

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 6, 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

Оптопротезирование биполярных клеток сетчатки

А. Ю. Ротов, М. Л. Фирсов

457

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Характер локализации ГАВА-иммунопозитивных нейронов и уровень экспрессии GAT₁ транспортера ГАВА в неокортексе крыс после воздействия гипоксии в неонатальный период

Л. И. Хожай, В. А. Отеллин

468

Содержание ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце летучих мышей (*Chiroptera*) в периоды гибернации и летней активности

Т. Н. Ильина, И. В. Баишникова, В. В. Белкин

477

Роль P2Y-рецепторов в регуляции атрофических процессов в *m. soleus* при функциональной разгрузке

К. А. Зарипова, С. П. Белова, Б. С. Шенкман, Т. Л. Немировская

487

Сравнительный анализ особенностей распределения различных фотосенсибилизаторов в клетках *Paramecium caudatum* и *Amoeba proteus*

Л. В. Чистякова, Д. Р. Файзуллина, С. В. Шмаков, Н. Н. Петрицев

498

Гемоциты австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*): морфология и гемограмма

Д. Н. Скафарь, Д. В. Шумейко

507

Влияние интраназально вводимых инсулина и ганглиозидов на гипоталамический сигналинг и экспрессию генов глюконеогенеза в печени крыс с сахарным диабетом 2-го типа

*И. О. Захарова, Л. В. Баюнова, К. В. Деркач, И. О. Илясов,
И. Ю. Морина, А. О. Шпаков, Н. Ф. Аврова*

520

Ультраструктурные изменения почек и биохимические показатели крови и мочи крыс при острой интоксикации *O,O*-диэтил-*O*-(4-нитрофенил)фосфатом

М. О. Соколова, В. Е. Соболев, Н. В. Гончаров

540

Пространственно-временные паттерны межмышечного взаимодействия при локомоциях, вызванных чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга

С. А. Моисеев

549

Активность пищеварительных ферментов в тонком кишечнике тонкоклювой и толстоклювой кайр: влияние диеты и гельминтной инвазии

М. М. Куклина, В. В. Куклин

558

Синхронизированная активность оксидоредуктаз в отделах мозга и камерах сердца *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 при острой гипоксии

Е. Э. Колесникова, И. В. Головина, А. А. Солдатов, Т. В. Гаврюсева

567

Возрастные изменения размера сомы Y нейронов дорзального наружного коленчатого тела кошки: дорзовентральный и центропериферический градиенты

А. А. Михалкин, Н. И. Никитина, Н. С. Меркульева

580

Contents

Vol. 58, No. 6, 2022

REVIEWS

Optoprosthetics of Retinal Bipolar Cells

A. Yu. Rotov and M. L. Firsov

457

EXPERIMENTAL ARTICLES

Distribution of GABAergic Neurons and Expression Levels of GABA Transporter 1 in the Rat Neocortex during the Neonatal Period after Perinatal Hypoxic Exposure

L. I. Khozhai and V. A. Otellin

468

Retinol and α -tocopherol Content in the Liver and Skeletal Muscle of Bats (*Chiroptera*) during Hibernation and Summer Activity

T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, and V. V. Belkin

477

The Role of P2Y Receptors in the Regulation of Atrophic Processes in Rat Skeletal Muscles under Unloading

K. A. Zaripova, S. P. Belova, B. S. Shenkman, and T. L. Nemirovskaya

487

A Comparative Analysis of the Distribution of Different Photosensitizers in *Paramecium caudatum* and *Amoeba proteus*

L. V. Chistyakova, D. R. Faizullina, S. V. Shmakov, and N. N. Petrishchev

498

Hemocytes of the Australian Red Claw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*): Morphology and Hemogram

D. N. Skafar and D. V. Shumeyko

507

Effects of Intranasally Administered Insulin and Gangliosides on Hypothalamic Signaling and Expression of Hepatic Gluconeogenesis Genes in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

I. O. Zakharova, L. V. Bayunova, K. V. Derkach, I. O. Ilyasov, I. Yu. Morina, A. O. Shpakov, and N. F. Avrova

520

Ultrastructural Changes in the Kidneys and Biochemical Parameters of Blood and Urine in Rats during Acute Intoxication with *O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrophenyl)phosphate

M. O. Sokolova, V. E. Sobolev, and N. V. Goncharov

540

Spatio-Temporal Patterns of Intermuscular Interaction during Locomotion Induced by Spinal Cord Percutaneous Electrical Stimulation

S. A. Moiseev

549

Activity of Digestive Enzymes in the Small Intestine of Common Murres and Thick-Billed Murres: Effect of Diet Composition and Helminth's Infection

M. M. Kuklina and V. V. Kuklin

558

Synchronized Oxidoreductases Activity in the Brain and Heart Compartments of the Scorpionfish *Scorpaena Porcus* Linnaeus, 1758 Under Acute Hypoxia

E. E. Kolesnikova, I. V. Golovina, A. A. Soldatov, T. V. Gavrusheva

567

Age-Related Changes in Soma Size of Y Neurons in the Cat Dorsal Lateral Geniculate Nucleus: Dorsoventral And Centropерipheral Gradients

A. A. Mikhalkin, N. I. Nikitina, and N. S. Merkulyeva

580

ОПТОПРОТЕЗИРОВАНИЕ БИПОЛЯРНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ

© 2022 г. А. Ю. Ротов¹, М. Л. Фирсов^{1,*}

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

*e-mail: Michael.Firsov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.07.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 17.09.2022 г.

Опыт оптогенетического протезирования сетчатки на животных моделях насчитывает уже более 16 лет, а в последний год появились первые результаты, полученные на человеке. За этот срок стали понятны основные проблемы протезирования, и одновременно были предложены подходы к их решению. В настоящем обзоре мы ставим себе задачу представить достижения в области оптогенетического протезирования биполярных клеток, уделяя внимание в основном относительно недавним публикациям. В обзоре описаны преимущества и недостатки протезирования биполярных клеток по сравнению с альтернативной мишенью — ганглиозными клетками, а также проведен сравнительный анализ эффективности использования в качестве протезирующего инструмента ионотропных светочувствительных белков, каналородопсинов, или метаботропных рецепторов, родопсинов.

Ключевые слова: сетчатка, оптогенетика, каналородопсин, родопсин, протезирование, биполярные клетки, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S0044452922060092

В последние годы мы наблюдаем ускорение развития протезирующих технологий, призванных хотя бы отчасти возместить утраченные целиком или в значительной степени те или иные сенсорные функции, в первую очередь зрение и слух. Наиболее разработанным и эффективным подходом к протезированию зрения на настоящий момент является имплантация электронного чипа, заменяющего погибшие сенсорные клетки и обеспечивающего сенсорный вход для нейронов сетчатки, переживших патологические процессы. Более 400 операций по имплантации различных протезирующих чипов во всем мире были в основном успешными и обеспечили частичный возврат зрения, позволяя пациентам различать крупные предметы, ориентироваться в пространстве, а в наиболее удачных случаях совершать такие сложные действия, как стрельба из лука и езда на велосипеде [1–3]. Технологическое развитие электронных чипов успешно продолжается более 15 лет, хотя уже сейчас ясно, что основными трудноразрешимыми проблемами этого подхода являются неуклонное глиальное зарастание зоны контактов чипа, что делает невозможным использование его более 1–2 лет, а также очень высокая индивидуальная стоимость процедуры протезирования [3].

Альтернативой электронным имплантам является оптогенетическое протезирование сетчатки. Этот подход становится возможным благодаря тому, что нейродегенеративные процессы затрагива-

ют в основном, и в первую очередь, слой фоторецепторных клеток, оставляя относительно неповрежденными биполярные и ганглиозные клетки. Отсюда следует основная идея оптогенетического подхода к протезированию сетчатки — придание биполярным или ганглиозным клеткам свойства светочувствительности при помощи генетических манипуляций. К настоящему времени опыт оптогенетического протезирования сетчатки на животных моделях насчитывает уже более 16 лет, а в последний год появились первые результаты, полученные на человеке. За этот срок стали понятны основные проблемы протезирования, и одновременно были предложены подходы к их решению (данные обобщены в [4–8]). В настоящем обзоре мы ставим себе задачу представить достижения в области оптогенетического протезирования биполярных клеток. Мы опишем преимущества и недостатки протезирования биполярных клеток по сравнению с альтернативной мишенью — ганглиозными клетками, а также проведем сравнительный анализ эффективности использования в качестве протезирующего инструмента ионотропных светочувствительных белков, каналородопсинов, или метаботропных рецепторов, родопсинов.

