d) Изображение ядер нервного ганглия линии DopLIMK+ после стрессорного воздействия ОСМП.

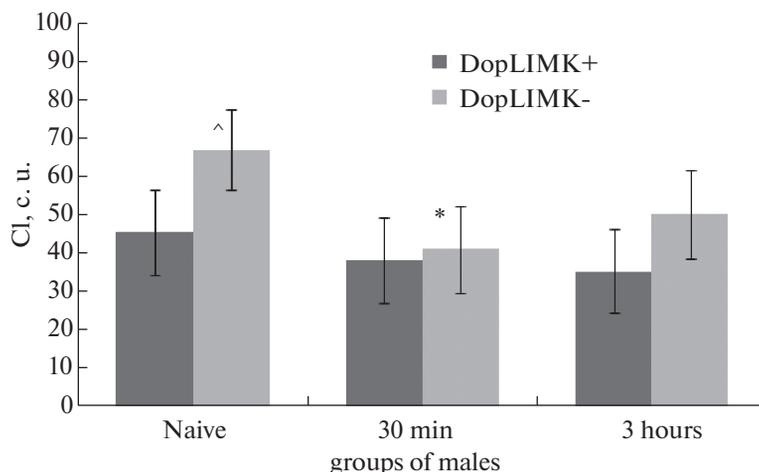
увеличение частоты фрагментов и мостов в анафа-зе деления нейронов при ОСМП.

б) Можно выделить два возможных способа регуляции целостности хромосомного аппарата каскадом ремоделирования актинового цитоскелета. Во-первых, обнаружена локализация LIMK1 в центросоме митотически делящейся клетки. Фосфорилирование LIMK1 регулирует цитоплазматические функции динеина (партнерного белка LIMK1) в отношении транспорта центросомных белков [17]. При гиперактивности динеина у почкующихся дрожжей наблюдаются чрезмерное движение митотического веретена и увеличение частоты двухцепочечных разрывов ДНК [18]. Во-вторых, динамика цитоскелета влияет на репарацию ДНК. Показано, что перемещение районов ДЦР в субъядерный домен для репарации ДНК осуществляется посредством полимеризованного актина. Инактивация механизмов релокации поврежденных участков хромосом приводит к дефектам репарации и нестабильности генома [19]. Таким образом, целостность генетического аппарата соблюда-

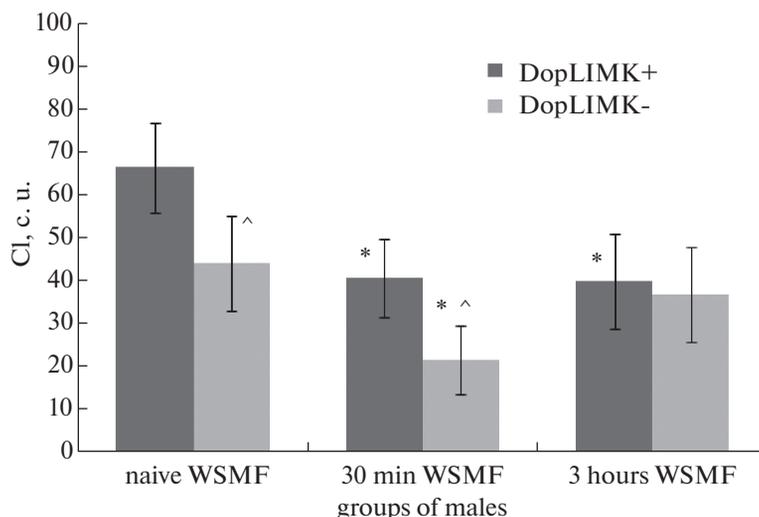
ется при балансе двойственных функций каскада ремоделирования актина. С одной стороны, активностью гена *limk 1* может быть обусловлен высокий профиль мостов у DopLIMK+ по сравнению с линией DopLIMK-. С другой стороны, при действии ОСМП наличие редокс-чувствительных сайтов у ГТФаз Rho и актина создает возможность регулирования соответствующих каскадов свободными радикалами [20]. Результатом изменения уровня LIMK1 может стать деполимеризация актиновых филаментов и, соответственно, дефекты репарации, приводящие к увеличению частоты мостов и фрагментов у изучаемых линий.

#### **Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти самцов дрозофилы в норме и при стрессорном воздействии ОСМП**

На рис. 3 представлены данные по обучению и формированию памяти у самцов изучаемых линий в нормальных условиях. Изначально низкий ИУ линии DopLIMK+ не изменился сразу и через 3 ч после 30 мин тренировки, что свидетельствует о дефекте способности к обучению и формированию



**Рис. 3.** Сравнительный анализ индекса ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* линий DopLIMK- (Gal4-UAS (#7009 x #26294), в дофаминовых нейронах подавлена экспрессия гена *limk*) и DopLIMK+ (Gal4-UAS (#7009 x #36303), экспрессия гена *limk* не подавлена) в нормальных условиях. <sup>^</sup> – достоверные межлинейные различия,  $p < 0.05$ ; \* – достоверные отличия от уровня наивных самцов,  $p < 0.05$ .



**Рис. 4.** Сравнительный анализ индекса ухаживания самцов *Drosophila melanogaster* линий DopLIMK- (Gal4-UAS (#7009 x #26294), в дофаминовых нейронах подавлена экспрессия гена *limk*) и DopLIMK+ (Gal4-UAS (#7009 x #36303), экспрессия гена *limk* не подавлена) после стрессорного воздействия ОСМП. <sup>^</sup> – достоверные межлинейные различия,  $p < 0.05$ ; \* – достоверные отличия от уровня наивных самцов ОСМП,  $p < 0.05$ .

среднесрочной памяти. Оказалось, что низкий уровень LIMK1 в дофаминовых нейронах (линия DopLIMK-) способствует увеличению активности ухаживания, приводит к нормализации способности к обучению (падение индекса ухаживания), но не влияет на формирование среднесрочной памяти.

Показатели ИУ после стрессорирующего воздействия ОСМП представлены на рис. 4. У линии DopLIMK+ достоверно увеличился ИУ наивных самцов, после 30 мин тренировки с оплодотворенной самкой ИУ упал и сохранился на том же уровне через 3 ч. Таким образом, воздействие

ОСМП повлияло на процессы обучения и формирования среднесрочной памяти. У линии с низким содержанием LIMK1 наблюдали падение ИУ наивных самцов, однако после 30 мин тренировки ИУ достоверно снизился, что свидетельствует о способности к обучению самцов DopLIMK- после ОСМП. Через 3 ч ИУ увеличился и достоверно не отличался от уровня наивных самцов. ОСМП не повлияло на формирование памяти линии DopLIMK-.

Таким образом, полученные данные подтвердили результаты предыдущих исследований – мишенью действия ОСМП является каскад ремоделиро-

вания актина и, как показала настоящая работа, LIMK1 дофаминовых нейронов.

Интересно сопоставить полученные данные с результатами аналогичного исследования, проведенного в нашей лаборатории, но с использованием другой, более изученной модели синдрома Уильямса – мутанта по гену для LIMK1 – *agn<sup>ts3</sup>* [6]. Уникальность данной модели состоит в том, что повышение и снижение уровня LIMK1 достигаются температурным воздействием с последующим изменением когнитивного профиля, без использования конструкторов, влияющих на обучение и память. Для *agn<sup>ts3</sup>* в норме характерен повышенный уровень LIMK1, сопровождаемый дефектами обучения и памяти, а также локомоторной активности. Сходными свойствами обладает линия *DopLIMK+*. После ТШ и воздействия ОСМП наблюдаются падение уровня LIMK1 у *agn<sup>ts3</sup>* и восстановление когнитивных функций до уровня линии дикого типа *Canton S* [21]. Таким образом, снижение уровня LIMK1 приводит к восстановлению способности к обучению и формированию памяти, что характерно и для линии *DopLIMK-*, но не относится к среднесрочной памяти. В работе Г.А. Захарова показано, что при воздействии ОСМП у *agn<sup>ts3</sup>* наблюдается падение уровня LIMK1 и БТШ70 [21]. Там же впервые и обосновано положение о том, что сравнение действия теплового шока и воздействия ОСМП выявляют, что воздействием ОСМП может сопровождаться оксидативным стрессом, подтверждается и в работах других исследователей [22].

Интересно, что у линии *DopLIMK+* (аналог *agn<sup>ts3</sup>*) в норме наблюдается низкий уровень ухаживания, который увеличивается после ОСМП, возможно, за счет падения LIMK1, с чем связано и восстановление когнитивных показателей. Воздействие ОСМП на когнитивные функции, по-видимому, обусловлено как регуляцией уровня LIMK1 свободными радикалами редокс-чувствительных сайтов ГТФаз Rho [20], так и влиянием низкого уровня БТШ70 на обучение и формирование памяти [2].

Таким образом, воздействие ОСМП выявило участие дофамин- и серотонинергических нейронов в формировании стрессорной реакции организма, при том, что литературные данные свидетельствуют об участии дофамина в “системе вознаграждения”, в мотивации и внимании, лежащих в основе поведенческой реакции на важные события, будь то отталкивающие или привлекающие стимулы [23]. Также показана роль уровня LIMK1 дофамин- и серотонинергических нейронов в стрессорном ответе, как на геномном, так и на поведенческом уровнях. В связи с этим представляется неслучайным участие БТШ в организации активного цитоскелета и гомодимеризации LIMK1 [24]. Все вышесказанное свидетельствует в пользу

гипотезы об эволюционной связи механизмов, ответственных за развитие стрессорных реакций и реализацию когнитивных процессов – обучения и памяти.

Но еще более неожиданным открытием, нежели обнаружение магнитосом, стало вскрытие общих механизмов регуляции циркадного ритма и магниторецепции. И произошло оно именно с использованием дрозофилы. Ссылки на предшествующие работы приведены в обзоре 2021 г. [25]. Суть в том, что белки-криптохромы (CRYs) выполняют функции рецепторов голубого света, вовлеченных во многие физиологические процессы практически у всех представителей животного царства. В последние годы они стали наиболее вероятными кандидатами участия в зависимой от освещенности, меняющейся соответственно времени года, магниторецепции. CRYs животных подразделяются на несколько типов: тип 1 – насекомые, тип 2 – млекопитающие, тип 4 – птицы, рыбы, черепахи. Что важно – типы 1 и 2 являются регуляторами циркадного ритма. Что еще более важно – на дрозофиле показано, что эффекты магнитного поля Земли (в нашем случае – их экранирование) наблюдаются тогда, когда изменения поля осуществляются в темную фазу суток. В нашем случае, коль скоро физиологические проявления дрозофилы жесточайшим образом зависимы от циркадного ритма, 12-часовое экранирование магнитного поля Земли осуществляли именно в это время, освещение в помещениях для разведения и опытов на дрозофиле автоматически выключается в 20 ч, включается в 8 ч утра. Karki N. и соавт. особо указывают на то, что CRY-зависимые от магнитного поля эффекты наблюдаются у дрозофилы – это спайковая активность нейронов, локомоторная активность и поведение в Т-образных лабиринтах. Как минимум, этот набор проявлений и предопределяет совокупный результат феномена условно-рефлекторного подавления ухаживания у дрозофилы.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030) (тема 63.1) и гранта РФФИ (№ 20-015-00300 А).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.А.Н., А.В.М.). Написание статьи и обработка данных (А.В.М.). Постановка цели и задач, подбор научной литературы (Е.А.Н.). Постановка поведенческих экспери-

ментов (Е.С.З., С.К.Т., С.А.В.). Постановка цитогенетических экспериментов (Е.В.Т., А.В.Р.). Оформление статьи (С.А.В.). Обработка данных, дизайн эксперимента (Б.Ф.Щ.). Общее руководство, написание статьи (Е.В.С.-П.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобашев МЕ, Савватеев ВБ (1959) Физиология суточного ритма животных. — М.; Л.: Наука. [Lobashev ME, Savvateev VB (1959) Fiziologija su-tochnogo ritma zhivotnyh. — М.; Л.: Nauka (In Russ)].
2. Zatschina OG, Nikitina EA, Shilova VY, Chuyakova LN, Sorokina S, Vorontsova JE, Tokmacheva EV, Funikov SY, Rezyukh AP, Evgen'ev MB (2021) Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones* 26 (3): 575–594. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01203-7>
3. Nikitina EA, Medvedeva AV, Zakharov GA, Savvateeva-Popova EV (2014) The *Drosophila* agnostic locus: involvement into formation of cognitive defects in Williams's syndrome. *Acta Naturae* 6 (2): 53–61. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-2-53-61>
4. Медведева АВ, Молотков ДА, Никитина ЕА, Попов АА, Карагодин ДА, Баричева ЕМ, Савватеева-Попова ЕВ (2008) Системная регуляция генетических и цитогенетических процессов сигнальным каскадом ремоделирования актина: locus *agnostic* дрозофилы. *Генетика* 44 (6): 669–681 [Medvedeva AV, Molotkov DA, Nikitina EA, Popov AV, Karagodin DA, Baricheva EM, Savvateeva-Popova EV (2008) Systemic regulation of genetic and cytogenetic processes by a signal cascade of actin remodeling: locus *agnostic* in *Drosophila*. *Russ J Genetics* 44 (6): 771–783.] (In Russ). <https://doi.org/10.1134/S1022795408060069>.
5. Mitsu S, Takebayashi M, Kei M (2017) Nuclear actin in development and transcriptional reprogramming. *Front Genet* 8: 27. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00027>
6. Никитина ЕА, Каминская АН, Молотков ДА, Попов АВ, Савватеева-Попова ЕВ (2014) Влияние теплового шока на поведение ухаживания, звукопродукцию и обучение в сопоставлении с содержанием ЛІМК1 в мозге самцов *Drosophila melanogaster* с измененной структурой гена *limk1*. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии* 50 (2): 137–146 [Nikitina EA, Kaminskaya AN, Molotkov DA, Savvateeva-Popova EV, Popov AV (2014) Effect of heat shock on courtship behavior, sound production, and learning in comparison with the brain content of *limk1* in *Drosophila melanogaster* males with altered structure of the *limk1* gene *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 50 (2): 154–166]. <https://doi.org/10.1134/S0022093014020082>.
7. Vasilieva SA, Tokmacheva EV, Medvedeva AV, Ermilova AA, Nikitina EA, Shchegolev BF, Surma SV, Savvateeva-Popova EV (2020) The role of parental origin of chromosomes in the instability of the somatic genome in *Drosophila* brain cells and memory trace formation in norm and stress. *Cell and Tissue Biology* 14 (3): 178–189. <https://doi.org/10.1134/S1990519X20030074>
8. Toro-Nahuelpan M, Müller FD, Klumpp S, Plitzko JM, Bramkamp M, Schüler D (2016) Segregation of prokaryotic magnetosomes organelles is driven by treadmilling of a dynamic actin-like MamK filament. *BMC Biol.* 14 (1): 88. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0290-1>
9. McCausland HC, Komeili A (2020) Magnetic genes: Studying the genetics of biomineralization in magnetotactic bacteria. *PLoS Genet* 16 (2): e1008499. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008499>
10. Erdmann W, Idzikowski B, Kowalski W, Szymański B, Kosicki JZ, Kaczmarek L (2017) Can the tardigrade *Hypsibius dujardini* survive in the absence of the geomagnetic field? *PLoS One* 12 (9): e0183380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183380>
11. Никитина ЕА, Медведева АВ, Герасименко МС, Проников ВС, Сурма СВ, Щеголев БФ, Савватеева-Попова ЕВ (2017) Ослабленное магнитное поле Земли: влияние на транскрипционную активность генома, обучение и память у *Dr. melanogaster*. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова* 67 (2): 246–256. [Nikitina EA, Medvedeva AV, Gerasimenko MS, Pronikov VS, Surma SV, Shchegolev BF, Savvateeva-Popova EV (2017) Weakened geomagnetic field: impact on transcriptional activity of the genome, learning and memory formation in *Dr. melanogaster*. *Zhurnal VND* 67 (2): 246–256.]. <https://doi.org/10.7868/S0044467717020101>.
12. Wu JS, Luo L (2006) A protocol for dissecting *Drosophila melanogaster* brains for live imaging or immunostaining. *Nat Protoc* 1: 2110–2115. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.336>
13. Kamyshev NG, Iliadi KG, Bragina JV (1999) *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learn Mem Cold Spring Harb* 6: 1–20.
14. Trouillon R, Ewing AG (2014) Actin controls the vesicular fraction of dopamine released during extended kiss and run exocytosis. *ACS Chem Biol* 21; 9 (3): 812–20. <https://doi.org/10.1021/cb400665f>
15. Rehmani N, Zafar A, Arif H, Hadi SM, Wani AA (2017) Copper-mediated DNA damage by the neurotransmitter dopamine and L-DOPA: A pro-oxidant mechanism. *Oxicol In Vitro* 40: 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.020>
16. Spivak IM, Kuranova ML, Mavropulo-Stolyarenko GR, Surma SV, Shchegolev BF, Stefanov VE (2016) Response to extremely weak static magnetic fields. *Biophysics* 61 (3): 435–439.
17. Ou S, Tan MH, Weng T, Li HY, Koh CG (2018) LIM kinase1 regulates mitotic centrosome integrity via its activity on dynein light intermediate chains. *Open Biol.* 8:170202. <https://doi.org/10.1098/rsob.170202>
18. Estrem C, Moore JK (2020) Help or hindrance: how do microtubule-based forces contribute to genome damage and repair? *Current Genetics* 66: 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01033-2>
19. Caridi CP, Plessner M, Grosse R, Chiolo I (2019) Nuclear actin filaments in DNA repair dynamics. *Nat Cell Biol* 21 (9): 1068–1077. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0379-1>