Животные модели и методы регистрации

За последние несколько лет не произошло какого-либо заметного изменения репертуара модель-

ных животных, используемых в экспериментах по созданию технологий оптогенетического протезирования. Основными животными линиями по-прежнему являются мыши с фенотипом *rd* (*retinal degeneration*) с различным генетическим фоном — линии *rd1*—*rd19*, имеющие нарушения в работе генов, регулирующих фототрансдукцию, зрительный цикл, клеточный метаболизм или биосинтез белка [9]. Наиболее часто используемая в экспериментах линия *rd1* имеет мутацию в гене *Pde6B*, что приводит к нарушению работы фосфодиэстеразы 6 — важнейшего участника каскада фототрансдукции. Эта линия также является генетически неоднородной, и одна из коммерческих субпопуляций этой линии несет дополнительную мутацию в гене *Gpr179*, кодирующем структурный белок сигнасомы трансдукционного каскада биполярной клетки. Такая мутация делает животных с этими генетическими особенностями непригодными для целей оптогенетического протезирования биполярных клеток, что в свою очередь ведет к необходимости дополнительной генетической модификации животных этой субпопуляции с целью возврата аллели *Gpr179* к дикому типу [10].

Важной стороной создания технологии протезирования сетчатки являются процедуры верификации степени успешности генетических манипуляций. В качестве метода проверки восстановления светочувствительности сетчатки после протезирования по-прежнему используется такой подход, как регистрация электроретинограммы *in vivo* (на интактном наркотизированном животном) [11, 12], позволяющий проследить функциональные изменения зрительной функции на одном животном на длительном отрезке времени. В качестве *ex vivo* подхода к оценке светочувствительности сетчатки в последние годы доминирующее положение занимает многоканальная регистрация активности ганглиозных клеток при помощи мультиэлектродной матрицы (МЕА, *multielectrode array*) [13—15]. При этом подходе изолированная сетчатка наслаивается ганглиозными клетками на матрицу, содержащую до 100 электродов, каждый из которых в сочетании со специальным программным обеспечением способен регистрировать активность одной или нескольких ганглиозных клеток. Ганглиозные клетки в отличие от фоторецепторов и биполярных клеток являются истинными нейронами и кодируют сигнал, поступающий по волокнам зрительного нерва в мозг, посредством изменения частоты генерации спайков (потенциалов действия). В здоровой сетчатке сигнал передается и обрабатывается в направлении от фоторецепторов к биполярным и от биполярных к ганглиозным клеткам, и регистрация ответов последних позволяет анализировать сигналы непосредственно перед их поступлением в мозг [16]. Поэтому применение МЕА является одним из самых информативных и адекватных способов оценки функци-

онального состояния сетчатки и той информации, которую она способна передать в центральную нервную систему. В настоящем обзоре при описании функциональных последствий применения протезирующих технологий мы будем описывать результаты МЕА-анализа, если не оговорено иное.

Вирусы или наночастицы?

Традиционным инструментом доставки протезирующего генетического материала в нейроны сетчатки являются векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV, см. обзор [17]). Этот тип носителей давно и широко используется для генетической терапии различных заболеваний и в составе противовирусных вакцин как эффективное и безопасное средство доставки. Основной проблемой при использовании AAV для целей оптогенетического протезирования сетчатки являются небольшая емкость вирусного капсида (до 4.7 тыс. п.о.) и его низкая тропность к нейронам сетчатки. Недостаточная емкость капсида не позволяет поместить в него минимально необходимый набор генетических элементов, включающий сильный промотор из гена, специфически экспрессирующегося в интересующих клетках сетчатки, и последовательность, кодирующую протезирующий светочувствительный белок. Этот недостаток является неустранимым, поэтому при использовании AAV в качестве носителя обычно используют различные компактные производные от исходной промоторной последовательности, включающие ограниченное количество регуляторных участков (для примеров см. [18—20]).

Существенно различается тропность серотипов AAV (с 1 по 9) к клеткам сетчатки, а также их способность преодолевать пограничные мембраны, расположенные со стороны ганглиозных и фоторецепторных клеток [17]. При субретинальном введении (в пространство между сетчаткой и пигментным эпителием) серотипы AAV1 и 4 в первую очередь трансдуцируют клетки эпителия и имеют низкое сродство к нейронам сетчатки [21, 22]. AAV2, 5 и 7 трансдуцируют эпителиальные и фоторецепторные клетки, а AAV8 и 9 также заражают Мюллеровскую глию [21, 22]. Однако при интравитреальном введении (в стекловидное тело) только серотип AAV2 способен эффективно преодолевать пограничную мембрану и трансдуцировать внутренние слои сетчатки (преимущественно ганглиозные клетки) [21, 22]. Направленная эволюция AAV в лабораторных условиях позволила получить модифицированные серотипы AAV2, обладающие повышенным сродством к нейронам сетчатки и более эффективно трансдуцирующие клетки промежуточных слоев, в том числе биполярные [23]. Так, показано, что множественные замены тирозина на фенилаланин в капсидных белках AAV2 приводят к повышению эффективности трансдукции, предпо-

ложительно, за счет снижения протеасомной деградации вирусом клетками [24].

Альтернативой вирусной доставке протезирующего материала в клетки сетчатки являются синтетические наночастицы различной природы, связывающиеся с молекулами ДНК (для обзора см. [25, 26]). Синтетические векторы имеют преимущество по сравнению с вирусными, т.к. они обладают существенно большей емкостью и способны переносить плазмиды, содержащие несколько генов интереса, либо обогащенные регуляторными последовательностями. Несмотря на то, что наночастицы в отличие от вирусов не способны к реализации специфических механизмов проникновения в клетку и доставки генетического материала в ядро, за последние годы исследователи научились модифицировать строение частиц с целью оптимизации механизмов их взаимодействия с клетками [27–29].

Биполярные или ганглиозные клетки?

Экспериментально подтверждено, что и биполярные, и ганглиозные клетки у модельных животных с дегенерацией фоторецепторов могут успешно быть использованы как мишень для оптогенетического протезирования (см. обзоры [6, 30]). Кроме того, клинические испытания показали, что ганглиозные клетки могут быть использованы для целей протезирования у человека [31]. Выбор клеток-мишеней, которым будет искусственно придаваться светочувствительность, является важнейшим этапом общей стратегии протезирования. Основными параметрами, определяющими данный выбор, являются доступность того или иного клеточного типа для вирусной трансфекции, его сохранность в ходе развития дегенеративных процессов в сетчатке и степень искажения естественного пути распространения зрительной информации. В здоровой сетчатке фоторецепторы генерируют в ответ на включение света тонический ответ, гиперполяризующий клетку. Этот сигнал через глутаматный синапс суммируется с ответами других фоторецепторов и передается на ON или OFF биполярную клетку, вызывая ее тоническую деполяризацию или гиперполяризацию соответственно. На последнем этапе ответы нескольких биполярных клеток суммируются и передаются как напрямую, так и через амакриновые клетки, на ганглиозную клетку, которая реагирует на входной сигнал увеличением частоты спайков. В дегенерировавшей сетчатке из трехзвенной цепочки генерации и прохождения сигнала рецепции светового стимула (фоторецепторы → биполярные клетки → ганглиозные клетки) выпадают фоторецепторы, оставляя таким образом возможность для создания как двухзвенной цепочки со светочувствительными биполярными клетками, так и однозвенной со светочувствительными ганглиозными клетками.

Развитие патологических дегенеративных процессов в сетчатке проходит в несколько этапов (см. обзоры [32, 33]). На ранних стадиях генетически детерминированные сбои в работе внутриклеточных механизмов в фоторецепторах запускают каскад событий, приводящих к их гибели. На этом этапе происходит также смещение функциональных характеристик биполярных клеток с ON на OFF за счет изменений в профиле экспрессии глутаматных рецепторов в их дендритных окончаниях [34]. Дальнейшие патологические процессы включают в себя фагоцитоз остатков фоторецепторов и деафферентацию биполярных клеток из-за исчезновения глутаматной передачи со стороны фоторецепторов и последующей ретракции их дендритов. Из-за этого функциональная aberrация биполярных клеток прогрессирует, что выражается в усилении экспрессии ионотропных глутаматных рецепторов в дендритах колбочковых ON-биполярных клеток и нарушениях в работе метаболитных рецепторов [35].