20. *Heo J* (2011) Redox control of GTPases: from molecular mechanisms to functional significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal* 14: 689–724. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2984>
21. *Захаров ГА* (2012) Молекулярно-генетические исследования роли компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в генезисе поведенческих нарушений *Drosophila melanogaster*. Автореф. канд. дис. СПб. [Zaharov G.A. (2012) Molekuljarno-geneticheskie issledovanija roli komponentov signal'nogo kaskada remodelirovanija aktina v genezise povedencheskih narushenij *Drosophila melanogaster*. Avtoref kand dis SPb (In Russ)].
22. *Coballase-Urrutia E, Navarro L, Ortiz JL, Verdugo-Díaz L, Gallardo JM, Hernández ME, Estrada-Rojo F* (2018) Static Magnetic Fields Modulate the Response of Different Oxidative Stress Markers in a Restraint Stress Model Animal Biomed Res Int 2018: 3960408. <https://doi.org/10.1155/2018/3960408>
23. *Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A* (2004) Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using raclopride. *J Neurosci* 24 (11): 2825–2831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3422-03.2004>
24. *Li R, Soosairajah J, Harari D, Citri A, Price J, Ng HL, Morton CJ, Parker MW, Yarden Y, Bernard O* (2006) Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homo-dimerization. *FASEB J* 20 (8):1218–20. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5258fje>
25. *Karki N, Vergish S, Zoltowski BD* (2021) Cryptochromes: Photochemical and structural insight into magnetoreception. *Protein Sci* 30 (8): 1521–1534. <https://doi.org/10.1002/pro.4124>

## Role of LIM Domain Kinase 1 in Dopaminergic and Serotonergic Neurons in *Drosophila* Genome Stability, Learning and Memory during Stress Response to Weakening of Earth's Geomagnetic Field

A. V. Medvedeva<sup>a</sup>, A. V. Rebrova<sup>b</sup>, E. S. Zalomaeva<sup>a,b</sup>, S. K. Turaeva<sup>b</sup>, E. A. Nikitina<sup>a,b</sup>,  
E. V. Tokmacheva<sup>a</sup>, S. A. Vasileva<sup>a,b</sup>, B. F. Shchegolev<sup>a</sup>, and E. V. Savvateeva-Popova<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

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

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

The paper continues the cycle of studies on the evolutionary link between the mechanisms of stress response formation and cognitive functions, which was started in 1959 by M.E. Lobashev and V.B. Savvateev. We explore the role of a key neuroplasticity factor LIM domain kinase 1 (LIMK1) expressed in dopaminergic and serotonergic neurons in *Drosophila* genome stability, as well as learning and memory, both in standard conditions and when an organism exhibits a stress response to the weakening of Earth's static magnetic field (WSMF). We demonstrate that a low LIMK1 level promotes learning, but not the formation of intermediate-term memory; at the same time, stress exposure restores the ability to learn and form memory in the *Drosophila* strain with an increased LIMK1 content. We identify inter-strain differences in the frequency of DNA double-strand breaks (DSBs) and show an increase in DSBs after the exposure to WSMF. The obtained data reveal the role of dopaminergic and serotonergic neurons not only in cognitive functions, but also as WSMF targets in the development of a stress response.

**Keywords:** LIMK1, dopaminergic and serotonergic neurons, double-stranded DNA breaks, Earth's weakened static magnetic field, learning, memory

## ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОЙ РАНЖИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОЦИТОВ ТИХООКЕАНСКОЙ УСТРИЦЫ *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG, 1793)

© 2022 г. Е. С. Кладченко<sup>1,\*</sup>, А. Ю. Андреева<sup>1</sup>, Т. А. Кухарева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

\*e-mail: kladchenko\_ekaterina@bk.ru

Поступила в редакцию 28.05.2021 г.

После доработки 27.09.2021 г.

Принята к публикации 20.10.2021 г.

При помощи методов проточной цитометрии и световой микроскопии исследовано влияние краткосрочной (24 ч) ранжированной гипоксии на морфофункциональные показатели гемоцитов тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*). Контрольная группа содержалась при 100% уровне насыщения воды кислородом, экспериментальные животные – при умеренной (30% насыщение кислородом) и глубокой гипоксической нагрузке (3% насыщение кислородом). Показано, что гипоксия не оказывала влияния на морфометрические характеристики гемоцитов, однако, индуцировала существенные изменения в функциональных параметрах клеток и приводила к сдвигам клеточного состава гемолимфы. У устриц, содержащихся в условиях умеренного дефицита кислорода, зафиксировано развитие компенсаторного ответа на гипоксию: увеличение числа гранулоцитов на 20%, усиление спонтанной продукции активных форм кислорода (АФК) агранулоцитов (на 40%) и гранулоцитов (на 90%). Глубокая кратковременная гипоксия достоверно ингибировала способность гемоцитов к генерации окислительного взрыва и индуцировала снижение относительного числа гранулярных клеток (процент от общего числа клеток в гемолимфе), что свидетельствует о неспособности устриц поддерживать нормальное функциональное состояние при 3% уровне насыщения воды кислородом.

**Ключевые слова:** устрицы, гипоксия, иммунитет, гемоциты, активные формы кислорода

**DOI:** 10.31857/S004445292201003X

Дефицит кислорода является одним из наиболее значимых факторов окружающей среды, оказывающих влияние на жизнедеятельность гидробионтов [1]. В литоральных и сублиторальных зонах гипоксия может формироваться в результате естественных циклов колебания уровня растворенного кислорода или эвтрофикации [2]. Длительность гипоксического воздействия в естественных условиях может варьировать от нескольких часов до нескольких месяцев. Устойчивая гипоксия считается основной причиной снижения биоразнообразия водной среды обитания [3]. Краткосрочная гипоксия, в свою очередь, может негативно влиять на функциональное состояние гидробионтов. Воздействию гипоксии в особенности подвержены бентосные и малоподвижные виды гидробионтов, в том числе и двусторчатые моллюски [4]. Стоит отметить, что многие виды двусторчатых моллюсков интенсивно выращиваются по всему миру, приобретая не только биологическую, но и экономическую значимость [5]. Тихоокеанская устрица (*Crassostrea gigas*, Thunberg 1973) считается одним

из основных мировых объектов марикультуры, что объясняется ее высокой скоростью роста, эвригалинностью, широким адаптивным потенциалом к дефициту кислорода и колебанию температуры [6]. Оптимальными условиями кислородного режима для гидробионтов и для двусторчатых моллюсков, в частности, является концентрация растворенного кислорода в воде на уровне 7.5–9 мг O<sub>2</sub> л<sup>-1</sup>. Однако *C. gigas* зачастую населяют мелководные прибрежные зоны, для которых характерны эвтрофикация и плохое перемешивание воды, вследствие чего такие зоны могут становиться гипоксичными [7–9]. Отмечено, что при снижении концентрации кислорода ниже 3 мг O<sub>2</sub> л<sup>-1</sup> в организме устриц наблюдались различные физиологические нарушения, низкая сопротивляемость бактериальным патогенам, снижение скорости роста и уровня выживаемости отдельных особей [10–14].

В Черном море тихоокеанская устрица культивируется более 40 лет [15]. Для выращиваемых видов большое значение имеет понимание механизмов и последствий воздействия естественных фак-

торов среды на иммунную систему. Последнее обуславливает высокий интерес к изучению вопросов влияния стрессовых факторов окружающей среды на способность иммунитета противостоять инфекционным агентам [16]. Гемоциты, циркулирующие в гемолимфе моллюсков, считаются основным типом клеток, отражающим физиологический статус организма, вследствие своей обширной функциональной роли, состоящей в участии в процессах восстановления раковины, пищеварения, транспорта питательных веществ и внутренних защитных иммунных реакций [16–19].

Клеточный иммунный ответ моллюсков включает в себя фагоцитоз, инкапсуляцию, ферментативную деструкцию патогенов, а также выброс активных форм кислорода (АФК) [20]. В основе гуморального компонента иммунной системы двустворчатых моллюсков лежит продукция лектинов С-типа, антимикробных и пептидогликан-распознающих белков и некоторых других соединений [21–23]. Влиянию гипоксии на функциональное состояние гемоцитов и их способности к иммунному ответу посвящено множество работ. Так, инкубация *Perna viridis* в условиях дефицита кислорода индуцирует снижение продукции АФК [23, 24], с другой стороны у *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus coruscus*, *Chlamys farreri* краткосрочная гипоксия приводит к увеличению данного показателя [25–27]. Известно, что дефицит кислорода приводит к снижению общего числа гемоцитов [24, 25, 28, 29] и изменению их соотношения в гемолимфе [25, 26]. Соотношение типов гемоцитов рассматривают как показатель эффективности клеточного иммунного статуса организма, поскольку гранулярные гемоциты в большей степени способны к иммунному ответу в сравнении с агранулярными [30]. Вместе с тем, доля гранулярных клеток у *Mytilus coruscus* снижалась после инкубации при 2 мг  $O_2$  л<sup>-1</sup> [25], а у *Mytilus galloprovincialis* после суточной экспозиции при 0.3 мг  $O_2$  л<sup>-1</sup> данный показатель увеличился [26]. Основываясь на представленных данных, можно предположить, что гипоксическое воздействие в зависимости от степени и длительности может оказывать как стимулирующий, так и угнетающий эффект на клеточный иммунный компонент моллюсков. Границы адаптивного потенциала к недостатку кислорода особенно важно оценивать для объектов массовой марикультуры, поскольку в производственном цикле на ферме во время транспортировки, сортировки и перераспределения по садкам, моллюски часто сталкиваются с краткосрочным дефицитом кислорода, продолжительностью до 24 ч. Вместе с тем, непродолжительное, но глубокое гипоксическое воздействие может выходить за границы адаптивного потенциала объектов культивирования.

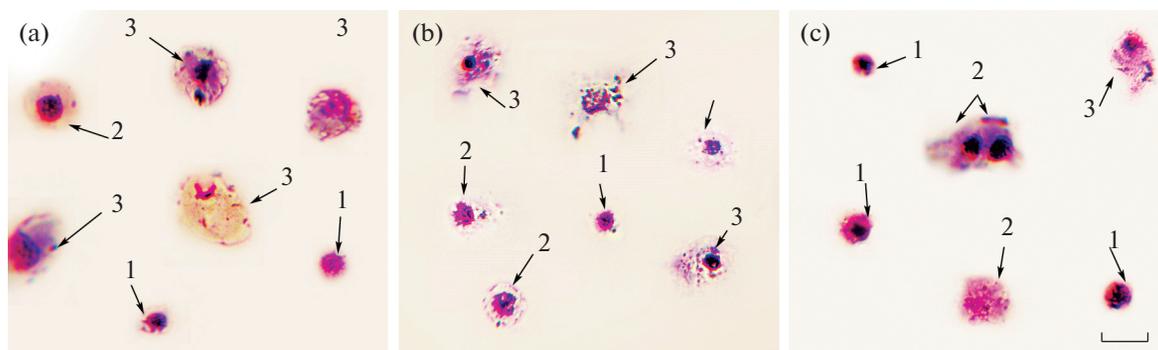
Цель настоящей работы – исследовать влияние краткосрочной гипоксии различной степени на

морфофункциональные характеристики клеток гемолимфы у массового объекта марикультуры – двустворчатого моллюска *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тихоокеанских устриц (*C. gigas*,  $n = 30$ , массой  $8.6 \pm 0.4$  г, длина раковины  $25.4 \pm 1.4$  мм) получили с устрично-мидийной фермы (Севастопольская бухта, г. Севастополь). Для адаптации к лабораторным условиям и снятия стресса после транспортировки устриц содержали в течение недели в емкостях с проточной морской водой (содержание кислорода – 7.9 мг/л (100% насыщения воды кислородом); температура 22°C, соленость 19.5‰, рН  $8.1 \pm 0.01$ ). В период акклиматизации моллюсков кормили смесью микроводорослей (5–10 мл смеси на каждые 50 л аквариумной воды, концентрация клеток  $2–3 \times 10^6$  на мл). Контрольную группу моллюсков ( $n = 10$ ) содержали при концентрации кислорода 7.9 мг/л. Гипоксию *in vivo* создавали путем продувания морской воды газообразным азотом в течение 1.5–2 ч до достижения концентрации растворенного кислорода 30% (концентрация кислорода – 2.4 мг/л) ( $n = 10$ ) и 3% (концентрация кислорода – 0.2 мг/л) ( $n = 10$ ) от контрольного уровня. После достижения желаемого уровня гипоксического воздействия моллюсков содержали в воде с дефицитом кислорода в течение суток. Концентрацию растворенного кислорода в экспериментальных и контрольных аквариумах контролировали при помощи кислородомера Ohaus Starter 300 D (США), оборудованного температурным датчиком. Постоянство концентрации растворенного кислорода в экспериментальных аквариумах достигалось за счет периодической аэрации воды. Соленость и рН контролировали при помощи солемера ST20S (Ohaus, США) и рН-метра ST2100-F (Ohaus, США). Уровень рН морской воды, соленость и температура были идентичны у контрольной и экспериментальных групп и соответствовали периоду акклимации.

По окончании 24 ч воздействия гипоксии проводили отбор гемолимфы. Образцы гемолимфы (0.5–1 мл) отбирали из сердца стерильным шприцем, трижды отмывали в стерильной фильтрованной морской воде (300 г, 5 мин). В анализе проводили индивидуальный анализ проб, полученных от одного моллюска. Для оценки морфометрических характеристик клеток из осажденных гемоцитов готовили мазки и окрашивали по методу Паппенгейма [31]. На каждом мазке анализировали не менее 1000 клеток. У каждого гемоцита оценивали морфологические показатели и измеряли наибольший диаметр ядра и клетки (без учета псевдоподий). Ядерно-плазматическое отношение рассчитывали как отношение диаметра ядра к диаметру клетки [32, 33]. Функциональные характеристики



**Рис. 1.** Морфологическая характеристика гемоцитов Тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) в условиях нормоксии и гипоксии. (а) Нормоксия. (б) Морфология клеток гемолимфы в условиях 30%-ного насыщения воды кислородом. (с) Морфология клеток гемолимфы при 3%-ном насыщении воды кислородом. 1 – агранулоциты, 2 – гиалиноциты, 3 – гранулоциты. Окраска мазков проводилась по комбинированному методу Паппенгейма. Мазки анализировались при помощи светового микроскопа (Biomed PR-2 Lum), оборудованного камерой (Levenhuk C NG Series). Шкала – 10 мкм.

гемоцитов анализировали методом проточной цитометрии (цитометр FC500, Beckman Coulter) при помощи программы Flowing Software 5.2. Для оценки содержания ДНК и пролиферативной активности в клетках гемоциты окрашивали красителем SYBR Green I (Sigma Aldrich) по методике, описанной ранее [34]. Идентификацию типов гемоцитов и определение их процентного содержания относительно общего числа клеток в суспензии проводили на двухпараметрических цитограммах на основании распределения SYBR Green-позитивных частиц по относительному размеру (прямое рассеяние, FS) и гранулярности (боковое рассеяние, SS). Уровень смертности гемоцитов определяли с использованием флуоресцентного красителя йодистого пропидия (PI, Sigma Aldrich) [32]. Способность клеток гемолимфы к спонтанной продукции активных форм кислорода оценивали по флуоресценции красителя 2–7-дихлорфлуоресцеиндиацетат (DCF-DA; Merck, Германия) по стандартному протоколу окрашивания [32].

Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе RStudio V. 4.0.5. Тест Колмогорова–Смирнова показал, что распределение размерных характеристик гемоцитов не подчиняется закону нормального распределения. Для анализа значимости гипотезы о наличии различий между выборками результатов микроскопических исследований применяли U-критерий Манна–Уитни. Результаты цитометрических исследований анализировались при помощи дисперсионного анализа (One way ANOVA) и теста Тьюки (Tukey). Критический уровень значимости был принят за 0.05. Результаты представлены в виде  $\bar{x} \pm SE$  (средняя и ошибка среднего).

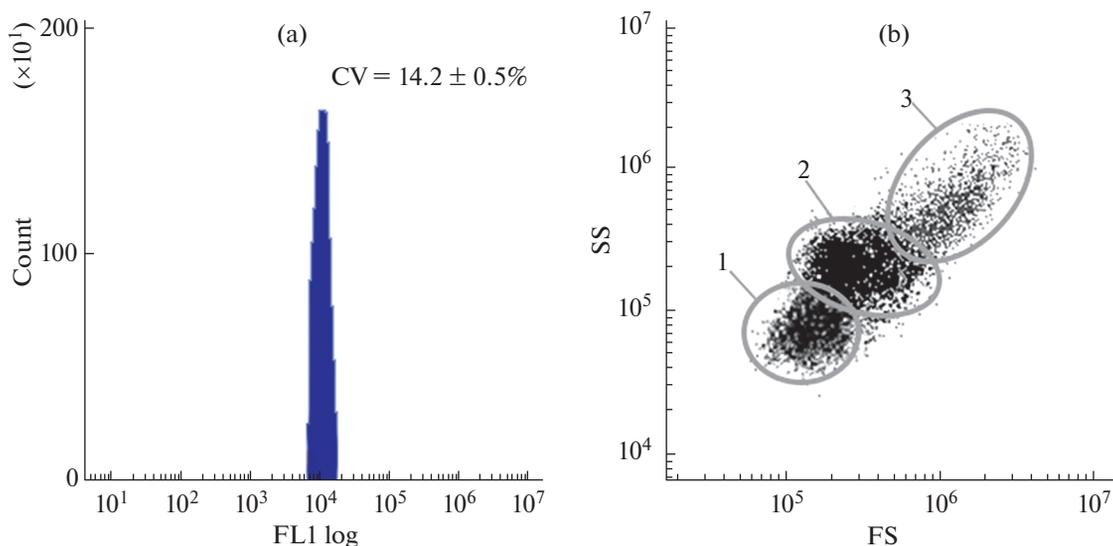
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методом световой микроскопии в гемолимфе устриц идентифицировали 3 типа клеток – аграну-

лоциты, гиалиноциты и гранулоциты (рис. 1а–с). Агранулоциты – клетки наименьшего размера диаметром  $8.9 \pm 0.4$  мкм. Морфологическими особенностями агранулоцитов были следующие: преимущественно округлая форма, высокое ядерно-плазматическое отношение ( $0.6 \pm 0.03$  у.е.), отсутствие гранулярных включений в цитоплазме и псевдоподий.