В переходном периоде, когда палочки уже полностью дегенерировали, а колбочки еще сохраняются, дендриты биполярных клеток могут разрастаться в поисках сохранившихся фоторецепторов для подключения к их синаптическим терминалям. На последней стадии топологическое ремоделирование сетчатки усиливается, происходит активная миграция выживших клеток в аномальные для их типа локации и уплотнение пограничной мембраны, образованной Мюллеровскими клетками, что создает серьезный барьер на пути возможного поступления терапевтических или протезирующих агентов. Отдельные биполярные и амакриновые клетки могут мигрировать в слой ганглиозных клеток и наоборот, ганглиозные клетки могут проникать во внутренний ядерный слой [32]. Наблюдаемые структурные сдвиги сопровождаются также изменениями транскриптомного репертуара белков, связанных с межклеточной коммуникацией, таких, как аннексин А7 и контактин 1. Показано, что уровни транскрипции обоих белков у мышей с фенотипом *gd1* на 90-й день постнатального развития достоверно снижаются [36]. При этом транскриптомные профили, относящиеся к внутриклеточному сигналингу и базовым метаболическим процессам, у биполярных клеток меняются незначительно, что позволяет им сохранять статус перспективных мишеней для протезирования.

Еще одним важным и негативным следствием функциональной и топологической перестройки сетчатки является возникновение у большинства переживающих нейронов спонтанной ритмической активности [37, 38]. Эта активность создает шумовой фон и затрудняет различение полезного сигнала, снижая тем самым чувствительность зрительной системы. Считается, что первичной причиной этой активности является деафферентация нейронов внутреннего ядерного слоя, а непосред-

ственным механизмом – аномальные флуктуации мембранного потенциала АП амакриновых клеток [39, 40]. АП амакриновые клетки синфазно через ON-биполярные и антифазно через знак-инвертирующий синапс с OFF-биполярными клетками возбуждают периодическую активность соответственно в ON и OFF ганглиозных клетках, что приводит к появлению относительно медленно распространяющихся волн спонтанной активности в сети ганглиозных клеток. Эта активность проявляется как генерация спайковых пачек с частотой около 10 Гц [41]. Фармакологическое разобщение коммуникации АП амакриновых и ON-биполярных клеток через щелевые контакты приводит к существенному уменьшению спонтанной активности ганглиозных клеток и улучшению отношения сигнал/шум [42].

Следует отметить, что протезирование оптогенетическими средствами биполярных, но не ганглиозных клеток оставляет отчасти функционирующей систему обработки сигнала с участием амакриновых клеток. Кроме того, ганглиозные клетки сами делятся на более чем 40 различных функциональных типов, по-разному взаимодействующих и обрабатывающих поступающую информацию [43, 44]. Их протезирование же преобразует все эти функциональные типы в единообразные детекторы света, существенно нарушая тем самым естественную схему обработки зрительной информации до ее поступления в мозг. Все вышеизложенное указывает на то, что протезирование биполярных клеток воссоздает схему обработки зрительной информации, более приближенную к естественной ситуации, чем протезирование ганглиозных клеток.

Эффективность доставки протезирующих трансгенов к клеткам того или иного типа во многом определяется выбором способа доставки вирусных конструктов к сетчатке: интравитреально или субретинально. Именно интравитреальная инъекция предпочтительна для доставки трансгенов во внутреннюю нейроны сетчатки, т.е. ганглиозные и биполярные клетки, в то время как субретинальные введения применяют для трансдукции фоторецепторов и клеток пигментного эпителия (например, в рамках генной терапии, см. обзор [45]). Задача массовой трансдукции ганглиозных клеток относительно проста, ввиду их максимальной близости к стекловидному телу и, соответственно, месту введения вектора. Биполярные клетки занимают наиболее труднодоступное положение в сетчатке, что делает их менее привлекательной мишенью для доставки трансгенов. Однако появление в арсенале исследователей модифицированных серотипов AAV, обладающих повышенной тропностью к нейронам сетчатки и, как следствие, более эффективно проникающим в глубокие клеточные слои, позволило решить эту проблему [23, 46].

Попытки создания селективных компактных промоторов, предназначенных для целевой экспрессии трансгенов в ON биполярных клетках, предпринимаются исследователями с 2008 г. [47], и обычно берут за основу полноразмерные промоторы генов, кодирующих специфические для данного клеточного типа белки. Несмотря на то что первые разработки в этой области не могли обеспечить достаточного уровня селективности, зачастую допуская экспрессию светочувствительных белков в амакриновых или ганглиозных клетках [48], к настоящему времени можно выделить как минимум 3 конструкта, обеспечивающих высокоселективное оптопротезирование ON-биполярных клеток на основе генов *Grm6* [49–51] и *Pcp2* [49–51]. Сочетание оптимизированных серотипов AAV и селективных, мощных и компактных промоторов позволяет получать экспрессию в 70% от всех биполярных клеток сетчатки [13, 14], при этом доля трансдуцированных клеток оказывается существенно выше у палочковых биполярных клеток, чем у колбочковых. Доля нецелевой экспрессии трансгена составляет около 16% и приходится на OFF биполярные клетки [14].

Дополнительным подтверждением перспективности технологии протезирования биполярных клеток являются многочисленные данные о безопасности этого подхода. Показано, что у мышей линии rd1 экспрессия каналородопсина [52, 53] и родопсина [53] с использованием AAV не вызывала апоптоза и воспаления, как локального, так и системного. С другой стороны, повреждений или воспалительных процессов в сетчатке макака также не было обнаружено спустя 3 мес после селективной экспрессии модифицированного каналородопсина в ганглиозных клетках [54].

Зрительные опсины или каналородопсины?

В настоящее время в сетчатке млекопитающих выявлено более десяти типов биполярных клеток, которые по типу иннервируемых клеток делятся на палочковые и колбочковые, а по типу обработки полученного сигнала – на OFF (знак-сохраняющие) и ON (знак-инвертирующие) биполярные клетки (для обзора см. [55]). Успешная технология протезирования должна включать в себя экзогенный светочувствительный белок, позволяющий воспроизводить знак изменения потенциала биполярной клетки в ответ на освещение, и возможность селективной и эффективной экспрессии этого белка в правильном типе клеток. Созданные к настоящему времени технологии позволяют протезировать ON биполярные клетки за счет их трансфекции ионотропными или метаболитными светочувствительными белками. Эти белки в ответ на освещение вызывают изменение мембранного потенциала клетки, воспроизводя таким образом логику нормальной работы цепи прохождения сигнала

ла в сетчатке, что доказывается успешными попытками протезирования зрительной функции у модельных животных [14, 56, 57]. До сих пор не было известно попыток направленного протезирования OFF биполярных клеток, ни по отдельности, ни одновременно с протезированием ON биполярных клеток, хотя оптогенетические инструменты, позволяющие гиперполяризовать клетку (анионные каналы) в ответ на освещение, существуют и успешно применяются при решении других оптогенетических задач [58]. Попытки же протезирования каналородопсинами и зрительными опсинами ON биполярных клеток сетчатки модельных животных с дегенерацией фоторецепторов предпринимаются уже давно и успешно приводят к появлению светочувствительности, что подтверждается результатами различных функциональных тестов (для обзора см. [59]).

При выборе стратегии протезирования одним из определяющих факторов эффективности является выбор типа протезирующего экзогенного светочувствительного белка. Исторически первые успешные эксперименты по оптогенетическому протезированию сетчатки модельных животных были выполнены с использованием каналородопсина [60], и впоследствии этот белок и его модификации были многократно и успешно применены для протезирования сетчатки [13, 14, 54, 61]. Модифицированный каналородопсин ChrimsonR со сдвинутым в длинноволновую область спектром поглощения был успешно использован для протезирования ганглиозных клеток сетчатки человека [31]. Большим преимуществом использования каналородопсина является относительная автономность этого подхода, при котором эффект протезирования зависит только от экспрессии одного экзогенного белка. Альтернативой каналородопсину как инструменту протезирования сетчатки являются светочувствительные метаболитные рецепторы, например, зрительные опсины или меланопсин. В таком случае предполагается, что экзогенный рецептор встраивается в собственную сигнальную систему протезируемой клетки. В качестве подходящей для встраивания рецептора системы чаще всего рассматриваются постсинаптический сигнальный каскад ON биполярных клеток, запускаемая метаболитным глутаматергическим рецептором mGluR6 и регулирующий проводимость TRPM1 каналов (см. обзор [62]). Метаболитный светочувствительный рецептор может быть использован в немодифицированном виде (палочковый родопсин [63, 64]; колбочковый человеческий опсин [46]; меланопсин [65, 66]), или молекула может быть модифицирована с целью лучшей адаптации к эндогенному сигнальному каскаду. В последнем случае может быть использован химерный рецепторный белок, в котором нативный внутриклеточный домен, ответственный за взаимодействие с сигнальными G-бел-

ками, заменен на домен эндогенного рецептора mGluR6 [56, 67].