Клетки с наибольшим диаметром – гранулоциты, имели низкое ядерно-плазматическое отношение ( $0.4 \pm 0.04$  у.е.), цитоплазма содержала базофильные и эозинофильные гранулярные включения, а ядро располагалось преимущественно ацентрично. Кроме этого, гранулярные клетки формировали псевдоподии. Диаметр гиалиноцитов составлял  $10.2 \pm 0.8$  мкм, диаметр ядра  $5.7 \pm 0.4$  мкм. Гиалиноциты, как и гранулоциты, имели псевдоподии, но в цитоплазме гранулярные включения отсутствовали, а ядро располагалось преимущественно в центре клетки. Пик флуоресценции ДНК-специфического красителя SYBR Green I для контрольной и экспериментальных групп соответствовал диплоидному набору хромосом без признаков деления (рис. 2а). Методом проточной цитометрии, на основании распределения частиц по прямому (FS) и боковому (SS) рассеянию, было установлено наличие 3 субпопуляций клеток с различным относительным размером и уровнем гранулярности (рис. 2б). В гемолимфе устриц преобладали агранулярные клетки – агранулоциты ( $37.5 \pm 14.2\%$ ) и гиалиноциты ( $58.8 \pm 15.7\%$ ). Относительное число гранулоцитов контрольной группы составило  $8.8 \pm 4.6\%$ . Подробнее классификация типов гемоцитов описана в нашей предыдущей работе [35].

Суточная гипоксия не оказывала влияния на морфометрические характеристики гемоцитов устриц, однако существенно повлияла на соотношение типов гемоцитов в гемолимфе (рис. 3). Инкубация в условиях 30%-ного насыщения во-



**Рис. 2.** Идентификация субпопуляций гемоцитов Тихоокеанской устрицы методом проточной цитометрии. (а) Гистограмма содержания ДНК в гемоцитах устриц. Клетки суспендировали в стерильной фильтрованной морской воде (концентрация клеток  $1-2 \times 10^6$  клеток  $\text{мл}^{-1}$ ), инкубировали с SYBR Green I в течение 40 мин в темноте (финальная концентрация красителя в пробе 10 мкМ). (б) Распределение клеток гемолимфы устриц на основании величин относительного размера и гранулярности, демонстрирующее три популяции гемоцитов (1 – агранулоциты; 2 – гиалиноциты; 3 – гранулоциты). Графики представлены для контрольной группы моллюсков ( $n = 10$ ).

ды кислородом привела к значительному увеличению относительного числа гранулоцитов (на 20%,  $p < 0.05$ ) (рис. 3с), доля агранулоцитов и гиалиноцитов при этом не изменилась. После суток в условиях 3%-ного содержания кислорода от уровня нормоксии в гемолимфе устриц на 58% возросло относительное содержание агранулоцитов (рис. 3а), содержание гиалиноцитов при этом снизилось на 50% (рис. 3б). Уровень смертности клеток гемолимфы не превышал 2% как в контрольных, так и в опытных группах. Изменений пролиферативной активности клеток гемолимфы при гипоксии не зафиксировано.

Инкубация устриц в условиях 30%-ного насыщения воды кислородом привела к усилению спонтанной продукции активных форм кислорода: у агранулоцитов в среднем на 40% (рис. 4а), а гранулоцитов более чем на 90%. Вместе с тем умеренная гипоксическая нагрузка не оказала существенного влияния на продукцию АФК гиалиноцитами. Экспозиция при 3%-ном насыщении воды кислородом ингибировала продукцию АФК всех типов клеток (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

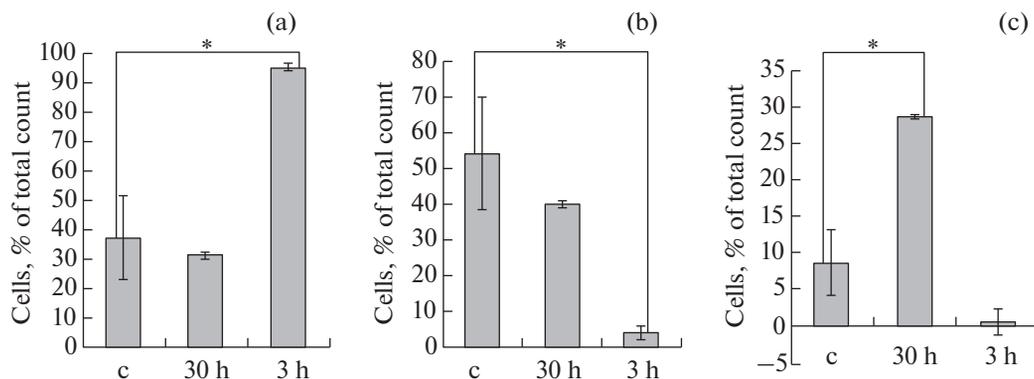
Известно, что в результате воздействия дефицита кислорода у двустворчатых моллюсков часто наблюдается снижение общего числа циркулирующих гемоцитов, а также происходят изменения в соотношении типов гемоцитов в гемолимфе [23, 25, 28]. В нашем исследовании более глубокая ги-

поксическая нагрузка (3% от уровня нормоксии) привела к снижению доли гранулоцитов и гиалиноцитов, и увеличению доли агранулоцитов в гемолимфе устриц. Противоположный эффект — увеличение доли гранулоцитов, зафиксирован в группе устриц после инкубации при 30%-ном насыщении кислородом.

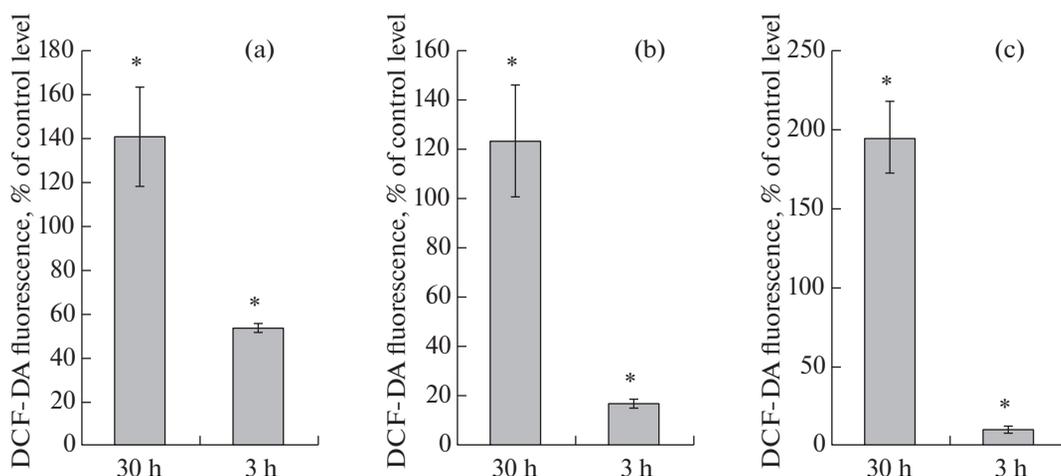
Среди возможных причин, лежащих в основе изменений клеточного состава гемолимфы моллюсков, наиболее существенны следующие:

1. Пролиферативная активность гемоцитов и их предшественников [25];
2. Гибель гемоцитов определенного типа [23];
3. Функциональные переходы одного типа гемоцитов в другой (дегрануляция, появление гранул) [36, 37];
4. Миграция гемоцитов в ткани [38].

Предположительно, агранулярные клетки — это незрелые гемоциты, пролиферация которых может осуществляться непосредственно в гемолимфе [39–42]. В условиях краткосрочного эксперимента маловероятно, что изменение в соотношении типов гемоцитов может быть вызвано пролиферативной активностью в гемопоэтической ткани. Это подтверждается данными об отсутствии в образцах гемолимфы устриц делящихся гемоцитов в обеих экспериментальных группах. Аналогичным образом не выявлены изменения в доле мертвых клеток в гемолимфе при гипоксии. При этом для гранулоцитов характерна дегрануляция и, как следствие, увеличение относительной доли агра-



**Рис. 3.** Влияние краткосрочной гипоксии на соотношение типов гемоцитов Тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*). (а) Изменение относительного числа агранулоцитов. (б) Изменение относительного числа гиалиноцитов. (с) Изменение относительного числа гранулоцитов. Моллюсков разделили на три группы, содержащихся в воде с различным уровнем растворенного кислорода: с – контрольная группа, 100%-ное насыщение кислородом ( $n = 10$ ); 30 h – экспериментальная группа, 30%-ное насыщение воды кислородом ( $n = 10$ ); 3 h – экспериментальная группа, 3%-ное насыщение воды кислородом ( $n = 10$ ). Для идентификации типов клеток на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 готовую суспензию гемоцитов окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробе  $10 \text{ мкмоль л}^{-1}$ , время инкубации – 40 мин в темноте). Соотношение типов клеток оценивали по гистограмме распределения FSC/SSC, \* – достоверные различия между контрольной и экспериментальной группами ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 4.** Влияние дефицита кислорода на способность гемоцитов Тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) к спонтанной продукции АФК. (а) Агранулоциты. (б) Гиалиноциты. (с) Гранулоциты. Устрицы содержались в течение 24 ч в условиях дефицита кислорода: 30 h – экспериментальная группа, 30%-ное насыщение воды кислородом ( $n = 10$ ); 3 h – экспериментальная группа, 3%-ное насыщение воды кислородом ( $n = 10$ ). Способность гемоцитов к спонтанной продукции АФК оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных красителем DCF-DA. Финальная концентрация красителя в пробе составляла  $10 \text{ мкмоль л}^{-1}$ . Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1 (зеленая область спектра). Уровень флуоресценции красителя DCF-DA на графике представлен как % от данного показателя в контрольных пробах. \* – достоверность различий между контрольной и экспериментальной группой ( $p < 0.05$ ).

нулярных клеток в гемолимфе [43]. Не следует исключать также возможной миграции гранулоцитов в ткани, поскольку известно, что данный тип клеток способен активно перемещаться из сосудов гемолимфы в жабры, мантию и другие ткани и органы моллюсков [44]. Таким образом, краткосрочные изменения клеточного состава гемолимфы при гипоксии реализуются быстрыми адаптивными перестройками, среди которых наиболее вероятными стоит считать дегрануляцию гранулоцитов

и/или их миграцию в ткани при глубокой гипоксии и функциональный переход агранулоцитов в гранулоциты при умеренном недостатке кислорода. Стоит отметить, что увеличение доли гранулярных клеток при 30%-ном насыщении воды кислородом и ее снижение после суточного воздействия глубокой гипоксии (3% насыщения воды кислородом от уровня нормоксии), вероятно, свидетельствуют о развитии компенсаторного адаптивного ответа у *C. gigas* в условиях неглубокой гипоксической на-

грузки. Последнее также подтверждается увеличением уровня флуоресценции красителя DCF-DA у агранулоцитов и гранулоцитов после инкубации устриц при 30%-ном содержании кислорода и его снижением у всех типов клеток после 24 ч гипоксии при 3%-ном насыщении. Выявленные нами изменения в уровне спонтанной продукции АФК, в целом, согласуются с литературными данными. Так, у *Mytilus coruscus* и *Chlamys farreri* дефицит кислорода индуцировал увеличение продукции АФК [25], а у *Perna viridis* зафиксирован обратный эффект [23, 24]. Механизмы, лежащие в основе влияния дефицита кислорода на способность гемоцитов генерировать окислительный взрыв, остаются предметом дискуссии. Снижение продукции АФК объясняют метаболической корректировкой при участии HIF-фактора в ответ на гипоксическое воздействие [45]. Вероятно также, что обнаруженное нами увеличение концентрации АФК в гемоцитах устрицы является следствием реорганизации дыхательной цепи митохондрий, поскольку известно, что митохондрии являются основным источником АФК в гемоцитах *C. gigas*, и недостаток кислорода способен вызывать изменения в цепи переносчиков электронов [46, 47]. Это предположение косвенно подтверждается данными о том, что уровень внутриклеточного содержания АФК в клетках гемолимфы устриц коррелирует с изменениями величины митохондриального потенциала при гипоксии [14].

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что характер изменений параметров гемолимфы устриц определяется не только длительностью гипоксического воздействия, но и концентрацией растворенного кислорода. Повышение относительного числа гранулоцитов и способности генерировать окислительный взрыв, вероятно, свидетельствует о развитии компенсаторного ответа у тихоокеанской устрицы в результате воздействия умеренного недостатка кислорода. Вероятно, кратковременная инкубация в условиях 30%-ного уровня насыщения воды кислородом находится в пределах толерантности *C. gigas* к гипоксии. Глубокая гипоксия, в свою очередь, индуцировала снижение доли гранулоцитов в гемолимфе и подавление продукции активных форм кислорода в гемоцитах, оказывая угнетающее действие на клеточный иммунный ответ у устриц.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Влияние гипоксии на морфологические параметры гемоцитов изучалось в рамках госзадания №121102500161-4 “Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем”. Исследование влияния дефицита кислорода на функциональные параметры гемоцитов проводилось при финансо-

вой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (номер проекта МК609.2020.4).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Проведение экспериментов и анализ экспериментальных данных (Е.С.К., А.Ю.А., Т.А.К.), подготовка графических материалов и статистическая обработка результатов (Е.С.К., Т.А.К.), подготовка и корректировка рукописи (А.Ю.А.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paulmier A, Ruiz-Pino D (2009) Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. Prog Oceanogr 80 (3–4): 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.08.001>
2. Howarth R, Chan F, Conley DJ, Garnier J, Doney SC, Marino R, Billen G (2011) Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. Front Ecol Environ 9 (1): 18–26. <https://doi.org/10.1890/100008>
3. Sirakov I, Slavcheva-Sirakova D (2015) The influence of climate changes on the hydrobionts: a review. JBES 6 (3): 315–329.
4. Weinstock JB, Collin R (2021) Hypoxia and warming are associated with reductions in larval bivalve abundance in a tropical lagoon. Mar Ecol Prog Ser 662: 85–95. <https://doi.org/10.3354/meps13630>
5. Wijsman JWM, Troost K, Fang J, Roncarati A (2019) Global production of marine bivalves. Trends and challenges. In: Goods and services of marine bivalves (7–26). Springer, Cham.
6. Harris J (2008) Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Aquatic Invasive Species Profile Aquat Invasions: 1–12.
7. Gray JS, Wu RSS, Or YY (2002) Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. Mar Ecol Prog Ser 238: 249–279. <https://doi.org/10.3354/meps238249>
8. Melzner F, Thomsen J, Koeve W, Oschlies A, Gutowska MA, Bange HW, Körtzinger A (2013) Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. Mar Biol 160 (8): 1875–1888. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1954-1>
9. Wu RS (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Mar Pollut Bull 45 (1–12): 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00061-9)
10. Baker SM, Mann R (1992) Effects of hypoxia and anoxia on larval settlement, juvenile growth, and juvenile survival of the oyster *Crassostrea virginica*. Biol 182 (2):

- 265–269.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00317-08>
11. Macey BM, Achilihu IO, Burnett KG, Burnett LE (2008) Effects of hypercapnic hypoxia on inactivation and elimination of *Vibrio campbellii* in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl Environ Microbiol* 74 (19): 6077–6084.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
  12. Khan B, Ringwood AH (2016) Cellular biomarker responses to hypoxia in eastern oysters and Atlantic ribbed marsh mussels. *Mar Ecol Prog Ser* 546: 123–133.  
<https://doi.org/10.3354/meps11622>
  13. Sokolov EP, Markert S, Hinzke T, Hirschfeld C, Becher D, Ponsuksili S, Sokolova IM (2019) Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *J Proteom* 194: 99–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
  14. Andreyeva AY, Gostyukhina OL, Kladchenko ES, Vodiasova EA, Chelebieva ES (2021) Acute hypoxic exposure: effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Environ Res* 105389.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105389>
  15. Zolotarev V (1996) The Black Sea ecosystem changes related to the introduction of new mollusc species. *Marine Ecology* 17: 227–236.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1996.tb00504.x>
  16. Allam B, Raftos D (2015) Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J Invertebr Pathol* 131: 121–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>
  17. FisiER W.S. (1988) Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am Fish Soc Symp* 18: 225–237.
  18. Auguste M, Balbi T, Ciacci C, Canonico B, Papa S, Borello A, Canesi L (2020) Shift in immune parameters after repeated exposure to nanoplastics in the marine bivalve *Mytilus*. *Front Immunol* 11: 426.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00426>
  19. Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB (2004) Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev* 198 (1): 10–24.  
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>
  20. Allam B, Espinosa EP (2016) Bivalve immunity and response to infections: are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol* 53: 4–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.037>
  21. Wootton EC, Dyrinda EA, Ratcliffe NA (2003) Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol* 15 (3): 195–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.03.004>
  22. Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C (2010) Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* 329 (5997): 1353–1355.  
<https://doi.org/10.1126/science.1190689>
  23. Wang Y, Hu M, Shin PK, Cheung SG (2011) Immune responses to combined effect of hypoxia and high temperature in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar Pollut Bull* 63: 201–208.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.035>
  24. Wang Y, Hu M, Cheung SG, Shin PKS, Lu W, Li J (2012) Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity. *Aquaculture* 356: 22–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.001>
  25. Sui Y, Kong H, Shang Y, Huang X, Wu F, Hu M, Wang Y (2016) Effects of short-term hypoxia and seawater acidification on hemocyte responses of the mussel *Mytilus coruscus*. *Mar Pollut Bull* 108: 46–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.001>
  26. Andreyeva AY, Efremova ES, Kukhareva TA (2019) Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters. *Fish Shellfish Immunol* 89: 361–367.
  27. Chen MY, Yang HS, Delaporte M, Zhao SJ, Xing K (2007) Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures. *J Exp Mar Biol Ecol* 345 (1): 52–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.01.007>
  28. Nogueira L, Mello DF, Trevisan R, Garcia D, da Silva Acosta D, Dafre AL, de Almeida EA (2017) Hypoxia effects on oxidative stress and immunocompetence biomarkers in the mussel *Perna perna* (Mytilidae, Bivalvia). *Mar Environ Res* 126: 109–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.02.009>
  29. Matozzo V, Monari M, Foschi J, Papi T, Cattani O, Marin MG (2005) Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune responses. *J Exp Mar Biol Ecol* 325 (2): 163–174.  
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.04.030>
  30. Wang W, Li M, Wang L, Chen H, Liu Z, Jia Z, Song L (2017) The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 67: 221–228.  
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>
  31. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier MF, Courtade-Saïdi M, Vincent S, Cochand-Priollet B (2016) Guidelines for May-Grünwald–Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology* 27 (5): 359–368.  
<https://doi.org/10.1111/cyt.12323>
  32. Kladchenko ES, Andreyeva AY, Kukhareva TA, Soldatov AA (2020) Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 98: 1030–1032.
  33. Carballal MJ, Lopez MC, Azevedo C, Villalba A (1997) Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29 (2): 127–135.
  34. Andreyeva AY, Kladchenko ES, Kukhareva TA, Sakhon EG (2019) Analysis of Cell Cycle and Morphological and Functional Abnormalities of *Mytilus galloprovincialis* Lam., 1819 (Bivalvia) Hemocytes from Coastal Ecosystems near Sevastopol, Crimea. *Inland Water Biol* 12 (2): 96–103.
  35. Andreyeva AY, Kladchenko ES, Vyalova OY, Kukhareva TA (2021) Functional Characterization of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae), Hemocytes Under Normoxia and Short-Term Hypoxia. *Turkish J Fish Aquat Sci* 21 (3): 125–133.