При протезировании биполярных клеток тем или иным типом белков результат может существенно отличаться по итоговой чувствительности сетчатки к свету. При введении в одной и той же концентрации вирусного вектора, несущего аналогичные генетические конструкторы, чувствительность ON биполярных клеток, протезируемых каналородопсином, была на 2.5 порядка ниже, чем при протезировании метаболитным рецептором — родопсином крысы [63]. Похожее соотношение чувствительностей следует и из других работ, в которых биполярные клетки протезировались каналородопсинами [13, 61] и демонстрировали пороговую чувствительность в диапазоне 10^{13} – 10^{15} фотонов/см²/с, или метаболитными опсинами [42, 51, 64] с чувствительностью 10^{11} – 10^{12} фотонов/см²/с (см. обобщающую схему на рис. 1). Объяснение такого различия вероятнее всего заключается в уровне деполяризации биполярной клетки в пересчете на один поглощенный квант света. Поглощение одного кванта молекулой каналородопсина приводит к открытию одного канала — самого каналородопсина, в то время как активация одним квантом молекулы метаболитного рецептора запускает каскад внутриклеточной трансдукции, приводящий к открытию многих мембранных катионных каналов. Соответственно, во втором случае происходит больший сдвиг мембранного потенциала, что означает большую чувствительность протезируемой клетки к свету.

Протезирование биполярных клеток метаболитными опсинами приводит к возникновению светочувствительности, охватывающей до 5 порядков интенсивности, в то время как применение каналородопсина позволяет создать динамический диапазон только в 2 порядка интенсивности [42, 63]. Это происходит в частности из-за большей крутизны функции реакции клеток на свет от интенсивности стимула при протезировании каналородопсином, нежели при использовании метаболитного рецептора [51]. При этом протезирование биполярных клеток метаболитными опсинами создает динамический диапазон чувствительности на уровне отдельных ганглиозных клеток не более 4 порядков интенсивности световой стимуляции. Дополнительный порядок регулировки чувствительности к свету достигается за счет наложения и не полного совпадения чувствительностей многих различных ганглиозных клеток [42].

Форма ответа протезированной сетчатки на стимуляцию ступенькой света ожидаемо отличается от ответа здоровой сетчатки. Ответ на уровне ганглиозных клеток при протезировании ON биполярных клеток родопсином показывает замедленную по сравнению со здоровой сетчаткой кинетику ответа (больше время до пика и более медленное выключе-

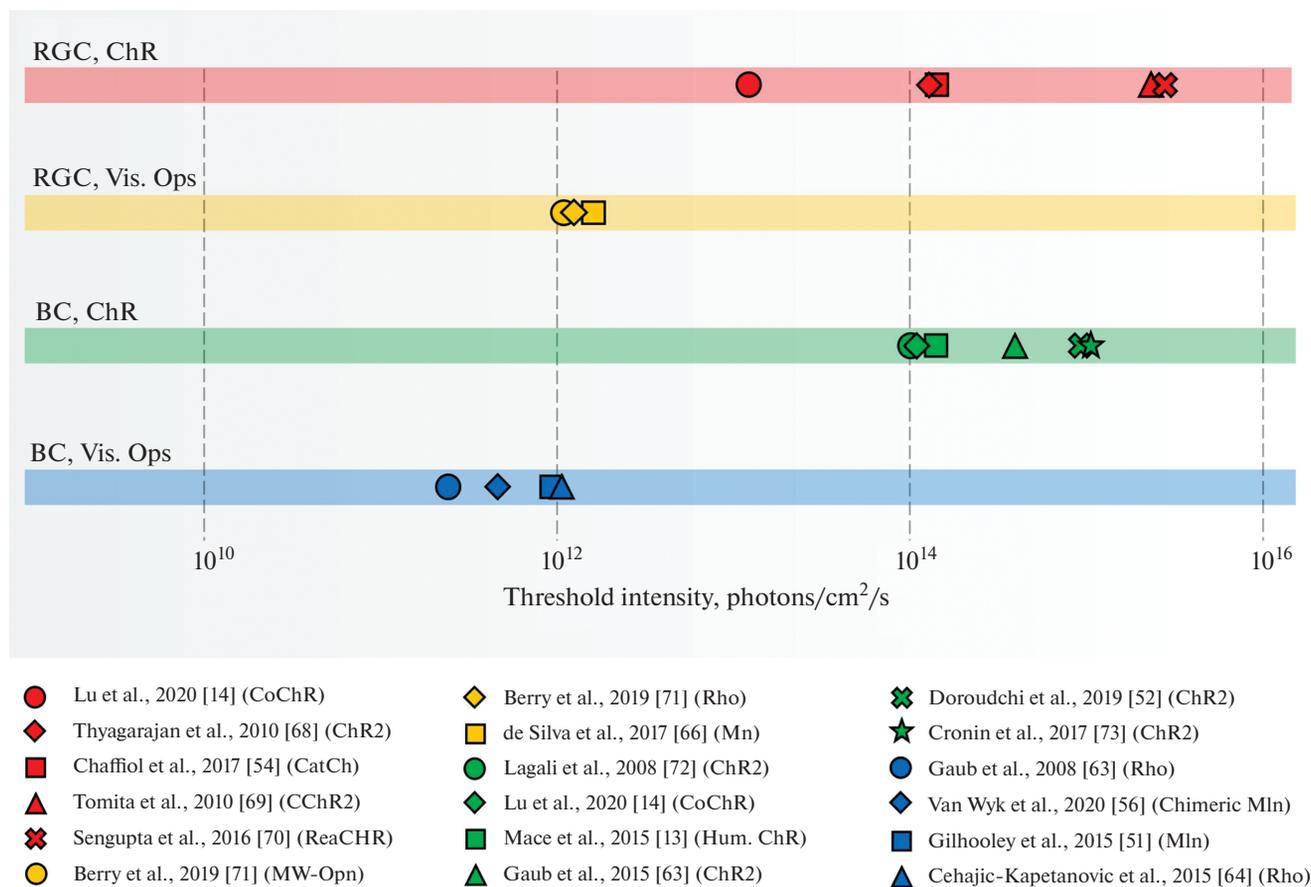


Рис. 1. Сводная схема значений пороговой чувствительности дегенерировавшей сетчатки после оптогенетического протезирования по данным из различных исследований. Данные (минимальная интенсивность светового стимула, вызывающего ответ сетчатки) сгруппированы в зависимости от того, какой тип клеток подвергся протезированию (биполярные или ганглиозные), и каким типом светочувствительного белка (каналородопсин или зрительный опсин). Литературные источники: ганглиозные клетки, протезирование каналородопсинами (RGC, ChR) – [14, 54, 68–70]; ганглиозные клетки, протезирование зрительными опсинами (RGC, Vis.Ops) – [66, 71]; биполярные клетки, протезирование каналородопсинами (BC, ChR) – [13, 14, 52, 63, 72, 73]; биполярные клетки, протезирование каналородопсинами (BC, Vis.Ops) – [51, 56, 63, 64]. Сокращения: ChR – каналородопсин, CatCh/CoChR/ReaCHR – модифицированные каналородопсины, Rho – родопсин палочек, MW-Opn – зеленочувствительный опсин колбочек, Mln – меланопсин.

чение ответа). В то же время ответ демонстрирует признаки световой адаптации в искусственном каскаде фототрансдукции, что выражается в ускорении ответа при повышении интенсивности стимула, характерном и для здоровой сетчатки [63]. Также следует отметить, что некоторые ганглиозные клетки (около 7% от общего числа) отвечали на стимуляцию не увеличением, а уменьшением спайковой активности, что говорит о частичном восстановлении OFF-путей в обработке зрительного сигнала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре мы постарались описать относительно недавние достижения в создании технологии оптогенетического протезирования сетчатки, подвергшейся нейродегенерации. Получены новые подтверждения того, что использование

в качестве вектора трансдукции аденоассоциированного вируса, а также индукция экспрессии в клетках сетчатки родопсинов или каналородопсинов безопасны как для сетчатки [52, 53, 74], так и для организма в целом [52]. Кроме того, у животных моделей индукция экспрессии родопсинов и каналородопсинов является стабильной на протяжении многих месяцев [13, 52, 74], что позволяет надеяться на стабильный эффект экспрессии протезирующих белков у человека в случае введения этого метода в клиническую практику.

К настоящему времени создан и апробирован на животных с дегенерацией фоторецепторов эффективный инструментарий доставки генетического материала в сохраняющиеся клетки сетчатки. Сочетание определенных серотипов AAV с новейшими компактными промоторами позволяет достичь высокой селективности и эффективности трансдукции выбранного для протезирования типа кле-

ток сетчатки модельных животных (грызунов [50, 51], собак [74, 75], приматов [54, 76], обзор в [77]). Прямой перенос такого сочетания серотипа AAV и промотора для технологии протезирования сетчатки человека скорее всего невозможен, и для высокоспецифичной и эффективной доставки генетического материала в клетки человека потребуются разработка и последующая валидация соответствующих видоспецифичных промоторов (см. [18]).

Сегодня представляется неочевидным однозначный выбор в сторону протезирования биполярных или ганглиозных клеток, а также выбор каналородопсинов или родопсинов в качестве протезирующего материала. Протезирование биполярных клеток воссоздает более естественный путь прохождения зрительного сигнала в сетчатке, и, скорее всего, зрительная система будет легче адаптироваться к такому варианту протезирования. С другой стороны, проксимальное расположение ганглиозных клеток делает их доступнее для вирусных векторов, несмотря на последние достижения по созданию серотипов, проникающих в глубокие слои сетчатки. Прямые измерения подтверждают, что протезирование каналородопсином ганглиозных клеток позволяет получить существенно более высокую чувствительность, чем при протезировании каналородопсином биполярных клеток [14].

Во всех работах по протезированию биполярных клеток каналородопсином порог чувствительности сетчатки к свету составляет не менее 10^{13} фотонов/см²/с, в том числе при использовании современных модифицированных форм этого белка с увеличенной проводимостью и замедленным выключением канала [14, 78]. Низкая чувствительность приводит к необходимости постоянного использования высоких уровней освещенности, что может привести к светоиндуцированному повреждению сетчатки. Использование метаболитных опсинов во всех случаях позволяет создать чувствительность к свету примерно на 2 порядка выше, чем использование каналородопсинов, и таким образом снизить световую нагрузку на сетчатку [51, 63]. Кроме того, показано, что в ОН биполярных клетках искусственный трансдукционный каскад на основе родопсина способен к адаптации к уровню освещенности. Оба этих обстоятельства позволяют предположить, что будущие перспективные инструменты протезирования должны разрабатываться на основе метаболитных светочувствительных рецепторов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Грант в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ Павловский центр “Интегративная физиология – персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Оба автора внесли одинаковый вклад в анализ литературных данных и написание текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mills JO, Jalil A, Stanga PE (2017) Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. *Eye (Lond)* 31 (10): 1383–1398. <https://doi.org/10.1016/j.ajth.2019.151485> 10.1038/eye.2017.65
2. Bloch E, Luo Y, da Cruz L (2019) Advances in retinal prosthesis systems. *Therap Adv Ophthalmol* 11: 2515841418817501. <https://doi.org/10.1177/2515841418817501>
3. Ahuja AK, Behrend MR (2013) The Argus™ II retinal prosthesis: factors affecting patient selection for implantation. *Progress Retinal Eye Res* 36: 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.01.002>
4. Firsov M (2019) Perspectives for the Optogenetic Prosthesis of the Retina. *Neurosci Behav Physiol* 49: 192–8. <https://doi.org/10.1007/s11055-019-00714-2>
5. Kirpichnikov MP, Ostrovskiy MA (2015) Optogenetics and prosthetic treatment of retinal degeneration. *Vestn Oftalmol* 131 (3): 99–111. <https://doi.org/10.17116/oftalma2015131399-111>
6. Ostrovsky MA, Kirpichnikov MP (2019) Prospects of Optogenetic Prosthesis of the Degenerative Retina of the Eye. *Biochemistry (Mosc)* 84 (5): 479–490. <https://doi.org/10.1134/S0006297919050031>
7. Scholl HP, Strauss RW, Singh MS, Dalkara D, Roska B, Picaud S (2016) Emerging therapies for inherited retinal degeneration. *Sci Transl Med* 8 (368): 368rv6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2838>
8. Chaffiol A, Duebel J (2018) Mini-Review: Cell Type-Specific Optogenetic Vision Restoration Approaches. *Advanc Experiment Med Biol* 1074: 69–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_9
9. Collin GB, Gogna N, Chang B, Damkham N, Pinkney J, Hyde LF, Stone L, Naggert JK, Nishina PM, Krebs MP (2020) Mouse Models of Inherited Retinal Degeneration with Photoreceptor Cell Loss. *Cells* 9 (4): 931. <https://doi.org/10.3390/cells9040931>
10. Nishiguchi KM, Carvalho LS, Rizzi M, Powell K, Holthaus SM, Azam SA (2015) Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179. *Nat Commun*. 6: 6006. <https://doi.org/10.1038/ncomms7006>

11. *A L, Zou T, He J, Chen X, Sun D, Fan X* (2019) Rescue of Retinal Degeneration in rd1 Mice by Intravitreally Injected Metformin. *Front Mol Neurosci* 12: 102. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00102>
12. *Dalk.e C, Löster J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Soewarto D, Favor J* (2004) Electroretinography as a screening method for mutations causing retinal dysfunction in mice. *Investigative Ophthalmol & Visual Sci* 45 (2): 601–9. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0561>
13. *Mace E, Caplette R, Marre O, Sengupta A, Chaffiol A, Barbe P, et al.* (2015) Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV Restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol Ther* 23 (1): 7–16. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.154>
14. *Lu Q, Ganjawala TH, Krstevski A, Abrams GW, Pan ZH* (2020) Comparison of AAV-Mediated Optogenetic Vision Restoration between Retinal Ganglion Cell Expression and ON Bipolar Cell Targeting. *Mol Therap Meth Clin Devel* 18: 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.009>
15. *Tu HY, Matsuyama T* (2020) Multielectrode Array Recording of Mouse Retinas Transplanted with Stem Cell-Derived Retinal Sheets. *Methods Mol Biol* 2092: 207–220. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0175-4_15
16. *Reinhard K, Tikidji-Hamburyan A, Seitter H, Idrees S, Mutter M, Benkner B* (2014) Step-by-step instructions for retina recordings with perforated multi electrode arrays. *PloS one* 9 (8): e106148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106148>
17. *Planul A, Dalkara D* (2017) Vectors and Gene Delivery to the Retina. *Annu Rev Vis Sci* 3: 121–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061413>
18. *Juttner J, Szabo A, Gross-Scherf B, Morikawa RK, Rompani SB, Hantz P* (2019) Targeting neuronal and glial cell types with synthetic promoter AAVs in mice, non-human primates and humans. *Nat Neurosci* 22 (8): 1345–1356. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0431-2>
19. *de Leeuw CN, Dyka FM, Boye SL, Laprise S, Zhou M, Chou AY* (2014) Targeted CNS Delivery Using Human Mini Promoters and Demonstrated Compatibility with Adeno-Associated Viral Vectors. *Mol Therap Meth Clin Dev* 1: 5. <https://doi.org/10.1038/mtm.2013.5>
20. *Korecki AJ, Cueva-Vargas JL, Fornes O, Agostinone J, Farkas RA, Hickmott JW, et al.* (2021) Human Mini Promoters for ocular-rAAV expression in ON bipolar, cone, corneal, endothelial, Muller glial, and PAX6 cells. *Gene Ther* 28 (6): 351–372. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00227-z>
21. *Auricchio A, Kobinger G, Anand V, Hildinger M, O'Connor E, Maguire AM* (2001) Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* 10(26): 3075–3081. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.26.3075>
22. *Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, Sanges D, Iodice C, Petrillo M* (2007) Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* 81 (20): 11372–1380. <https://doi.org/10.1128/JVI.01327-07>
23. *Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, et al.* (2013) In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 5 (189): 189ra76. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005708>
24. *Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Deng WT, Pang JJ, Min SH* (2011) Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther* 19 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.234>
25. *Adijanto J, Naash MI* (2015) Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 95 (Pt B): 353–367. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.028>
26. *Rotov AY, Romanov IS, Tarakanchikova YV, Astakhova LA* (2021) Application Prospects for Synthetic Nanoparticles in Optogenetic Retinal Prosthetics. *J Evol Biochem Physiol* 57 (6): 1333–1350. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060132>
27. *Cardoso MM, Peça IN, Roque AC* (2012) Antibody-conjugated nanoparticles for therapeutic applications. *Current Med Chem* 19 (19): 3103–3127. <https://doi.org/10.2174/092986712800784667>
28. *Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF* (2013) Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv Drug Deliv Rev* 65 (1): 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.041>
29. *Batabyal S, Kim S, Wright W, Mohanty S* (2021) Layer-specific nanophotonic delivery of therapeutic opsin-encoding genes into retina. *Exp Eye Res* 205: 108444. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108444>
30. *Baker CK, Flannery JG* (2018) Innovative Optogenetic Strategies for Vision Restoration. *Front Cell Neurosci* 12: 316. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00316>
31. *Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN* (2021) Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med* 27 (7): 1223–1229. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>
32. *Jones BW, Kondo M, Terasaki H, Lin Y, McCall M, Marc RE* (2012) Retinal remodeling. *Jpn J Ophthalmol* 56 (4): 289–306. <https://doi.org/10.1007/s10384-012-0147-2>
33. *Jones BW, Pfeiffer RL, Ferrell WD, Watt CB, Marmor M, Marc RE* (2016) Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 150: 149–165. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.03.018>