36. *Foley DA, Cheng TC* (1977) Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. *J Invertebr Pathol* 29 (3): 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(77\)80037-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(77)80037-2)
37. *Rebello MDF, Figueiredo EDS, Mariante RM, Nóbrega A, de Barros CM, Allodi S* (2013) New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLoS One* 8 (2): e57384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057384>
38. *Lau YT, Gambino L, Santos B, Espinosa EP, Allam B* (2018) Transepithelial migration of mucosal hemocytes in *Crassostrea virginica* and potential role in *Perkinsus marinus* pathogenesis. *J Invertebr Pathol* 153: 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.004>
39. *Ottaviani E, Franchini A, Barbieri D, Kletras D* (1998) Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stages. *Ital J Zool* 65 (4): 349–354. <https://doi.org/10.1080/11250009809386772>
40. *Delaporte M, Synard S, Pariseau J, McKenna P, Tremblay R, Davidson J, Berthe FC* (2008) Assessment of haemic neoplasia in different soft shell clam *Mya arenaria* populations from eastern Canada by flow cytometry. *J Invertebr Pathol* 98 (2): 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.12.005>
41. *Aladaileh S, Nair SV, Birch D, Raftos DA* (2007). Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *J Invertebr Pathol* 96 (1): 48–63. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.011>
42. *Cima F, Matozzo V* (2018) Proliferation and differentiation of circulating haemocytes of *Ruditapes philippinarum* as a response to bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 81: 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.010>
43. *de Freitas Rebello M, de Souza Figueiredo E, Mariante RM, Nóbrega A, de Barros CM, Allodi S* (2013) New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLoS One* 8 (2): e57384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057384>
44. *Huang J, Li S, Liu Y, Liu C, Xie L, Zhang R* (2018) Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada fucata* are involved in immunity and biomineralization. *Sci Rep* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22961-y>
45. *Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes E* (2002) Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* 33: 1231–1242. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01045-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01045-6)
46. *Donaghy L, Kraffe E, Le Goïc N, Lambert C, Volety AK, Soudant P* (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PloS one* 7 (10): e46594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046594>
47. *Donaghy L, Artigaud S, Sussarellu R, Lambert C, Le Goïc N, Hégaret H, Soudant P* (2013) Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: a mitochondrial origin? *Aquat Living Resour* 26 (3): 257–261. <https://doi.org/10.1051/alr/2013054>

## Effect of Ranged Short-Term Hypoxia on Functional and Morphological Parameters of Hemocytes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

E. S. Kladchenko<sup>a,#</sup>, A. Yu. Andreyeva<sup>a</sup>, and T. A. Kukhareva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

<sup>#</sup>e-mail: [kladchenko\\_ekaterina@bk.ru](mailto:kladchenko_ekaterina@bk.ru)

The effect of ranged short-term (24 h) hypoxia on morphological and functional parameters of hemocytes in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) were investigated using flow cytometry and light microscopy. The control group was kept at 100% oxygen saturation, experimental groups were exposed to moderate (30% oxygen saturation) and severe hypoxia (3% oxygen saturation). Hypoxia had no effect on morphometric parameters of hemocytes, but induced considerable changes in their functional characteristics and led to shifts in the cellular composition of hemolymph. In the oysters exposed to moderate oxygen deficiency, a compensatory response consisted in an increase in the number of granulocytes (by 20%) and an increase in the spontaneous production of reactive oxygen species (ROS) in agranulocytes (by 40%) and granulocytes (by 90%). Severe short-term hypoxia inhibited the ability of hemocytes to generate an oxidative burst and induced a decrease in the number of granulocytes, indicating the inability of oysters to maintain normal functional state.

**Keywords:** oysters, hypoxia, immunity, hemocytes, reactive oxygen species

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТЕРОИДОГЕННОГО ЭФФЕКТА 5-АМИНО-*N*-трет-БУТИЛ-2-(МЕТИЛТИО)-4-(3- (НИКОТИНАМИДО)ФЕНИЛ)ТИЕНО[2,3-*d*]-ПИРИМИДИН- 6-КАРБОКСАМИДА И ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ САМЦАМ КРЫС

© 2022 г. А. А. Степочкина<sup>1,2</sup>, А. А. Бахтюков<sup>1</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>,  
В. Н. Сорокоумов<sup>1,2</sup>, А. О. Шпаков<sup>1,\*</sup>

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

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

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

Поступила в редакцию 05.11.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

Для коррекции андрогенного дефицита необходимы разработка новых агонистов рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР) и оценка их стероидогенного эффекта при различной продолжительности и способах введения в сравнении с хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), “золотым стандартом” активаторов стероидогенеза. Целью исследования было изучить эффект аллостерического ЛГР-агониста 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР03) при однократном и пятидневном внутрибрюшинном, подкожном и пероральном введении самцам крыс в сравнении с внутрибрюшинно или подкожно вводимым ХГЧ. Исследовали уровни тестостерона и экспрессию генов ЛГР и ферментов стероидогенеза. Предварительно определяли и в дальнейшем использовали дозы ТР03 и ХГЧ, вызывавшие 65–75% максимального стероидогенного эффекта. При однократном и пятидневном внутрибрюшинном введении ТР03 (20 мг/кг) более эффективно стимулировал продукцию тестостерона, чем при подкожном и пероральном введении. Пятидневное внутрибрюшинное (но не подкожное) введение ТР03 повышало интрацеллюлярную экспрессию генов ЛГР и холестерин-транспортирующего белка StAR, катализирующего скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза. Подкожное введение ХГЧ (20 МЕ/крысу) было эффективнее, чем внутрибрюшинное введение, и значительно повышало экспрессию гена дегидрогеназы 17β, катализирующей синтез андростендиона. Оба способа введения ХГЧ снижали экспрессию гена ЛГР. В отличие от ХГЧ стероидогенный эффект ТР03 при пятидневном введении сохранялся. Сделан вывод о том, что стероидогенный эффект ТР03 наиболее выражен при внутрибрюшинном введении, а в случае ХГЧ при подкожном введении, и это ассоциировано с различным влиянием препаратов на экспрессию стероидогенных ферментов.

**Ключевые слова:** семенники, стероидогенез, тиенопиримидин, хорионический гонадотропин, внутрибрюшинное введение, подкожное введение, тестостерон

**DOI:** 10.31857/S0044452922010077

Важнейшими регуляторами репродуктивных функций у человека и млекопитающих являются лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Они осуществляют свои эффекты на клетки-мишени посредством связывания с внеклеточным доменом рецептора ЛГ. После связывания с гонадотропином рецептор ЛГ взаимодействует с различными типами гетеротримерных G-белков ( $G_s$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$ ) и β-аррестинами [1]. У мужчин снижение продукции ЛГ и ослабление чувствительности

к нему рецептора ЛГ становятся причинами гипогонадизма, андрогенного дефицита и бесплодия [2, 3]. Для стимуляции стероидогенной функции семенников обычно применяют препараты гонадотропинов (ЛГ, ХГЧ) или используют агонисты гонадолиберина, гипоталамического рилизинг-фактора гонадотропинов [4, 5]. Однако оба подхода имеют существенные недостатки, что обусловлено десенситизацией рецепторов ЛГ в результате длительного воздействия фармакологических доз гонадотропинов и нарушением функционирования

гонадной оси вследствие истощения выброса гонадотропинов в ответ на стимуляцию агонистами гонадолиберина. У гонадотропиновой терапии имеется ряд побочных эффектов, вызванных структурными различиями между коммерческими препаратами гонадотропинов и эндогенными гонадотропинами [6, 7]. Применение заместительной терапии андрогенами по механизму отрицательной обратной связи подавляет активность гонадной оси, способно индуцировать рост андроген-зависимых опухолей и может привести к бесплодию [3].

Одной из альтернатив гонадотропинам являются аллостерические агонисты рецептора ЛГ [8, 9], в том числе, разработанные нами производные тиено[2,3-*d*]-пиримидина [10–14]. Они взаимодействуют с аллостерическим сайтом, локализованным внутри трансмембранного домена рецептора [8]. Если в случае связывания рецептора ЛГ с гонадотропинами стабилизируется несколько активных конформаций, то при его связывании с аллостерическими агонистами стабилизируется преимущественно одна из них, в которой рецептор активирует только один тип G-белка или  $\beta$ -аррестина, тем самым запуская определенный внутриклеточный каскад. Так, показано, что соединение Org43553 и разработанные нами тиено[2,3-*d*]-пиримидины TP01 и TP03 через  $G_s$ -белки стимулируют фермент аденилатциклазу и цАМФ-зависимые пути, но слабо или вовсе не влияют на  $G_{q/11}$ -белки и кальциевые пути [8, 11]. В то же время стимулирующие эффекты ЛГ и ХГЧ в отношении различных типов G-белков не являются высокоселективными, хотя известно, что ХГЧ в большей степени стимулирует  $G_s$ -белки [1].

При использовании аллостерических агонистов важным является выбор оптимального пути доставки препарата. Для тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных при изучении их стероидогенного эффекта у крыс, как правило, применяют внутрибрюшинный (в/б) способ введения [8, 10, 11], в то время как подкожное (п/к) введение практически не используют. Учитывая устойчивость и хорошую всасываемость в желудочно-кишечном тракте, тиено[2,3-*d*]-пиримидины могут быть введены перорально, что невозможно в случае гонадотропинов, и это является их важным преимуществом перед гонадотропинами [9, 10]. В случае гонадотропинов (ХГЧ) используют как подкожный (п/к), так и внутримышечный способы введения, причем оба этих метода считают биоэквивалентными [15]. В условиях эксперимента чаще применяют п/к инъекции ХГЧ, но также, хотя и ограниченно, используют в/б введение [16–18]. При этом в/б введение ХГЧ мало изучено, хотя подобные исследования представляют интерес в аспекте сравнения эффективности и биодоступности препаратов гонадотропинов и тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых

производных, вводимых в основном в/б способом. В этой связи следует отметить, что сравнительные исследования стероидогенных эффектов низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ и гонадотропинов и их влияния на экспрессию стероидогенных белков при различных способах введения ранее не проводились.

Целью исследования было изучить стероидогенный эффект разработанного нами аллостерического агониста 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (TP03) при его однократном и пятидневном в/б, п/к и пероральном введении самцам крыс в сравнении с в/б или п/к вводимым ХГЧ, который в настоящее время является “золотым стандартом” среди активаторов стероидогенеза. В случае однократного введения TP03 и ХГЧ оценивали динамику изменения уровня тестостерона в течение 5 ч после введения. В случае пятидневного введения оценивали динамику изменения уровня тестостерона, а в конце эксперимента оценивали экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ и основные ферменты стероидогенеза.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Синтез TP03 осуществляли путем ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, как описано ранее [11]. Для этого 1.0 эквивалент ацилируемого агента смешивали с 1.1 эквивалента никотиновой кислоты, 1.1 эквивалента гексафторфосфата 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксида и 1.2 эквивалента *N,N*-диизопропилэтиламина в сухом *N,N*-диметилформамиде. Реакцию проводили в течение 5 ч при комнатной температуре, целевые продукты очищали с помощью перекристаллизации из этанола и адсорбционной колоночной хроматографии. Структуру TP03 подтверждали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР и <sup>13</sup>C-ЯМР спектроскопии, используя спектрометр Bruker Avance III 400 (“Bruker”, Германия), и данных масс-спектрометрии, используя спектрометр micrOTOF (“Bruker”, Германия). Молекулярная масса TP03 составила 515.1301 (рассчитанная масса для иона [M+Na<sup>+</sup>] составила 515.1294).

Для оценки стероидогенного эффекта самцам крыс однократно или в течение 5 дней вводили ТР03 в диметилсульфоксиде (ДМСО) и ХГЧ (“Московский эндокринологический завод”, Россия) в физиологическом растворе. Препараты вводили ежедневно в 11.00 в/б, п/к (в область левой лопатки), в случае ТР03 также перорально. Контрольным животным вместо препаратов в те же сроки и в тех же объемах в/б, п/к или перорально вводили ДМСО или физиологический раствор. Поскольку по результатам предварительных экспериментов оба растворителя при различных способах введения не оказывали значимого влияния на уровни тестостерона, то в основных экспериментах в качестве контрольных групп использовали крыс с в/б введением ДМСО (обработка ТР03) и п/к введением физиологического раствора (обработка ХГЧ). В основном эксперименте в каждой группе было по пять животных. При этом сначала крысам ТП03, ХГЧ и их растворители вводили однократно, а через неделю отдыха соответствующим группам животных те же препараты вводили в течение пяти дней. Тем самым, в общей сложности в экспериментах использовали 35 животных, которых распределили на 7 групп.

Для исследования были выбраны дозы ТР03 и ХГЧ, при которых, по результатам предварительных экспериментов по изучению зависимости “доза-эффект” (табл. 1), повышение уровня тестостерона составило 65–75% от максимального. При однократном введении концентрацию тестостерона в крови оценивали до (10.00) и через 1 ч (11.00), 3 ч (13.00) и 5 ч (15.00) после введения препаратов, при пятидневном введении за день до введения препаратов (13.00) и ежедневно через 3 ч после введения (13.00). Образцы крови забирали из хвостовой вены с предварительной местной анестезией крыс с помощью 2%-ного раствора лидокаина из расчета 2–4 мг/кг. Уровень тестостерона определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия) и спектрофотометра “Anthos Absorbance Reader 2020” (Австрия). В конце эксперимента (на 5-й день через 3 ч после введения препарата) крыс наркотизировали, используя ингаляцию 4–5%-ным (v/v) изофлураном, и забирали у них семенники для оценки экспрессии генов.

Экспрессию мРНК для гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ, и для генов *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b* и *Hsd17b*, кодирующих холестерин-транспортующий белок StAR, цитохромы P450<sub>sc</sub> и P450-17 $\alpha$  и 3 $\beta$ -гидростероиддегидрогеназы 3 $\beta$  и 17 $\beta$  соответственно, осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Для этого из семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (“Evrogen”, Россия). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV RT Kit (“Evrogen”, Россия), экспрессию оценивали с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для

оценки экспрессии генов целевых белков использовали следующие праймеры: *Lhr* – CTGCGCT-GTCCTGGCC (For), CGACCTCATTAAGTCCCTGAA (Rev); *Star* – AAGGCTGGAAGAAG-GAAAGC (For), CACCTGGCACCCTTACTT (Rev); *Cyp11a1* – TATTCCGCTTTGCCTTTGAG (For), CACGATCTCCTCCAACATCC (Rev); *Hsd3b* – AGGCCTGTGTCCAAGCTAGTGT (For), CTCG-GCCATCTTTTTGCTGTAT (Rev); *Cyp17a1* – CATCCCCACAAGGCTAAC (For), TGT-GTCCTTGGGGACAGTAAA (Rev); *Hsd17b* – CCTTTGGCTTTGCCATGAGA (For), CAATC-CATCCTGCTCCAACCT (Rev), структура которых была описана ранее [19]. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), а также на основе данных литературы. В качестве референсных использовали гены *Actb* и *Gapdh*, кодирующие  $\beta$ -актин и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу. Результаты анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  и программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе, получавшей в течение 5 дней ДМСО (в/б).

Статистический анализ проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ . Данные представляли как  $M \pm SEM$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основываясь на зависимости “доза-эффект” для различных способов введения препаратов были выбраны дозы 20 мг/кг для в/б и п/к введения, доза 40 мг/кг для перорального введения ТР03 и доза 20 МЕ/крысу для в/б и п/к введения ХГЧ. В этих дозах достигался 65–75% от максимального стероидогенного эффекта препарата при соответствующем способе введения (табл. 1).