34. *Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, et al.* (2007) Neural reprogramming in retinal degeneration. *Investigat Ophthalmol Vis Sci* 48 (7): 3364–3371.
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-0032>
35. *Chua J, Fletcher EL, Kalloniatis M* (2009) Functional remodeling of glutamate receptors by inner retinal neurons occurs from an early stage of retinal degeneration. *J Comp Neurol* 514 (5): 473–491.
<https://doi.org/10.1002/cne.22029>
36. *Gilhooley MJ, Hickey DG, Lindner M, Palumaa T, Hughes S, Peirson SN* (2021) ON-bipolar cell gene expression during retinal degeneration: Implications for optogenetic visual restoration. *Exp Eye Res* 207: 108553.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108553>
37. *Margolis DJ, Detwiler PB* (2011) Cellular origin of spontaneous ganglion cell spike activity in animal models of retinitis pigmentosa. *J Ophthalmol*. 2011: 507037.
<https://doi.org/10.1155/2011/507037>
38. *Trenholm S, Awatramani GB* (2015) Origins of spontaneous activity in the degenerating retina. *Front Cell Neurosci* 9: 277.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00277>
39. *Borowska J, Trenholm S, Awatramani GB* (2011) An intrinsic neural oscillator in the degenerating mouse retina. *J Neurosci* 31 (13): 5000–5012.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5800-10.2011>
40. *Margolis DJ, Gartland AJ, Singer JH, Detwiler PB* (2014) Network oscillations drive correlated spiking of ON and OFF ganglion cells in the rd1 mouse model of retinal degeneration. *PloS One* 9 (1): e86253.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086253>
41. *Stasheff SF* (2008) Emergence of sustained spontaneous hyperactivity and temporary preservation of OFF responses in ganglion cells of the retinal degeneration (rd1) mouse. *J Neurophysiol* 99 (3): 1408–1421.
<https://doi.org/10.1152/jn.00144.2007>
42. *Eleftheriou CG, Cehajic-Kapetanovic J, Martial FP, Milosavljevic N, Bedford RA, Lucas RJ* (2017) Meclofenamic acid improves the signal to noise ratio for visual responses produced by ectopic expression of human rod opsin. *Mol Vis* 23: 334–345.
43. *Kolb H, Linberg KA, Fisher SK* (1992) Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol* 318 (2): 147–187.
<https://doi.org/10.1002/cne.903180204>
44. *Kim US, Mahroo OA, Mollon JD, Yu-Wai-Man P* (2021) Retinal Ganglion Cells-Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Front Neurol* 12: 661938.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661938>
45. *Rotov AY, Nikolaeva DA, Astakhova LA, Firsov ML* (2020) Virus Vectors for Optogenetic Prosthetization of the Retina. *Neurosci Behav Physiol* 50 (3): 358–366.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00911-4>
46. *McClements ME, Staurengi F, Visel M, Flannery JG, MacLaren RE, Cehajic-Kapetanovic J* (2021) AAV Induced Expression of Human Rod and Cone Opsin in Bipolar Cells of a Mouse Model of Retinal Degeneration. *BioMed Res Internat* 2021: 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2021/4014797>
47. *Kim DS, Matsuda T, Cepko CL* (2008) A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression. *J Neurosci* 28 (31): 7748–7764.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0397-08.2008>
48. *van WM, Hulliger EC, Girod L, Ebnetter A, Kleinlogel S* (2017) Present Molecular Limitations of ON-Bipolar Cell Targeted Gene Therapy. *Front Neurosci* 11: 161.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00161>
49. *Lu Q, Ganjawala TH, Ivanova E, Cheng JG, Troilo D, Pan ZH* (2016) AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates. *Gene Ther* 23 (8–9): 680–689. [gt201642 \[pii\];
<https://doi.org/10.1038/gt.2016.42>](https://doi.org/10.1038/gt.2016.42)
50. *Hulliger EC, Hostettler SM, Kleinlogel S* (2020) Empowering Retinal Gene Therapy with a Specific Promoter for Human Rod and Cone ON-Bipolar Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 17: 505–519.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.03.003>
51. *Gilhooley MJ, Lindner M, Palumaa T, Hughes S, Peirson SN, Hankins MW* (2022) A systematic comparison of optogenetic approaches to visual restoration. *Mol Ther Methods Clin Dev* 25: 111–123.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.03.003>
52. *Doroudchi MM, Greenberg KP, Liu J, Silka KA, Boyden ES, Lockridge JA* (2011) Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther* 19 (7): 1220–1229.
<https://doi.org/10.1038/mt.2011.69>
53. *Wright P, Rodgers J, Wynne J, Bishop PN, Lucas RJ, Milosavljevic N* (2021) Viral Transduction of Human Rod Opsin or Channelrhodopsin Variants to Mouse ON Bipolar Cells Does Not Impact Retinal Anatomy or Cause Measurable Death in the Targeted Cells. *Int J Mol Sci* 22 (23): 13111.
<https://doi.org/10.3390/ijms222313111>
54. *Chaffiol A, Caplette R, Jaillard C, Brazhnikova E, Desrosiers M, Dubus E, et al.* (2017) A New Promoter Allows Optogenetic Vision Restoration with Enhanced Sensitivity in Macaque Retina. *Mol Ther* 25 (11): 2546–2560.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.011>
55. *Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T* (2014) Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15 (8): 507–519.
<https://doi.org/10.1038/nrn3783>

56. *van WM, Pielecka-Fortuna J, Lowel S, Kleinlogel S* (2015) Restoring the ON Switch in Blind Retinas: Opto-mGluR6, a Next-Generation, Cell-Tailored Optogenetic Tool. *PLoS Biol* 13 (5): e1002143. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002143>
57. *Schilardi G, Kleinlogel S* (2021) Two Functional Classes of Rod Bipolar Cells in the Healthy and Degenerated Optogenetically Treated Murine Retina. *Front Cell Neurosci* 15: 809531. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.809531>.
58. *Khabou H, Garita-Hernandez M, Chaffiol A, Reichman S, Jaillard C, Brazhnikova E* (2018) Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration. *JCI Insight* 3 (2): 96029. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96029>
59. *Simunovic MP, Shen W, Lin JY, Protti DA, Lisowski L, Gillies MC* (2019) Optogenetic approaches to vision restoration. *Exp Eye Res* 178: 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.09.003>
60. *Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM* (2006) Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50(1): 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.026>
61. *Lindner M, Gilhooley MJ, Peirson SN, Hughes S, Hankins MW* (2021) The functional characteristics of optogenetic gene therapy for vision restoration. *Cell Mol Life Sci* 78 (4) 1597–1613. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03597-6>
62. *Martemyanov KA, Sampath AP* (2017) The Transduction Cascade in Retinal ON-Bipolar Cells: Signal Processing and Disease. *Ann Rev Vision Sci* 3: 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061338>
63. *Gaub BM, Berry MH, Holt AE, Isacoff EY, Flannery JG* (2015) Optogenetic Vision Restoration Using Rhodopsin for Enhanced Sensitivity. *Mol Ther* 23 (10): 1562–1571. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.121>
64. *Cehajic-Kapetanovic J, Eleftheriou C, Allen AE, Milosavljevic N, Pienaar A, Bedford R* (2015) Restoration of Vision with Ectopic Expression of Human Rod Opsin. *Curr Biol* 25 (16): 2111–2122. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.029>
65. *Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH* (2008) Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Nat Acad Sci USA* 105 (41): 16009–16014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806114105>
66. *De Silva SR, Barnard AR, Hughes S, Tam SKE, Martin C, Singh MS* (2017) Long-term restoration of visual function in end-stage retinal degeneration using subretinal human melanopsin gene therapy. *Proce Nat Acad Sci USA* 114 (42): 11211–11216. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701589114>
67. *Ballister ER, Rodgers J, Martial F, Lucas RJ* (2018) A live cell assay of GPCR coupling allows identification of optogenetic tools for controlling Go and Gi signaling. *BMC biology* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0475-2>
68. *Thyagarajan S, van Wyk M, Lehmann K, Löwel S, Feng G, Wässle H* (2010) Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci* 30 (26): 8745–8758. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4417-09.2010>
69. *Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E* (2010) Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res* 90 (3): 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.12.006>
70. *Sengupta A, Chaffiol A, Mace E, Caplette R, Desrosiers M, Lampic M* (2016) Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol Med* 8 (11): 1248–1264. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505699>
71. *Berry MH, Holt A, Salari A, Veit J, Visel M, Levitz J, et al.* (2019) Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin. *Nat Commun* 10 (1): 1221. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x>
72. *Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Münch TA, Kim DS, Busskamp V, et al.* (2008) Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 11 (6): 667–675. <https://doi.org/10.1038/nn.2117>
73. *Cronin T, Vandenberghe LH, Hantz P, Juttner J, Reimann A, Kacsó AE* (2014) Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter. *EMBO Mol Med* 6 (9): 1175–1190. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404077>
74. *Ameline B, Tshilenge KT, Weber M, Biget M, Libeau L, Caplette R* (2017) Long-term expression of melanopsin and channelrhodopsin causes no gross alterations in the dystrophic dog retina. *Gene Ther* 24 (11): 735–741. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.63>
75. *Beltran WA* (2009) The use of canine models of inherited retinal degeneration to test novel therapeutic approaches. *Vet Ophthalmol* 12 (3): 192–204. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00694.x>
76. *Chaffiol A, Provansal M, Joffrois C, Blaize K, Labernede G, Goulet R* (2022) In vivo optogenetic stimulation of the primate retina activates the visual cortex after long-term transduction. *Mol Ther Meth Clin Dev* 24: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.11.009>
77. *Winkler PA, Occelli LM, Petersen-Jones SM* (2020) Large Animal Models of Inherited Retinal Degenerations: A Review. *Cells* 9 (4): 882 <https://doi.org/10.3390/cells9040882>
78. *Ganjawala TH, Lu Q, Fenner MD, Abrams GW, Pan ZH* (2019) Improved CoChR Variants Restore Visual Acuity and Contrast Sensitivity in a Mouse Model of Blindness under Ambient Light Conditions. *Mol Ther* 27 (6) 1195–1205. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.04.002>

Optoprosthetics of Retinal Bipolar Cells

A. Yu. Rotov^a and M. L. Firsov^{a, #}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint-Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: Michael.Firsov@gmail.com*

Although the experience of optogenetic retinal prosthetics in animal models dates back more than 16 years, the first results obtained on humans have only appeared in the last year. Over this period, the main challenges of prosthetics became clear and the approaches to their solution were proposed. In this review, we aim to present the achievements in the field of optogenetic prosthetics of bipolar cells, focusing mainly on relatively recent publications. The review addresses the advantages and disadvantages of bipolar cell prosthetics as compared to the alternative target, retinal ganglion cells, and provides a comparative analysis of the effectiveness of ionotropic light-sensitive proteins, channelrhodopsins, or metabotropic receptors, rhodopsins, as prosthetic tools.

Keywords: retina, optogenetics, channelrhodopsin, rhodopsin, prosthetics, bipolar cells, neurodegenerative diseases

ХАРАКТЕР ЛОКАЛИЗАЦИИ GABA-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ GAT₁ ТРАНСПОРТЕРА GABA В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2022 г. Л. И. Хожай^{1,*}, В. А. Отеллин¹

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

*e-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Целью работы было изучение распределения нейронов, содержащих GABA, и уровня экспрессии GAT₁ в разных слоях неокортекса крыс в неонатальный период после перинатальной гипоксии. Воздействие гипоксии на мозг новорожденных крыс осуществляли на 2-е неонатальные сутки в течение 1 ч при содержании кислорода в дыхательной смеси – 7.8%. Были применены иммуногистохимические реакции на выявление GABA и GAT₁. Изучали соматосенсорную область неокортекса на 5-е и 10-е постнатальные сутки (П5, П10). Показано, что на ранних сроках неонатального периода (П5) воздействие перинатальной гипоксии приводит к увеличению числа тормозных интернейронов во всех слоях неокортекса. К концу неонатального периода (П10) их численность в слоях коры снижается, а в слое V значительно сокращается. На протяжении неонатального периода у контрольных животных во всех слоях неокортекса уровень экспрессии GAT₁ постепенно повышается, после воздействия перинатальной гипоксии происходит значительное снижение экспрессии GAT₁, в том числе, в слоях неокортекса, где количество GABAергических нейронов соответствует контрольному значению. Эти факты свидетельствуют о том, что воздействие острой перинатальной гипоксии может приводить к изменению синаптической трансмиссии GABA в всех слоях неокортекса в конце неонатального периода.

Ключевые слова: неокортекс, гипоксия, GABA, транспортер GAT₁, неонатальный период

DOI: 10.31857/S0044452922060043

Известно, что в неонатальный период головной мозг отличается высокой чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов среды. Гипоксия/ишемия в это время является одним из мощных повреждающих факторов, приводящих к структурно функциональным нарушениям в ЦНС и представляет одну из основных причин детской смертности на ранних постнатальных сроках развития. Новорожденные, в условиях преждевременных родов, испытавшие перинатальную гипоксию, часто имеют сниженную массу тела, а впоследствии, умственную отсталость, синдром дефицита внимания, гиперактивность [1]. Более 70% недоношенных детей, переживших перинатальную гипоксию, страдают от апноэ и других респираторных нарушений, которые приводят к церебральной гипоксемии. Установлено, что результатом повреждающего действия низкого содержания кислорода в тканях организма в неонатальный период являются изменение дифференцировки клеток, частичная утрата нейронов, глии и их клеток-предшественников [2, 3].

Считается, что в период развития и становления формаций мозга расположение и упорядоченное распределение разных типов нейронов в его струк-

турах, в частности, в неокортексе, имеют критическое значение для нормального функционирования ЦНС [4, 5]. Показано, что перинатальная гипоксия оказывает повреждающее действие на тормозные GABAергические нейроны неокортекса [3, 6], однако, вопрос о распределении нейронов, в которых синтезируется GABA, и динамике изменения их численности в разных слоях неокортекса в неонатальный период после воздействия гипоксии, изучен недостаточно.

Транспортные белки для GABA представлены четырьмя классами, из которых GAT₁ является одним из основных транспортеров при синаптической GABAергической нейротрансмиссии [7]. Предполагается, что GAT₁ является Na⁺-зависимым транспортным белком обратного захвата, локализующийся, как правило, на плазматической мембране отростков и тел нейронов [8, 9]. Кроме того, этот транспортный белок был выявлен в цитоплазме нейронов и проксимальных отделах их отростков, в терминалях аксонов, участвующих в формировании симметричных синапсов, в отростках астроцитов [10]. Основная функция GAT₁ заключается в переносе через мембрану аниона этой аминокислоты на основе градиента катиона на-

трия. Эффективность GABAергической нейротрансдачи определяется скоростью обратного захвата GABA, осуществляемого GAT₁ транспортером, из синаптической щели или межклеточного пространства [11, 12]. Установлено, что GAT₁ регулирует активность основных пирамидных нейронов коры и нарушение его экспрессии может быть связано с многочисленными патологическими состояниями головного мозга, включая эпилепсию [7, 12, 13]. Несмотря на значительные повреждения головного мозга, вызываемые гипоксией в ранний период развития, до сих пор не существует эффективных методов коррекции или лечения последствий ее действия.

Транспортеры GABA, а особенно, GAT₁, от функции которых зависит баланс процессов торможения и возбуждения в мозге, могут выступать мишенями для фармакологического воздействия. Для этого необходимо представлять локализацию экспрессии транспортера в формациях мозга на ранних сроках развития. Вопрос о динамике экспрессии GAT₁ в разных слоях неокортекса в неонатальный период развития после воздействия гипоксии до настоящего времени остается мало изученным.

В связи с этим целью работы было исследование распределения нейронов, содержащих GABA, и уровня экспрессии GAT₁ в разных слоях неокортекса после воздействия перинатальной гипоксии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на лабораторных крысах линии Wistar из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН” (Санкт-Петербург). Все процедуры с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных, а также требований Комиссии по контролю содержания и использования лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 06/14 от “14” июня 2022 г.).