При однократном введении показано, что в случае ТР03 наиболее эффективным было в/б введение, в то время как п/к и пероральный способы были сопоставимыми и по максимальному стероидогенному эффекту, и по значениям  $AUC_{1-5(ч)}$ , представляющим интегрированную площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)-время(ч)” (табл. 2). При п/к и пероральном введении стимулирующий эффект ТР03 запаздывал по сравнению с таковым при в/б введении (табл. 2). В случае ХГЧ п/к введение было более эффективным, позволяя уже через 1 ч после введения препарата достичь значительного повышения уровня тестостерона. Значение  $AUC_{1-5(ч)}$  для п/к введения на

**Таблица 1.** Уровни тестостерона до и через 1, 3 и 5 ч после однократного внутрибрюшинного, подкожного и перорального введения различных доз ТР03 и однократного подкожного и внутрибрюшинного введения различных доз ХГЧ самцам крыс Wistar

	До	Через 1 ч	Через 3 ч	Через 5 ч	AUC
К, ДМСО, в/б	14.74 ± 0.87	17.52 ± 2.09	17.99 ± 1.76	16.66 ± 1.85	70.2 ± 5.9
ТР03 10, в/б	14.87 ± 2.05	26.28 ± 2.25	37.03 ± 3.54	37.85 ± 4.20	138.2 ± 12.7*
ТР03 15, в/б	17.04 ± 3.03	34.57 ± 3.67	56.58 ± 6.06	58.34 ± 3.46	206.1 ± 18.1*
ТР03 25, в/б	15.64 ± 1.85	41.95 ± 6.00	72.76 ± 6.45	75.68 ± 8.43	263.2 ± 23.5*
ТР03 50, в/б	15.83 ± 2.63	41.34 ± 4.46	79.36 ± 6.95	76.79 ± 4.92	276.9 ± 22.9*
К, ДМСО, п/к	16.53 ± 1.72	17.89 ± 2.88	16.91 ± 1.74	16.25 ± 2.80	68.0 ± 8.9
ТР03 10, п/к	17.05 ± 1.39	17.58 ± 2.32	22.63 ± 2.55	24.88 ± 3.67	87.7 ± 10.6
ТР03 15, п/к	16.66 ± 3.79	17.70 ± 3.06	27.31 ± 3.65	29.70 ± 4.95	102.0 ± 14.2
ТР03 25, п/к	13.59 ± 2.43	15.69 ± 2.76	28.80 ± 3.48	32.21 ± 3.51	105.5 ± 11.5
ТР03 50, п/к	16.96 ± 2.26	20.16 ± 2.48	29.75 ± 3.18	32.51 ± 2.63	112.2 ± 11.0*
К, ДМСО, пер.	12.09 ± 1.49	13.78 ± 1.95	15.09 ± 1.98	14.85 ± 2.27	58.8 ± 7.1
ТР03 15, п/о	14.44 ± 1.49	14.35 ± 1.70	18.27 ± 1.08	22.17 ± 1.70	73.1 ± 3.5
ТР03 25, п/о	15.49 ± 2.01	15.58 ± 2.10	24.58 ± 3.68	33.58 ± 2.34	98.3 ± 10.7
ТР03 50, п/о	12.86 ± 2.14	16.03 ± 2.82	31.46 ± 2.78	44.32 ± 2.89	123.3 ± 6.9*
ТР03 75, п/о	13.97 ± 2.81	15.78 ± 2.53	33.00 ± 4.39	46.44 ± 4.59	128.2 ± 15.2*
К, физ. р-р, п/к	15.55 ± 1.70	17.16 ± 2.17	16.53 ± 2.53	14.37 ± 2.16	64.6 ± 9.3
ХГЧ 5, п/к	11.61 ± 1.90	24.58 ± 4.62	42.97 ± 5.23	43.69 ± 5.81	154.2 ± 17.2*
ХГЧ 10, п/к	14.82 ± 2.42	44.90 ± 4.66	86.96 ± 9.08	79.41 ± 7.20	298.2 ± 25.6*
ХГЧ 20, п/к	12.68 ± 1.94	70.04 ± 6.69	111.86 ± 11.19	107.89 ± 9.53	401.7 ± 35.0*
ХГЧ 50, п/к	15.79 ± 2.11	80.32 ± 8.45	148.57 ± 12.50	124.23 ± 9.18	501.6 ± 37.8*
ХГЧ 100, п/к	16.98 ± 2.16	87.56 ± 8.23	152.31 ± 17.78	114.45 ± 10.26	506.6 ± 43.9*
К, физ. р-р, в/б	13.98 ± 1.06	15.01 ± 2.38	14.31 ± 1.30	12.37 ± 1.08	56.0 ± 5.4
ХГЧ 5, в/б	15.71 ± 3.73	20.26 ± 2.57	49.22 ± 5.72	60.81 ± 5.33	179.5 ± 17.9*
ХГЧ 10, в/б	13.56 ± 1.66	24.11 ± 2.10	67.78 ± 10.14	64.63 ± 4.95	224.3 ± 23.7*
ХГЧ 20, в/б	13.14 ± 1.89	37.83 ± 2.87	80.78 ± 10.58	80.79 ± 6.41	280.2 ± 29.1*
ХГЧ 50, в/б	17.04 ± 1.94	63.14 ± 5.88	96.95 ± 12.25	84.03 ± 10.69	341.1 ± 39.2*
ХГЧ 100, в/б	15.41 ± 2.23	79.39 ± 4.19	94.46 ± 6.36	89.29 ± 7.75	357.6 ± 21.6*

*Примечание.* \* – различия между значением AUC в группе с обработкой препаратами и таковым в соответствующем контроле статистически значимы при  $p < 0.05$ . Во всех группах  $n = 5$ . Крыс использовали повторно, с интервалом отдыха между обработками не менее 5 дней, начиная с введения ДМСО, физиологического раствора или низких доз препаратов, но не более трех последовательных обработок. После в/б и п/к введения ТР03 в дозах 25 или 50 мг/кг, перорального введения ТР03 в дозах 50 и 75 мг/кг и в/б и п/к введения ХГЧ в дозах 20, 50 и 100 МЕ/крысу повторную обработку не проводили. В общей сложности в экспериментах использовали 60 крыс, которых распределили на 12 групп. Значения представлены как  $M \pm SEM$ .

30% превышало таковое при в/б введении гонадотропина (табл. 2).

Введение препаратов в течение 5 дней также показало более высокую эффективность в/б введения ТР03 по сравнению с п/к и пероральным введени-

ем и п/к введения ХГЧ по сравнению с в/б введением. На это указывают как динамика изменения уровня тестостерона в крови животных, так и значения  $AUC_{1-5(д)}$ , представляющие собой интегрированную площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)-время(дни)” (рис. 1).

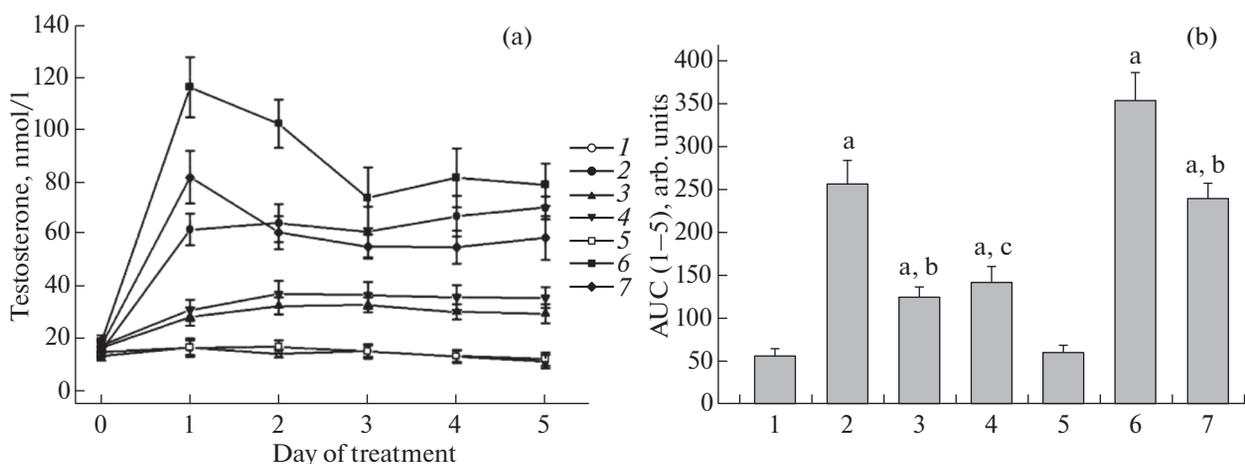
**Таблица 2.** Уровни тестостерона до и через 1–5 ч после однократного внутрибрюшинного (20 мг/кг), подкожного (20 мг/кг) и перорального (40 мг/кг) введения ТР03 и однократного подкожного (20 МЕ/крысу) и внутрибрюшинного (20 МЕ/крысу) введения ХГЧ самцам крыс Wistar

	до	Через 1 ч	Через 3 ч	Через 5 ч	AUC <sub>1–5(ч)</sub>
К1, ДМСО, в/б	14.74 ± 0.87	17.52 ± 2.09	17.99 ± 1.76	16.66 ± 1.85	70.2 ± 5.9
ТР03, в/б	14.21 ± 1.54	36.82 ± 2.87 <sup>a</sup>	65.57 ± 6.44 <sup>a</sup>	65.93 ± 4.30 <sup>a</sup>	233.9 ± 19.1 <sup>b</sup>
ТР03, п/к	17.37 ± 2.40	18.23 ± 2.58	29.55 ± 2.49 <sup>a</sup>	32.74 ± 4.62 <sup>a</sup>	110.1 ± 9.4 <sup>b</sup>
ТР03, пер	13.17 ± 2.11	15.62 ± 2.60	30.56 ± 3.04 <sup>a</sup>	38.79 ± 3.47 <sup>a</sup>	115.5 ± 11.0 <sup>b</sup>
К2, физ.р-р, п/к	15.55 ± 1.70	17.16 ± 2.17	16.53 ± 2.53	14.37 ± 2.16	64.6 ± 9.3
ХГЧ, п/к	13.61 ± 1.68	73.41 ± 5.96 <sup>a</sup>	118.26 ± 13.08 <sup>a</sup>	113.68 ± 10.91 <sup>a</sup>	423.6 ± 36.1 <sup>b</sup>
ХГЧ, в/б	14.96 ± 2.10	36.36 ± 6.13 <sup>a</sup>	88.34 ± 8.44 <sup>a</sup>	92.83 ± 8.67 <sup>a</sup>	305.9 ± 30.3 <sup>b</sup>

*Примечание.* <sup>a</sup> – различия с исходным уровнем тестостерона в соответствующей группе статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между значением AUC<sub>1–5(ч)</sub> в группе с обработкой препаратами и таковым в соответствующем контроле статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 5$ .  $M \pm SEM$ .

Далее исследовали влияние ТР03 и ХГЧ на экспрессию гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ, а также на экспрессию генов *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b* и *Hsd17b*, кодирующих холестерин-транспортирующий StAR-белок, и стероидогенные ферменты – цитохромы P450<sub>sc</sub> и P450-17 $\alpha$  и гидростероиддегидрогеназы-3 $\beta$  и -17 $\beta$  соответственно. Было выявлено не только различие между эффектами ТР03 и ХГЧ на экспрессию исследуемых генов, но и влияние на них способа доставки препарата. Так, ТР03 при в/б введении повышал экспрессию гена

*Lhr*, а при п/к и пероральном введении практически не влиял на нее. В то же время ХГЧ при обоих исследованных способах доставки значимо снижал экспрессию гена рецептора ЛГ (табл. 3). Все препараты, хотя и в различной степени, повышали экспрессию гена *Star*, но различия с контролем были статистически значимы только для обоих способов введения ХГЧ и в/б введения ТР03 (табл. 3). При в/б введении ТР03 повышал экспрессию гена *Cyp17a*, а при п/к – экспрессию гена *Hsd17b*. При пероральном способе введения, несмотря на выра-



**Рис. 1.** Уровни тестостерона в крови (а) и значения AUC<sub>1–5(д)</sub> (б) при внутрибрюшинном, подкожном и пероральном введении ТР03 и подкожном и внутрибрюшинном введении ХГЧ в течение пяти дней самцам крыс Wistar.

Обозначения: 1 – контроль-1, ДМСО, в/б; 2 – ТР03, 20 мг/кг, в/б; 3 – ТР03, 20 мг/кг, п/к; 4 – ТР03, 40 мг/кг, перорально; 5 – контроль-2, физиологический раствор, п/к; 6 – ХГЧ, 20 МЕ/крысу, п/к; 7 – ХГЧ, 20 МЕ/крысу, в/б.

На рисунке 1б: <sup>a</sup> – различия между группами с обработкой препаратами и соответствующими контролями статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между в/б и п/к введением статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различия между в/б и пероральным введением статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 5$ .  $M \pm SEM$ .

**Таблица 3.** Экспрессия генов рецептора ЛГ и стероидогенных белков в семенниках самцов крыс после их обработки с помощью ТР03 и ХГЧ в течение пяти дней

	<i>Lhr</i>	<i>Star</i>	<i>Cyp11a</i>	<i>Hsd3b</i>	<i>Cyp17a</i>	<i>Hsd17b</i>
К1, ДМСО, в/б	1.00 ± 0.12	1.03 ± 0.05	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.09	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06
ТР03, в/б	2.45 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.11	0.92 ± 0.07	2.20 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.11
ТР03, п/к	0.95 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.20	0.98 ± 0.08	1.12 ± 0.16 <sup>b</sup>	2.16 ± 0.38 <sup>a</sup>
ТР03, пер	1.36 ± 0.23	1.58 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.10	0.90 ± 0.06	1.25 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.06 <sup>b</sup>
К2, физ.р-р, п/к	1.05 ± 0.11	1.02 ± 0.09	1.14 ± 0.11	1.11 ± 0.11	0.95 ± 0.04	1.11 ± 0.12
ХГЧ, п/к	0.43 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.82 ± 0.34 <sup>a</sup>	6.22 ± 0.77 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.19	6.42 ± 0.59 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.14 <sup>a</sup>
ХГЧ, в/б	0.30 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.20 <sup>ab</sup>	1.54 ± 0.14	1.84 ± 0.30 <sup>ab</sup>	4.67 ± 0.51 <sup>ab</sup>

*Примечание.* Образцы ткани взяты через 3 ч после последнего введения препаратов. <sup>a</sup> – различия между группами с обработкой препаратами и соответствующими контролями статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между в/б введением ТР03 и п/к или пероральным введением ТР03, а также между п/к и в/б введением ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 5$ .  $M \pm SEM$ .

женный стероидогенный эффект, ТР03 не оказывал заметного влияния на экспрессию генов, кодирующих стероидогенные ферменты (табл. 3). При п/к введении ХГЧ в среднем в 6 раз повышал экспрессию генов обоих цитохромов, в то время как при в/б введении гонадотропин в значительной степени повышал экспрессию гена *Hsd17b* и в меньшей степени экспрессию генов *Cyp11a* и *Cyp17a* (табл. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные указывают на то, что низкомолекулярный аллостерический агонист ТР03 в наибольшей степени повышает уровень тестостерона при его в/б введении самцам крыс, как при однократном введении, так и в течение 5 дней. П/к и пероральный способы введения в этом отношении были менее эффективными, причем снижался не только максимальный и суммарный (AUC) стероидогенный эффект ТР03, но и отмечалось отставание, в сравнении с в/б введением, в динамике развития этого эффекта. Причиной этого, как мы полагаем, является то, что гидрофобный по природе тиено[2,3-*d*]-пиримидин сравнительно медленно поступает в кровь при п/к и пероральном введении и в меньших количествах достигает основных мишеней своего действия – тестикулярных клеток Лейдига, в которых осуществляются все стадии синтеза тестостерона. Следует отметить, что, несмотря на сниженную эффективность стероидогенного эффекта ТР03, пероральный способ введения имеет большие перспективы, поскольку позволяет избежать инъекционных способов введения препарата, что расширяет сферу его применения в фармакологии. Устойчивость в желудочно-кишечном тракте и способность вса-

сываться в кровь при пероральном введении являются значимыми преимуществами тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных перед гонадотропинами, которые могут вводиться только инъекционным путем.

Как известно, ХГЧ широко применяют для лечения гипогонадотропного гипогонадизма у мужчин [5] и индукции созревания ооцитов и обеспечения поддержания лютеиновой фазы в ходе *in vitro* фертилизации у женщин [20], причем вводят его либо п/к, либо внутримышечно [15]. При осуществлении контролируемой индукции овуляции в последние годы также апробируют внутриматочное введение ХГЧ [21]. Несмотря на то, что изначально традиционным путем введения ХГЧ считали внутримышечные инъекции, п/к способ в настоящее время считают предпочтительным, поскольку он обеспечивает желаемый клинический эффект с меньшими неудобствами для пациента и не уступает внутримышечному по эффективности [15]. В/б введение ХГЧ в медицине не используют, но этот способ нашел применение при изучении физиологических эффектов гонадотропина в экспериментах на животных, в том числе при исследовании его стероидогенного эффекта [16–18], а также наиболее широко применяется для введения низкомолекулярных агонистов рецепторов гонадотропинов [8, 10, 11].

Нами показано, что при п/к введении ХГЧ его стимулирующий эффект на уровень тестостерона существенно превосходит таковой при в/б введении, о чем свидетельствуют более высокие значения  $AUC_{1-5(ч)}$  и  $AUC_{1-5(д)}$  и более выраженный максимальный стероидогенный эффект гонадотропина. При этом в случае п/к введения значимый подъем уровня тестостерона отмечается уже через

1 ч после введения гонадотропина, составляя 57% от такового через 3 ч после п/к введения. В то же время, как при в/б введении подъем уровня тестостерона через 1 ч составляет всего 29% от такового через 3 ч, что указывает на более медленное поступление препарата к клеткам Лейдига (табл. 2).

Выявленные нами различия в динамике и эффективности стероидогенного эффекта ТР03 и ХГЧ при различных способах введения ассоциированы и с различиями их влияния на экспрессию стероидогенных ферментов и рецептора ЛГ. Необходимо отметить, что такой сравнительный анализ был проведен впервые как для низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ, так и для ХГЧ. Поскольку исследование проводили на 5-й день эксперимента, после длительной активации рецептора ЛГ и всей системы тестикулярного стероидогенеза, то различия в экспрессии, как мы полагаем, могут быть обусловлены не столько эффективностью действия самих агонистов рецептора ЛГ, сколько функционированием всей системы обратных связей, контролирующей экспрессию белков, вовлеченных в стероидогенез. В результате были выявлены следующие факты.

Несмотря на то, что в конце эксперимента уровни тестостерона в крови крыс при их обработке ТР03 и ХГЧ были сопоставимыми, экспрессия гена, кодирующего рецептор ЛГ, в семенниках животных менялась разнонаправленно. В случае ТР03 при всех способах введения она не снижалась, а при в/б введении даже повышалась, в то время как в случае п/к и в/б инъекций ХГЧ экспрессия гена *Lhr* отчетливо снижалась. Эти данные указывают на то, что одной из причин ослабления стероидогенного эффекта при длительном введении ХГЧ, независимо от способа доставки препарата, является снижение количества рецепторов ЛГ, и это можно рассматривать как результат запуска системы отрицательных обратных связей, индуцированных как высокими концентрациями гонадотропина, так и повышенным уровнем тестостерона [22]. ТР03 не оказывает подобного эффекта, что во многом объясняет стабильность его стероидогенного эффекта во времени. Ранее нами было показано, что сохранение или даже усиление экспрессии ЛГ является характерной чертой для различных тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных при их длительном в/б введении самцам крыс, и в норме, и при патологии [19, 23, 24].

Транспортный белок StAR катализирует скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза — перенос холестерина в митохондрии, где осуществляются начальные стадии синтеза стероидных гормонов [25]. При этом ТР03 при в/б введении и ХГЧ при обоих изученных способах введения в значительной степени стимулировали экспрессию гена этого белка (табл. 3), что характерно для активато-

ров стероидогенеза. В случае п/к и перорального введения ТР03 стимулирующие эффекты этого агониста на экспрессию гена *Star* были выражены значительно слабее, и это было ассоциировано с менее выраженными стимулирующим эффектом ТР03 на продукцию тестостерона (рис. 1, табл. 3).

Цитохромы P450<sub>sc</sub> и P450-17 $\alpha$  катализируют превращение холестерина в прегненолон (P450<sub>sc</sub>) и превращение прогестерона сначала в 17-окси-прогестерон, а затем в андростендион (P450-17 $\alpha$ ) [26]. Экспрессия генов, кодирующих эти цитохромы, в значительной степени повышалась при пятидневном п/к введении ХГЧ, в то время как в/б введение ХГЧ влияло на нее в существенно меньшей степени. Довольно неожиданным является различие в соотношении экспрессии гена *Cyp17a* цитохрома P450-17 $\alpha$  и гена *Hsd17b* дегидрогеназы 17 $\beta$ , катализирующей заключительную стадию стероидогенеза — превращение андростендиона в тестостерон, при различных способах введения ХГЧ. Так, при п/к введении экспрессия *Cyp17a* повышалась в шесть раз, а экспрессия *Hsd17b*, напротив, имела тенденцию к снижению (соотношение значений RQ для *Cyp17a/Hsd17b* составило 9.58), в то время как при в/б введении на фоне слабо выраженного повышения экспрессии *Cyp17a* отмечали значительное повышение экспрессии *Hsd17b* (соотношение *Cyp17a/Hsd17b* составило 0.39). Такое варьирование экспрессии, вероятно, обусловлено различиями в динамике синтеза и накопления различных прекурсоров тестостерона в ходе длительной стимуляции стероидогенеза.

В отличие от ХГЧ, ТР03 при всех вариантах введения сравнительно слабо влиял на экспрессию генов стероидогенных ферментов, и лишь в сравнительно небольшой степени повышал экспрессию гена *Cyp17a* цитохрома P450-17 $\alpha$  в случае в/б введения и гена дегидрогеназы 17 $\beta$  в случае п/к введения. Эти данные указывают на то, что ТР03, обеспечивая сравнимый с ХГЧ стероидогенный эффект, не вызывает гиперактивации экспрессии генов всех ключевых стероидогенных ферментов, которая сохраняется на уровне, близком к таковому в контроле. Это свидетельствует о том, что повышение продукции тестостерона, вызываемое низкомолекулярным агонистом, обеспечивается путем поддержания высокого уровня активности стероидогенных ферментов и не требует повышения их экспрессии.

Нами показано, что в случае ХГЧ п/к способ введения более предпочтителен в сравнении с в/б введением, на что указывает более выраженный стероидогенный эффект п/к введенного гонадотропина. Выявленные различия, как мы полагаем, обусловлены различной биодоступностью ХГЧ при п/к и в/б введении и различиями в паттерне генной экспрессии цитохрома P450-17 $\alpha$  и дегидрогеназы

17 $\beta$ , катализирующих заключительные стадии тестостероидогенеза. В случае гидрофобного по природе тиено[2,3-*d*]-пиримидинового производного ТР03, действующего на аллостерический сайт рецептора ЛГ, в/б введение оказалось намного более эффективным, чем п/к и пероральное введение. Это указывает на то, что интерес, с точки зрения фармакологии, в случае ТР03 могут представлять в/б введение, а также пероральное, как наиболее удобный и естественный способ доставки лекарственных препаратов. Показано также, что, в отличие от гонадотропина, обработка животных с помощью ТР03 приводит к устойчивому во времени (при пятидневном введении) стероидогенному эффекту, умеренно влияя на экспрессию генов стероидогенеза и не снижая экспрессию рецептора ЛГ в семенниках, что может свидетельствовать в пользу сохранения чувствительности семенников к эндогенным гонадотропинам.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122). Физико-химическая характеристика ТР03 проведена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования”, для получения масс-спектров высокого разрешения использовано оборудование ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.О.Ш., А.А.Б., К.В.Д., А.М.С.), сбор данных (А.А.Б., А.М.С., В.Н.С., К.В.Д.), обработка данных (А.А.Б., А.М.С., К.В.Д., А.О.Ш.), написание и редактирование манускрипта (А.О.Ш., А.М.С., А.А.Б., К.В.Д.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riccetti L, De Pascali F, Gilioli L, Poti F, Giva LB, Marino M, Tagliavini S, Trenti T, Fanelli F, Mezzullo M, Pagotto U, Simoni M, Casarini L (2017) Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 15: 2. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
2. Kaprara A, Huhtaniemi IT (2018) The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 86: 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>
3. Fink J, Schoenfeld BJ, Hackney AC, Maekawa T, Horie S (2021) Human chorionic gonadotropin treatment: a viable option for management of secondary hypogonadism and male infertility. *Expert Rev Endocrinol Metab* 16: 1–8. <https://doi.org/10.1080/17446651.2021.1863783>
4. Rastrelli G, Vignozzi L, Maggi M (2016) Different Medications for Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Dev* 30: 60–78. <https://doi.org/10.1159/000439332>
5. Swee DS, Quinton R (2019) Managing congenital hypogonadotropic hypogonadism: a contemporary approach directed at optimizing fertility and long-term outcomes in males. *Ther Adv Endocrinol Metab* 10: 2042018819826889. <https://doi.org/10.1177/2042018819826889>
6. Fournier T (2016) Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Ann Endocrinol (Paris)* 77: 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.012>
7. Hershko Klement A, Shulman A (2017) hCG Triggering in ART: An Evolutionary Concept. *Int J Mol Sci* 18: 1075. <https://doi.org/10.3390/ijms18051075>
8. van Koppen CJ, Zaman GJ, Timmers CM, Kelder J, Mosselman S, van de Lagemaat R, Smit MJ, Hanssen RG (2008) A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 378: 503–514. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
9. Nataraja SG, Yu HN, Palmer SS (2015) Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 142. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
10. Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS, Shpakov AO (2014) Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl Biol Sci* 459: 326–329. <https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
11. Derkach KV, Dar'in DV, Bakhtyukov AA, Lobanov PS, Shpakov AO (2016) In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane and Cell Biology* 10: 294–300. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
12. Derkach KV, Legkodukh AS, Dar'in DV, Shpakov AO (2017) The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on testosterone production in male rats. *Cell Tissue Biol* 11: 73–80. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17010035>
13. Shpakov AO, Dar'in DV, Derkach KV, Lobanov PS (2014) The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylate cyclase systems in the rat testes. *Dokl Biochem Biophys* 456: 104–107. <https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>

14. Bakhtyukov AA, Derkach KV, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Shpakov AO (2020) Differential stimulation of testicular steroidogenesis by orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor. *J Evol Biochem Physiol* 56: 439–450.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093020050075>
15. Jin J, Zhu L, Chen M, Xu H, Wang H, Feng X, Zhu X, Zhou Q (2015) The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Prefer Adherence* 9: 923–942.  
<https://doi.org/10.2147/PPA.S87271>
16. Sreenivasulu G, Senthilkumar B, Sridevi P, Rajakumar A, Rasheeda MK (2012) Expression and immunolocalization of 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase during testicular cycle and after hCG induction, in vivo in the catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen Comp Endocrinol* 175: 48–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.09.002>
17. Movsas TZ, Weiner RL, Greenberg MB, Holtzman DM, Galindo R (2017) Pretreatment with Human Chorionic Gonadotropin Protects the Neonatal Brain against the Effects of Hypoxic-Ischemic Injury. *Front Pediatr* 5: 232.  
<https://doi.org/10.3389/fped.2017.00232>
18. Nikmahzar E, Jahanshahi M, Elyasi L, Saeidi M, Babakordi F, Bahlakeh G (2019) Human chorionic gonadotropin attenuates amyloid- $\beta$  plaques induced by streptozotocin in the rat brain by affecting cytochrome c-ir neuron density. *Iran J Basic Med Sci* 22: 166–172.  
<https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.31412.7569>
19. Bakhtyukov AA, Derkach KV, Gureev MA, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Romanova IV, Morina IYu, Steepochkina AM, Shpakov AO (2020) Comparative study of the steroidogenic effect of human chorionic gonadotropin and thieno[2,3-*d*]pyrimidine-based allosteric agonist of luteinizing hormone receptor in young adult, aging and diabetic male rats. *Int J Mol Sci* 21: 7493.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
20. Lawrenz B, Coughlan C, Fatemi HM (2019) Individualized luteal phase support. *Curr Opin Obstet Gynecol* 31: 177–182.  
<https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000530>
21. Gao M, Jiang X, Li B, Li L, Duan M, Zhang X, Tian J, Qi K (2019) Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer can improve in vitro fertilization-embryo transfer outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 112: 89–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.02.027>
22. Althumairy D, Zhang X, Baez N, Barisas G, Roess DA, Bousfield GR, Crans DC (2020) Glycoprotein G-protein Coupled Receptors in Disease: Luteinizing Hormone Receptors and Follicle Stimulating Hormone Receptors. *Diseases* 8: 35.  
<https://doi.org/10.3390/diseases8030035>
23. Bakhtyukov AA, Derkach KV, Romanova IV, Sorokoumov VN, Sokolova TV, Govdi AI, Morina IYu, Perminova AA, Shpakov AO (2021) Effect of low-molecular-weight allosteric agonists of the luteinizing hormone receptor on its expression and distribution in rat testes. *J Evol Biochem Physiol* 57: 208–220.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093021020034>
24. Derkach KV, Romanova IV, Bakhtyukov AA, Morina IYu, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Shpakov AO (2021) Effect of a low-molecular-weight allosteric agonist of the luteinizing hormone receptor on the functional state of the testes in aging and diabetic rats. *Bull Exp Biol Med* 171: 81–86.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05177-5>
25. Miller WL (2007) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771:663–676.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2007.02.012>
26. Zirkin BR, Papadopoulos V (2018) Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod* 99: 101–111.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>

## A COMPARATIVE STUDY OF THE STEROIDOGENIC EFFECT OF 5-AMINO-*N*-*tert*-BUTYL-2-(METHYLTHIO)-4-(3-(NICOTINAMIDO)PHENYL)THIENO[2,3-*d*]-PYRIMIDINE-6-CARBOXAMIDE AND CHORIONIC GONADOTROPIN WITH DIFFERENT METHODS OF ADMINISTRATION TO MALE RATS

A. M. Steepochkina<sup>a,b</sup>, A. A. Bakhtyukov<sup>a</sup>, K. V. Derkach<sup>a</sup>,  
V. N. Sorokoumov<sup>a,b</sup>, and A. O. Shpakov<sup>a,#</sup>

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

<sup>b</sup> *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

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

To correct androgen deficiency, it is necessary to develop a new luteinizing hormone receptor (LHR) agonists and evaluate their steroidogenic effect with different duration and routes of administration in comparison with human chorionic gonadotropin (hCG), the “gold” standard of steroidogenesis activators. The aim of the work was to study the effect of the allosteric LHR agonist 5-amino-*N*-*tert*-butyl-2-(methylsulfanyl)-4-(3-(nicotinamido)phenyl)thieno[2,3-*d*]-pyrimidine-6-carboxamide (TP03) after a single-dose and five-day intraperitoneal, subcutaneous and oral administration to male rats versus intraperitoneally or subcutaneously administered hCG. Testosterone levels and gene expression of LHR and steroidogenic enzymes were investigated. The doses of TP03 and hCG were preliminarily determined and subsequently used, causing 65–75% of the maximum steroidogenic effect. The TP03 (20 mg/kg) stimulated testosterone production more effectively with one- or five-day intraperitoneal administration than with subcutaneous and oral administration. Five-day intraperitoneal

(but not subcutaneous) administration of TP03 increased the intra-testicular expression of the genes for LHR and the cholesterol-transporting protein StAR, which catalyzes the rate-limiting stage of steroidogenesis. The subcutaneous administration of hCG (20 IU/rat) was more effective than intraperitoneal administration, and significantly increased the expression of the  $17\beta$  dehydrogenase gene, which catalyzes the synthesis of androstenedione. Both methods of hCG administration reduced the expression of the LHR gene. In contrast to hCG, after five days of administration, the steroidogenic effect of TP03 persisted. It was concluded that the steroidogenic effect of TP03 is most pronounced with intraperitoneal administration, and in the case of hCG, with subcutaneous administration, which is due to differential effects of these drugs on the expression of steroidogenic enzymes.

*Keywords:* testes, steroidogenesis, thienopyrimidine, chorionic gonadotropin, intraperitoneal administration, subcutaneous administration, testosterone

## АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ У АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*NEOVISON VISON*) ПРИ ОТБОРЕ НА АГРЕССИВНОЕ И РУЧНОЕ ПОВЕДЕНИЕ

© 2022 г. С. Н. Калинина<sup>1,2,\*</sup>, В. А. Илюха<sup>1</sup>, О. В. Трапезов<sup>3,4</sup>,  
А. В. Морозов<sup>1</sup>, Л. И. Трапезова<sup>3</sup>, М. А. Некрасова<sup>3,5</sup>, М. А. Степанова<sup>3,5</sup>, Е. А. Сысоева<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ “КарНЦ РАН”, Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

\*e-mail: [cvetnick@yandex.ru](mailto:cvetnick@yandex.ru)

Поступила в редакцию 04.10.2021 г.

После доработки 10.11.2021 г.

Принята к публикации 11.11.2021 г.

Селекция животных по оборонительной реакции на человека лежит в основе одомашнивания видов и приводит к перестройкам нервной и гормональной систем регуляции многих функций организма, в том числе пищеварительной. Целью исследования являлось изучение активности пищеварительных ферментов (амилазы, липазы и протеаз) в поджелудочной железе, двенадцатиперстной и тощей кишке у американских норок (*Neovison vison*) двух поведенческих типов – агрессивного и “ручного”. Результаты нашего исследования позволяют предположить, что плеiotропное действие генов, контролирующее поведение, также вовлечено в регуляцию активности пищеварительных ферментов у американских норок. Несмотря на одинаковый рацион, агрессивные животные по сравнению с “ручными” характеризовались более высокой активностью протеаз и липазы, тогда как у “ручных” норок преобладает амилотический профиль активности пищеварительных ферментов. Дискриминантный анализ подтвердил различия по исследованным показателям между агрессивными и “ручными” норками, но не между двумя группами агрессивных животных. Выявленные нами различия в профиле активности пищеварительных ферментов могут быть связаны с мутациями генов ферментов, а также с опосредованным действием гормонов, задействованных в стресс-реактивности.

**Ключевые слова:** американская норка, отбор на оборонительную реакцию, амилаза, протеаза, липаза, желудочно-кишечный тракт, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

**DOI:** 10.31857/S0044452922010028

Происходящий на протяжении всей истории человечества искусственный отбор животных с желаемыми для человека свойствами неизбежно приводит к перестройкам нервной и гормональной систем регуляции физиологических функций организма [1, 2]. Генетическая селекция животных по оборонительной реакции на человека лежит в основе одомашнивания видов, которые представляют собой крайне интересные модели для исследования человеческого поведения, в том числе и агрессивного. Объектами в этих исследованиях обычно служат серебристо-черные лисицы, крысы и мыши [3–6].

Агрессия – это эволюционно древняя и консервативная форма поведения, нацеленная на добычу пищи, собственную защиту, защиту территории, а также успешное размножение [7].

“Ручное” поведение характеризуется толерантностью к присутствию человека и хэндлингу [3], а также, в некоторых случаях, наличием исследовательского интереса [1]. Генетическая база и нейрофизиологические механизмы как агрессии, так и “прирученности” схожи у разных видов животных [2, 7]. Поскольку в основе этих двух типов поведения лежит разная реакция животных на новые и угрожающие стимулы, изменения физиологических функций в ходе отбора принято связывать с активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и симпатoadреналовой систем [3, 6].

Животные разных поведенческих типов демонстрируют целый набор физиологических и/или морфологических черт, которые у “ручных” особей объединяются в понятие “доместикационный

синдром” (снижение реактивности гормональной реакции на стресс, появление белых пятен, скручивание хвоста и укорочение черепа) [1, 2], а у агрессивных животных проявляются в активации ГГНС, увеличении массы надпочечников и уровня тестостерона [4, 6, 7].

Процесс пищеварения крайне важен для роста, развития и размножения животных, поскольку обеспечивает организм энергией и необходимыми питательными веществами. Для повышения эффективности пищеварения в ходе адаптации к различным факторам среды желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и функция пищеварения могут претерпевать такие изменения, как увеличение размера кишечника, экспрессии генов пищеварительных ферментов и активности последних. Поскольку в процессе одомашнивания некоторых видов происходило изменение их рациона на более питательный и легко усвояемый, пищеварительная функция подверглась перестройкам [8, 9]. Для домашней кошки *Felis catus* по сравнению с дикой европейской *F. silvestris* характерна большая длина кишечника, необходимая для увеличения времени переваривания пищи с меньшим содержанием белка [8]. В ходе доместикации собак мутациями подверглись гены, которые играют ключевую роль в переваривании крахмала и метаболизме липидов [9]. Разводимые на зверофермах песцы, енотовидные собаки и лисицы имеют тенденцию к повышению усвоения энергии пищи по сравнению с особями того же вида, живущими в дикой природе [10]. Тем не менее, влияние искусственного отбора на морфологию и физиологию ЖКТ изучено недостаточно.

Удобным объектом для исследования физиологических функций у млекопитающих разных поведенческих типов является американская норка *Neovison vison* Shreber, 1777 (Carnivora, Mustelidae), вид разводится в неволе уже около 100 лет с целью получения ценного меха. В промышленных популяциях норок существует полиморфизм по оборонительной реакции на человека, что позволяет классифицировать животных по типам поведения (агрессивные и “ручные”). Ранее было показано, что селекция норок на оборонительную реакцию на человека сопровождается изменениями окраски, роста и развития, метаболизма нейромедиаторов (серотонина и катехоламинов) в мозге, стресс-реактивности и функциональной активности репродуктивной системы [11]. Данные о влиянии типа поведения на активность пищеварительных ферментов в доступной нам литературе отсутствуют.

В связи с вышесказанным возникает необходимость в более детальном исследовании взаимосвязей между функционированием пищеварительной системы и типом поведения американских норок, что важно для понимания особенностей регуляции

работы ЖКТ животных. Поскольку процессы переваривания и всасывания пищи происходят, в основном, в тонком отделе кишечника, а эффективность переваривания пищи во многом зависит от активности пищеварительных ферментов, целью исследования являлось изучение активности амилазы, липазы и протеаз в поджелудочной железе, двенадцатиперстной и тощей кишке у американских норок двух типов поведения (агрессивное и “ручное”).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН (протокол № 2021-02-01). Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

### Объекты исследования

В эксперименте были задействованы самцы американской норки *Neovison vison* ( $n = 40$ , возраст — 11 мес, генотип — *Standard dark brown* (+/+)) клеточного разведения, содержащиеся на экспериментальной звероферме ИЦиГ СО РАН. Рацион был составлен в соответствии с рекомендуемыми для этого вида нормами. Согласно методике *hand catch test* [12] проводилось тестирование зверей на оборонительную реакцию на человека (агрессия, страх, ручное поведение). Каждый тип поведения соотносился со значениями на условной шкале, где “0” обозначает реакцию страха, отрицательные значения индекса (от  $-4$  до  $-1$ ) свидетельствуют об агрессивном поведении, а положительные (от  $+1$  до  $+6$ ) — о ручном. В данном исследовании использовали 4 группы норок (по  $n = 10$ ), характеризовавшихся агрессивным (группы “ $-3$ ” и “ $-2$ ”) и ручным (группы “ $+3$ ” и “ $+6$ ”) типами реакции на человека. Качественные различия в поведении животных этих групп состоят в следующем. Группа “ $-3$ ” отличается активным нападением вне укрытия; звери из группы “ $-2$ ” атакуют исследователя из укрытия. Со стороны животных из группы “ $+3$ ” наблюдается активный контакт с человеком (когда человек открывает дверцу клетки, звери приподнимаются на ноги, опираются лапками на дверцу, тянутся мордочкой к рукам, внутри клетки они интенсивно обнюхивают и исследуют руки человека, нередко опираются на них лапками). Группа “ $+6$ ” характеризуется уникальным ручным поведением, которое возникает *de novo* и никогда не встречается среди норок в исходной популяции, не затронутой специальным отбором по поведению. Звери сами

проявляют активность по отношению к человеку и исследуют его руки. Норки были подвергнуты эвтаназии согласно рекомендациям и протоколу [13].

*Определение активности пищеварительных ферментов*

Для оценки ферментного статуса ЖКТ в поджелудочной железе, 12-перстной кишке и тощей кишке спектрофотометрически определяли активность следующих ферментов: α-амилазы – по убыли крахмала по методу Смита и Роя в модификации, липазы – по приросту глицерина при гидролизе трибутирина, общую протеолитическую активность (ОПА) – по приросту тирозина при гидролизе гемоглобина по методу Ансона в модификации Николаевской, как описано ранее [14]. Активность ферментов выражали в мкмоль продуктов гидролиза (для амилазы – в мг крахмала), образующихся за 1 мин в пересчете на 1 г ткани.

*Статистическая обработка данных*

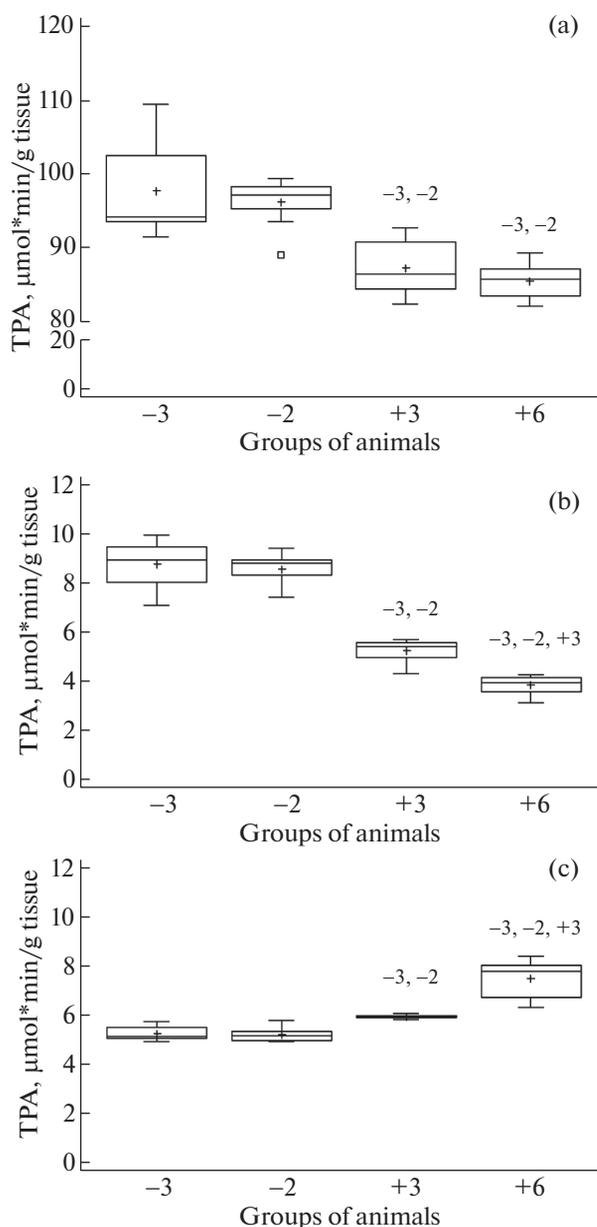
Полученные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами, используя пакеты программ MS Excel и Statgraphics. Для сравнения показателей между группами применяли непараметрический критерий (U) Манна–Уитни. Для оценки влияния факторов “тип поведения”, “отдел ЖКТ” использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Также применяли дискриминантный анализ. Статистически значимыми считали различия с  $p < 0.05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Результаты исследования представлены на рис. 1–4. Топография и профиль активности пищеварительных ферментов ЖКТ в значительной степени зависели от типа поведения норок (ANOVA:  $p < 0.05$ ) (рис. 1–3).

Особенности топографии активности исследованных ферментов у норок состояли в следующем. У особей двух поведенческих типов активность амилазы и липазы и ОПА у ручных норок снижались в ряду “поджелудочная железа–тощая кишка–двенадцатиперстная кишка”, тогда как ОПА у норок-агрессоров – в ряду “поджелудочная железа–двенадцатиперстная кишка–тощая кишка” (рис. 1–3).

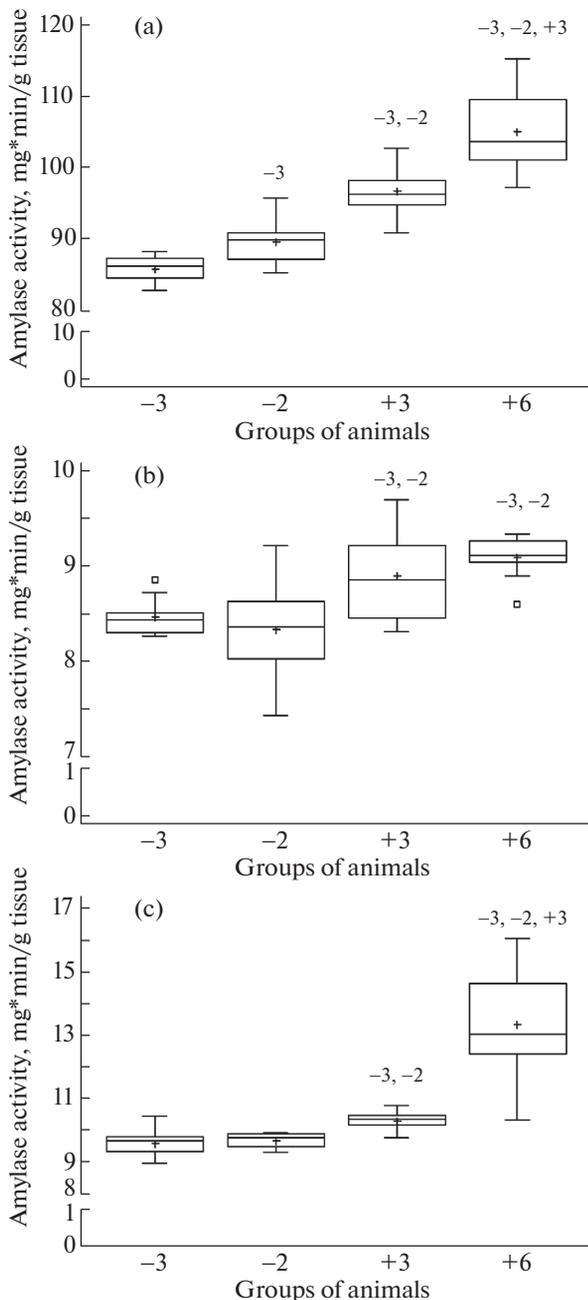
Агрессивные животные по сравнению с “ручными” характеризовались более высокой ОПА в поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке и более низкой – в тощей кишке (рис. 1). Степень проявления агрессивного поведения не отразилась на ОПА исследованных тканей: этот показатель не различался между группами “–3” и “–2”. Тем не менее, среди норок ручного типа поведения группа “+6” отличалась от группы “+3”



**Рис. 1.** Общая протеолитическая активность (ОПА) в поджелудочной железе (а), двенадцатиперстной (б) и тощей (с) кишке у агрессивных и ручных норок. Обозначения: Оси: TPA, μmol\*min/g tissue – ОПА, мкмоль\*мин/г ткани; Groups of animals – группы животных; Рисунок: (+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75%, I – статистический диапазон, х – выпадающие варианты, в каждой группе n = 10; –3, –2, +3 – различия достоверны по сравнению с соответствующей группой (критерий Манна–Уитни:  $p < 0.05$ ).

более высокой ОПА в тощей кишке и более низкой в двенадцатиперстной кишке.

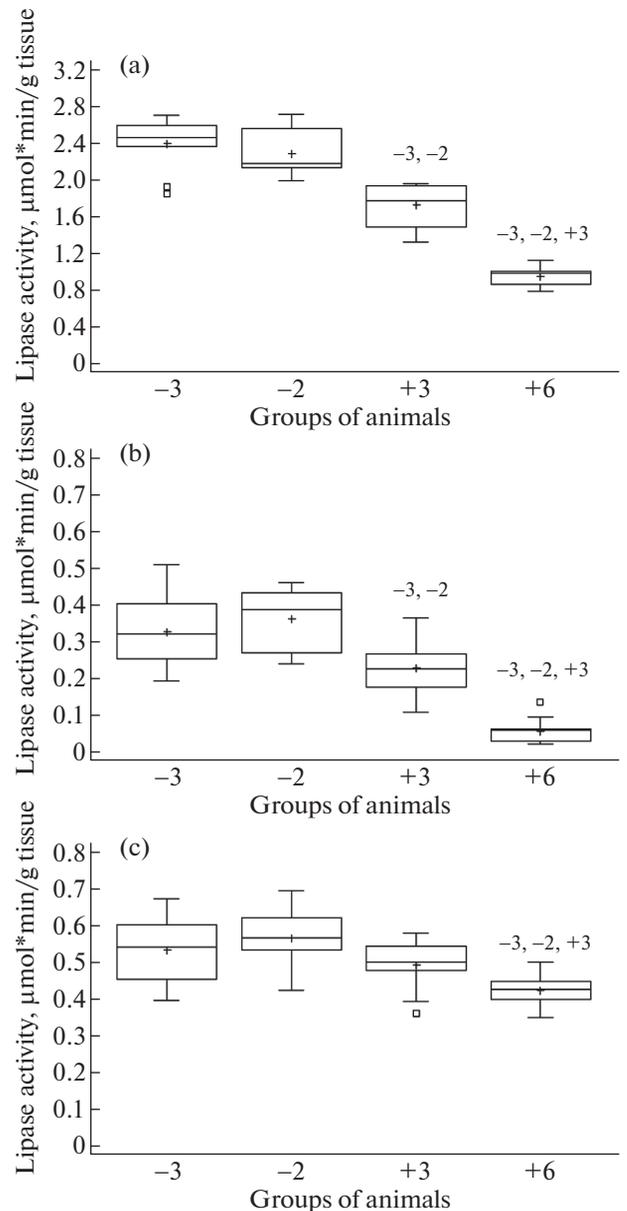
Активность амилазы в исследованных отделах ЖКТ была выше у “ручных” норок по сравнению с агрессивными животными (рис. 2). В поджелудочной железе животных активность фермента увели-



**Рис. 2.** Активность амилазы в поджелудочной железе (а), двенадцатиперстной (б) и тощей (с) кишке у агрессивных и ручных норок.

Обозначения: Оси: Amylase activity, mg\*min/g tissue – активность амилазы, мг\*мин/г ткани; Groups of animals – группы животных; Рисунок: (+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75%, ⊥ – статистический диапазон, х – выпадающие варианты, в каждой группе  $n = 10$ ; –3, –2, +3 – различия достоверны по сравнению с соответствующей группой (критерий Манна–Уитни:  $p < 0.05$ ).

чивалась с усилением степени проявления доместикационного поведения и со снижением агрессивности. Однако не обнаружено достоверных различий в активности амилазы между двумя груп-

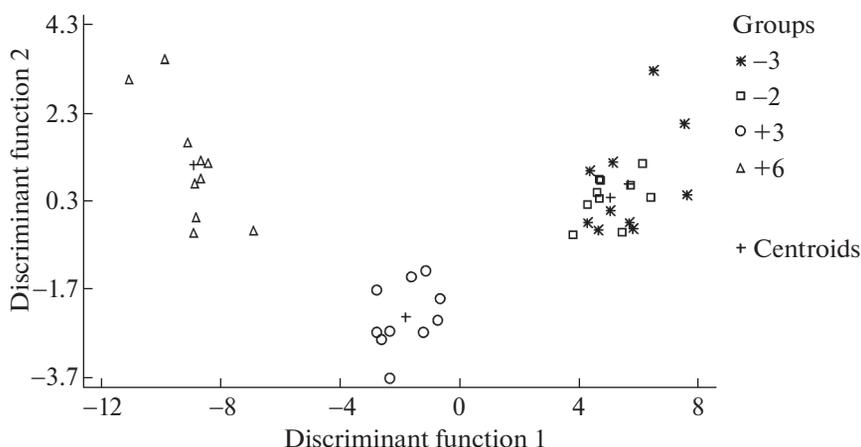


**Рис. 3.** Активность липазы в поджелудочной железе (а), двенадцатиперстной (б) и тощей (с) кишке у агрессивных и ручных норок.

Обозначения: Оси: Lipase activity, μmol\*min/g tissue – активность амилазы, мкмоль\*мин/г ткани; Groups of animals – группы животных; Рисунок: (+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75%, ⊥ – статистический диапазон, х – выпадающие варианты, в каждой группе  $n = 10$ ; –3, –2, +3 – различия достоверны по сравнению с соответствующей группой (критерий Манна–Уитни:  $p < 0.05$ ).

пами агрессивных норок в двенадцатиперстной и тощей кишках, и между двумя группами ручных животных в двенадцатиперстной кишке.

Активность липазы у агрессивных норок в поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке была выше, чем у “ручных” (рис. 3). Не обнаруже-



**Рис. 4.** Расположение экспериментальных групп животных для пула исследованных показателей в отделах ЖКТ норок на плоскости двух дискриминантных функций.

Обозначения: Оси: Discriminant Function 1, 2 – дискриминантные функции 1 и 2;

Легенда: Groups of animals – группы животных; Centroids – центры.

но различий в активности липазы в исследованных отделах ЖКТ между норками с агрессивным поведением. Группа “+3” характеризовалась более высокой активностью липазы, чем группа “+6” во всех отделах. В тощей кишке у норок из группы “+6” отмечена самая низкая активность липазы, показатель между остальными группами не различался.

В ходе пошагового дискриминантного анализа были выявлены следующие наиболее информативные показатели: ОПА в поджелудочной железе, двенадцатиперстной и тощей кишке, активность амилазы в тощей кишке и активность липазы в поджелудочной железе (рис. 4). Модель является статистически значимой ( $F_{(15,8)} = 27.83, p < 0.001$ ) и позволила корректно классифицировать 82.5% случаев. Для интерпретации межгрупповых различий были построены дискриминантные функции, являющиеся линейной комбинацией дискриминантных переменных. Функции статистически значимы ( $\chi^2_{1} = 165.84, p < 0.001$ ;  $\chi^2_{2} = 38.72, p < 0.001$ ). Изучение расположения экспериментальных групп для показателей активности пищеварительных ферментов на плоскости двух главных компонент достаточно четко выявляет влияние типа поведения норок на исследуемые показатели (рис. 4). Две группы агрессивных животных занимали близкое положение и перекрывались. По изученным показателям корректно были классифицированы 80% норок из группы “-2” и лишь 50% норок из группы “-3”. Группы “ручных” норок были удалены друг от друга и от агрессивных животных, занимали отдельные, различимые позиции и не перекрывались.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В дополнение к предыдущим исследованиям влияния агрессивного и доместикационного поведения на физиологические функции организма млекопитающих [6, 7] мы обнаружили коррелированный ответ со стороны пищеварительной системы американских норок на отбор по поведению. Несмотря на одинаковый рацион как у агрессивных, так и у “ручных” норок, топография и профиль активности пищеварительных ферментов ЖКТ в значительной степени зависели от типа поведения животных.

Паттерны развития экзокринной части поджелудочной железы и мембраны щеточной каймы энтероцитов являются видоспецифичными и детерминируются генетически, хотя в некоторой степени модулируются диетой и гормонами [15]. Логично предположить, что селекция американских норок по оборонительной реакции на человека затронула не только нервную и гуморальную регуляцию активности пищеварительных ферментов, но, вероятно, и гены, кодирующие эти ферменты.

Поскольку при прохождении вдоль кишечника состав химуса меняется, активность пищеварительных ферментов неодинакова в разных отделах тонкой кишки [15]. Ранее было показано, что сдвиги ферментативной активности в проксимальном или в дистальном направлении в тонкой кишке американских норок наблюдаются при повышении в диете животных уровня белков или углеводов соответственно [14]. Особенности топографии активности исследованных ферментов у норок двух поведенческих типов касались только активности протеаз. Несмотря на одинаковый рацион у всех исследуемых животных, у агрессивных особей по сравнению с “ручными” гидролиз белков эффективнее осуществляется в двенадцатиперстной, а не

в тощей кишке, т.е. в проксимальном, а не в более дистальном отделе тонкого кишечника. Остальные показатели (активность амилазы и липазы) у норок всех групп и ОПА у “ручных” норок снижались в ряду “поджелудочная железа—тощая кишка—двенадцатиперстная кишка”.

Одним из механизмов физиологической адаптации к составу рациона для млекопитающих является дифференцированный синтез пищеварительных ферментов, гидролизующих белки, углеводы или липиды [16]. “Гипотеза адаптивной модуляции” предполагает, что активность пищеварительных ферментов коррелирует с концентрацией субстрата в рационе животного, что позволяет полностью переваривать доступные питательные вещества, избегая при этом затрат энергии на “не-нужные” ферменты [16]. Однако несмотря на одинаковый рацион у норок двух поведенческих типов, агрессивные животные по сравнению с “ручными” характеризовались более высокой ОПА в поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке и более низкой — в тощей кишке.

Указанные различия в активности протеаз могут быть связаны с тем, что агрессивные животные генетически ближе к дикому типу американских норок. Вид считается облигатным хищником (“гиперхищником”) из-за более высокой потребности в белковой пище [17]. Несмотря на небольшую длину кишечника и быстрое прохождение пищи по нему (3–4 ч), норка эффективно усваивает большое количество протеина [18, 19]. Значительная часть белка пищи (в виде аминокислот) у хищников далее вовлекается в процесс глюконеогенеза для удовлетворения потребностей мозга и других тканей в глюкозе [17]. Вероятно, отбором на доместикационное поведение были затронуты гены протолитических ферментов, что привело к более низкой ОПА у “ручных” животных по сравнению с агрессивными.

Различия в активности протеаз у норок двух поведенческих типов также могут быть связаны с гормональной регуляцией активности пищеварительных ферментов. У агрессивных животных других видов (крыс, обезьян) наблюдаются более высокие уровни кортикостероидов [4, 6]. Кортизол играет важную роль в регуляции метаболизма аминокислот аргинина и глутамина в энтероцитах за счет механизма, опосредованного глюкокортикоидными рецепторами [20]. Показано, что глюкокортикоиды стимулируют и ускоряют постнатальное развитие гидролаз мембраны щеточной каймы энтероцитов тонкого кишечника у норок, а также лабораторных грызунов и свиней [21].

Одним из генов-мишеней действия отбора в процессе доместикации животных является ген панкреатической  $\alpha$ -амилазы (AMY2B), который имеет различное количество копий у человека и других видов млекопитающих (собак, мышей и т.д.) [9, 22]. Вариация количества копий генов яв-

ляется источником генетической изменчивости, которая подвергается отбору в процессе одомашнивания и адаптации к окружающей среде [9]. Увеличение количества копий AMY2B у одомашненных животных по сравнению с их дикими предковыми видами способствует более эффективному перевариванию крахмала за счет повышения активности амилазы [9, 22]. Ранее было показано, что у норок клеточного содержания активность амилазы в плазме крови в три раза выше, чем у диких норок, отловленных в природе, что, очевидно, объясняется высокой долей углеводов в промышленных кормах [23].

В нашем исследовании ручные норки характеризовались более высокой активностью амилазы в исследованных отделах ЖКТ по сравнению с агрессивными животными. В поджелудочной железе активность фермента увеличивалась с увеличением степени проявления доместикационного поведения и со снижением агрессивности. Известно, что активность амилазы поджелудочной железы увеличивается при повышении доли крахмала в пище и снижается при высоком содержании жиров [24]. В гормональную регуляцию активности амилазы вовлечены такие гормоны, как адреналин, глюкагон и тироксин, которые вызывают ее снижение у взрослых крыс [25]. Более низкая активность амилазы у агрессивных норок может объясняться активацией симпато-адреналовой системы, а также секрецией глюкокортикоидов и глюкагона при действии стрессовых факторов [25]. С помощью ГГНС и симпато-адреналовой систем реализуется стресс-реактивность с участием кортикостероидов и катехоламинов надпочечников: низко-агрессивные мыши показали более высокое и продолжительное увеличение уровня кортикостерона в плазме, вызванное стрессом, по сравнению с агрессивными мышами [5].

Отмечают, что помимо генов, участвующих в переваривании крахмала, в ходе доместикации собак мутациям подверглись гены, задействованные в метаболизме липидов [9]. В нашем исследовании активность липазы в поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке была выше у агрессивных, чем у “ручных” норок.

Степень проявления как агрессивного, так и доместикационного поведения, у норок имеет качественные различия, что дает возможность исследовать изменения физиологических функций животных на разных ступенях эволюционных преобразований. В нашем исследовании агрессивные норки из групп “–3” и “–2” различались только по активности амилазы в поджелудочной железе: менее агрессивные особи (группа “–2”) характеризовались более высоким показателем. Среди групп норок с доместикационным поведением (группы “+3” и “+6”) различия касались активности амилазы поджелудочной железы и тощей кишки, активности липазы во всех исследованных отделах ЖКТ и ОПА двенадцатиперстной и тощей

кишки. Норки из группы “+6”, обладающие чертами поведения, возникшими *de novo*, характеризовались более высокой активностью амилазы и более низкими активностями липазы и протеаз, чем особи из группы “+3”. Дискриминантный анализ показал, что группы “ручных” норок удалены друг от друга и от агрессивных животных, занимают отдельные, различимые позиции и не перекрываются.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования позволяют предположить, что плейотропное действие генов, контролирующее поведение, также вовлечено в регуляцию активности пищеварительных ферментов у американских норок. Агрессивные особи по сравнению с “ручными” характеризуются более высокой активностью протеаз и липазы, у “ручных” норок преобладает амилалитический профиль активности пищеварительных ферментов. В связи с тем, что регуляция пищеварения млекопитающих зависит не только от состава рациона, но и осуществляется нервными и гуморальными механизмами, которые подвержены изменениям в ходе искусственного отбора, исследование физиологии ЖКТ у агрессивных и “ручных” животных способствует расширению знаний о физиологических особенностях этих поведенческих типов. Выявленные нами различия в профиле активности пищеварительных ферментов у норок агрессивного и доместикационного типов поведения могут быть связаны с мутациями генов ферментов, а также с опосредованным действием гормонов, задействованных в стресс-реактивности.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003) и по проекту ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0015.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.В.Т., В.А.И., С.Н.К.), работа с животными и сбор биоматериала (О.В.Т., Л.И.Т., С.Н.К., М.А.Н., М.А.С., Е.А.С.), проведение лабораторных анализов (А.В.М.), обработка данных (В.А.И., С.Н.К.), написание и редактирование манускрипта (С.Н.К., В.А.И., О.В.Т.).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН, а именно канд. биол. наук Хижкину Евгению Александровичу за помощь в проведении эксперимента.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trapezov OV* (2000) Behavioural polymorphism in defensive behaviour towards man in farm raised mink (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Scientifur* 24: 103–109.
2. *Wilkins AS, Wrangham RW, Fitch WT* (2014) The “domestication syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics* 197(3): 795–808. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165423>
3. *Belyaev DK* (1979) Destabilizing selection as a factor in domestication. *J Heredity* 70: 301–308.
4. *Giammanco M, Tabacchi G, Giammanco S, Di Majo D, La Guardia M* (2005) Testosterone and aggressiveness. *Med Sci Monitor* 11 (4): RA136–RA145.
5. *Veenema AH, Cremers TI, Jongasma ME, Steenbergen PJ, de Boer SF, Koolhaas JM* (2005) Differences in the effects of 5-HT 1A receptor agonists on forced swimming behavior and brain 5-HT metabolism between low and high aggressive mice. *Psychopharmacology* 178 (2): 151–160. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2005-5>
6. *Albert FW, Shchepina O, Winter C, Römpler H, Teupser D, Palme R, Ceglarek U, Kratzsch J, Sohr R, Trut LN, Thiery J, Morgenstern R, Plyushina L, Schöneberg T, Pääbo S* (2008) Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans. *Hormones and Behavior* 53 (3): 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.010>
7. *Eusebi PG, Sevane N, O'Rourke T, Pizarro M, Boeckx C, Dunner S* (2021) Gene expression profiles underlying aggressive behavior in the prefrontal cortex of cattle. *BMC Genomics* 22 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07505-5>
8. *Kitchener AC* (1998) The Scottish wildcat – a cat with an identity crisis? *British Wildlife* 9: 232–242.
9. *Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt M, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, Liberg O, Arnemo JM, Hedhammarå LK* (2013) The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495: 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature11837>
10. *Gugolek A, Strychalski J, Konstanynowicz M, Zwolinski C* (2014) Comparative analysis of nutrient digestibility and nitrogen retention in wild and farmed canids. *Ann Animal Sci* 14 (2): 307–314. <https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0002>
11. *Kulikov AV, Bazhenova EY, Kulikova EA, Fursenko DV, Trapezova LI, Terenina EE, Mormede P, Popova NK, Trapezov OV* (2016) Interplay between aggression, brain monoamines and fur color mutation in the American mink. *Genes, Brain and Behavior* 15 (8): 733–740. <https://doi.org/10.1111/gbb.12313>

12. Trapezov OV (2000) Behavioural polymorphism in defensive behaviour towards man in farm raised mink (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Scientifur* 24 (2): 103–109.
13. Fitzhugh DC, Parmer A, Shelton LJ, Sheets JT (2008) A comparative analysis of carbon dioxide displacement rates for euthanasia of the ferret. *Lab Anim (NY)* 37: 81–86. <https://doi.org/10.1038/labani0208-81>
14. Oleinik VM (1995) Distribution of digestive enzyme activities along intestine in blue fox, mink, ferret and rat. *Comp Biochem Physiol A* 112 (1): 55–58.
15. Sangild PT, Elnif J (1996) Intestinal hydrolytic activity in young mink (*Mustela vison*) develops slowly postnatally and exhibits late sensitivity to glucocorticoids. *J Nutr* 126 (9): 2061–2068. <https://doi.org/10.1093/jn/126.9.2061>
16. Kohl KD, Ciminari ME, Chediack JG, Leafloor JO, Karasov WH, McWilliams SR, Caviedes-Vidal E (2017) Modulation of digestive enzyme activities in the avian digestive tract in relation to diet composition and quality. *J Comp Physiol B* 187: 339–351. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1037-6>
17. Eisert R (2011) Hypercarnivory and the brain: protein requirements of cats reconsidered. *J Comp Physiol B* 181 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0528-0>
18. Skrede A, Berge GM, Storebakken T, Herstad O, Aarstad KG, Sundstøl F (1998) Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Anim Feed Sci Technol* 76 (1–2): 103–116. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00208-9)
19. Buddington RK, Malo C, Sangild PT, Elnif J (2000) Intestinal transport of monosaccharides and amino acids during postnatal development of mink. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R2287–R2296. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.6.R2287>
20. Flynn NE, Wu G (1997) Enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of cortisol-treated pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272: G474–G480. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.3.G474>
21. Elnif J, Buddington RK, Hansen NE, Sangild PT (2006) Cortisol increases the activities of intestinal apical membrane hydrolases and nutrient transporters before weaning in mink (*Mustela vison*). *J Comp Physiol B* 176 (3): 233–241. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0044-9>
22. Pajic P, Pavlidis P, Dean K, Neznanova L, Romano RA, Garneau D, Daugherty E, Globig A, Ruhl S, Gokcumen O (2019) Independent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals. *Elife* 8: e44628. <https://doi.org/10.7554/eLife.44628>
23. Свечкина ЕВ, Тютюнник НН (2007) Изменение в ходе промышленной domestikации активности пищеварительных ферментов у различных генотипов американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Информац вестник ВОГиС* 11(1): 99–108. [Svechikina EB, Tjutjunnik NN (2007) Izmenenie v hode promyshlennoj domestikacii aktivnosti pishhevaritel'nyh fermentov u razlichnyh genotipov amerikanskoj norki (*Mustela vison* Schreber, 1777). *Informac Vestnik VOGiS* 11 (1): 99–108. (In Russ.)]
24. Corring T (1980) The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. *Reprod Nurr Devel* 20: 1217–1235. <https://doi.org/10.1051/rnd:19800713>
25. Harada E, Kato S (1982) Influence of adrenaline, glucagon, hydrocortisone, thyroxine, or insulin administration on pancreatic exocrine secretion in rats. *Jpn J Vet Sci* 44: 589–596.

## Activity of Digestive Enzymes in the American Mink (*Neovison vison*) Selected for Tameness and Defensive Aggression toward Humans

S. N. Kalinina<sup>a,b,#</sup>, V. A. Ilyukha<sup>a</sup>, O. V. Trapezov<sup>c,d</sup>, A. V. Morozov<sup>a</sup>, L. I. Trapezova<sup>c</sup>, M. A. Nekrasova<sup>c,e</sup>, M. A. Stepanova<sup>c,e</sup> and , and E. A. Sysoeva<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

<sup>b</sup> Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

<sup>c</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>d</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>e</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

<sup>#</sup>e-mail: cvetnick@yandex.ru

Selection of animals for the defensive reaction toward humans underlies the domestication of species and leads to genome destabilization, as well as restructuring of the nervous and hormonal systems that regulate many physiological functions, including digestion. The aim was to study the activity of digestive enzymes (amylase, lipase and proteases) in the pancreas, duodenum and jejunum of the American mink (*Neovison vison*) of two behavioral types, aggressive and tame. Our findings suggest that the pleiotropic effects of behavioral genes are also involved in the regulation of digestive enzyme activity in the American mink. Despite the same diet, aggressive vs. tame animals were characterized by a higher activity of proteases and lipase, whereas in tame minks, the amylolytic profile of digestive enzyme activity was predominant. Discriminant analysis confirmed the differences between aggressive and “tame” minks, but not between the two groups of aggressive animals, in terms of the parameters studied. The revealed differences in the profile of the activity of digestive enzymes can be associated with mutations in the enzyme genes, as well as mediated action of hormones involved in stress reactivity.

**Keywords:** American mink, selection for a defensive response to humans, amylase, protease, lipase, gastrointestinal tract, hypothalamic-pituitary-adrenal axis