В работе использовали модель недоношенной беременности человека, т.е. модель общей гипоксии, которая воспроизводит спектр повреждений мозга, наблюдаемых у недоношенных новорожденных детей при условии недоразвития респираторной системы и нарушения респираторных функций (асфиксии). Считается, что развитие мозга новорожденных крыс на 1–2-е сутки соответствует степени развития мозга преждевременно родившихся детей (примерно 29–30 нед беременности) [1]. Использование этой модели исключает смертность животных, при этом гипоксия оказывает повреждающее действие на структуры ЦНС.

Воздействие гипоксии

Воздействие общей острой гипоксии осуществляли на 2-е постнатальные сутки в специальной камере в течение 1 ч при содержании в дыхательной смеси: кислорода – 7.6–7.8%; углекислого газа – 0.15–0.21%; азота – 91.8%, при температуре 21.3–23°C и нормальном общем атмосферном давлении (760 мм рт.ст.).

В работе использовали 2 группы животных: (1) крысы, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии ($n = 12$); и (2) контрольные животные тех же возрастных сроков ($n = 12$). Исследование проводили на 5-е и 10-е постнатальные сутки (P5, P10), т.е. в середине и конце неонатального периода. Изучали соматосенсорную область неокортекса, которая является зоной обработки информации, поступающей от сенсорных рецепторов (тактильных, болевых, температурных, давления), инициации мышечного ответа, двигательного поведения, она имеет связи с таламическими структурами и спинным мозгом, здесь осуществляется обработка сигналов, полученных от чувствительных периферических рецепторов.

Гистологические и иммуногистохимические методы исследования

Головной мозг извлекали и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм на уровне брегмы – 0.60–0.40 мм (по стереотаксическому атласу координатных таблиц мозга крыс на P5 и P10 [14]). Срезы помещали на предметные стекла Super-Frost Plus Gold (Menzel-Glaser, Германия) и получали цифровые изображения серийных гистологических срезов при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) при увеличении объектива 100× и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Иммуногистохимическую реакцию на GABA проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, ab8891, Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (pH 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин и блокировки эндогенной пероксидазы раствором 3% перекиси водорода в течение 30 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP) (Abcam, Великобритания), помещая в них срезы на 40 мин при комнатной температуре.

Иммуногистохимическую реакцию на GAT₁ проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA trans-

porter 1; GAT₁; ab426, Abcam, Великобритания) в разведении 1:100. После процедуры теплового демаскирования белков в цитратном буфере (рН 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин и блокировки эндогенной пероксидазы раствором 3% перекиси водорода в течение 30 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при 4°C в течение 18 ч. В качестве вторичных реагентов для GAT₁ использовали реактивы из набора EnVision+System- HRP Labeled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Срезы помещали во вторичные антитела на 30 мин при комнатной температуре. Визуализацию продукта обеих иммунных реакций осуществляли использованием хромогена DAB+ (Dako, Дания), специфичность реакций проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител). Срезы заключали в синтетическую среду Permaunt (Termo, США).

Статистическая обработка полученных данных и оценка оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции

При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от контрольных и подопытных животных.

Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм² (условной единице площади) при увеличении объектива 100×. Количественный анализ данных осуществляли на изображениях, полученных с 10–15 гистологических срезов мозга, взятого от 6 животных каждой исследуемой возрастной группы, при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0.

Оценку интенсивности иммунной реакции производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sg и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (Санкт-Петербург). Оценивали оптическую плотность (D) продукта реакции в нейропиле: в сети иммунопозитивных отростков, терминалей, а также в скоплениях мелких и крупных гранул. Последние, предположительно, считаются терминальными синаптическими структурами и их скоплениями [15]. Для этого контуром выделяли участки сети иммунопозитивных отростков и скоплений гранул. Уровень содержания GAT₁ выражали в значениях оптической плотности (D) (условных единицах; у.е.) продукта иммунной реакции. Определяли среднее значение D в иммунопозитивных отростках и гранулах при увеличении объектива 100×. Измерения

проводили на 15 серийных срезах мозга, взятого от 5 животных каждой исследуемой группы.

Все статистически обработанные данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Для анализа и сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и *oneway* ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc., США), различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Количество нейронов, иммунопозитивных на GABA, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии

У животных в контроле (на П5) в слое I присутствует небольшое число интернейронов (6.2 ± 0.9 , табл. 1), сеть иммунопозитивных отростков и многочисленные синаптические структуры. В слоях II–III число иммунопозитивных нейронов на единицу площади составляет 18.6 ± 2.1 (табл. 1), при этом нейропиле развит слабо, присутствуют отдельные иммунопозитивные отростки, имеющие варикозные расширения и редкие синаптические структуры (рис. 1а). В слоях IV и V число иммунопозитивных нейронов в 1.5 и 2.3 раза меньше (12.5 ± 1.8 и 8.0 ± 1.4 соответственно), чем в верхних слоях II–III (табл. 1). Нейропиле содержит более плотную сеть иммунопозитивных отростков, имеющих варикозные расширения и синаптические структуры. В слое VI количество иммунопозитивных нейронов соответствует таковому в верхних слоях (19.3 ± 1.2) (табл. 1). Плотность распределения синаптических структур и сети иммунопозитивных отростков с варикозными расширениями в нейропиле аналогична таковой в слое V.

После воздействия гипоксии в слоях I и II–III количество иммунопозитивных нейронов такое же, как и в аналогичных слоях у животных в контроле, в слоях IV и V число таких нейронов существенно повышается в 1.3 и 2.5 раза соответственно, в слое VI незначительно снижается (табл. 1). Таким образом, исследование показало, что у контрольных животных на П5 в верхних слоях II–III и глубоком слое VI число нейронов, иммунопозитивных на GABA, существенно превышает их количество в слоях IV и V. После воздействия гипоксии в верхних слоях высокая численность таких нейронов сохраняется, а в глубоких слоях IV и V их число значительно увеличивается и примерно соответствует их числу в верхних слоях.

Таблица 1. Количество нейронов иммунопозитивных на GABA в слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е и 10-е постнатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии (число клеток на у. е. площади)

Слой неокортекса	Число нейронов, иммунопозитивных на GABA, на у. е. площади			
	Сроки развития			
	П5 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (контроль)	П10 (гипоксия)
I	6.2 ± 0.4	4.8 ± 1.4	5.8 ± 1.2	6.4 ± 1.3
II–III	18.6 ± 1.4	19.9 ± 1.4	9.0 ± 1.3	7.3 ± 1.1
IV	12.5 ± 1.8	16.2 ± 1.5	10.7 ± 1.2	12.4 ± 0.9
V	8.0 ± 1.4	20.1 ± 0.9	7.4 ± 0.9	4.3 ± 1.0*
VI	19.3 ± 1.2	16.4 ± 1.3	8.5 ± 0.8	8.3 ± 0.8

* Отличия количественных значений в слоях неокортекса между животными разных возрастных групп достоверны при $p < 0.05$.

Количество нейронов, иммунопозитивных на GABA, в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 10-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии

У животных в контроле (на П10) в слое I, также как и на предыдущем сроке исследования, находится небольшое число иммунопозитивных нейронов (табл. 1), присутствуют сеть иммунопозитивных отростков и большое количество синаптических структур. В слоях II–III число иммунопозитивных нейронов на у.е. площади значительно ниже (9.0 ± 1.3), чем таковое на П5 (табл. 1) (рис. 1a,b). В глубоких слоях IV, V и VI численность иммунопозитивных нейронов близка по значению и также соответствует таковой в верхних слоях II–III (10.7 ± 1.2 , 7.4 ± 0.9 и 8.5 ± 0.8 ; табл.1). В нейрорпиле всех слоев присутствует сеть иммунопозитивных отростков и синаптических структур, располагающихся как на отростках, так и на и телах большинства клеток.

После воздействия гипоксии у крыс (на П10) в слое I число иммунопозитивных клеток соответствует контрольному значению. В слоях II–III, IV и VI количество иммунопозитивных нейронов также сопоставимо с его значениями в контроле (табл. 1). Однако в слое V число иммунопозитивных нейронов оказалось значительно меньше (в 1.7 раза), чем у контрольных животных (табл. 1). Таким образом, у контрольных животных к концу неонатального периода (П10) в разных слоях (II–III, IV, V и VI) неокортекса значения численности нейронов, иммунопозитивных на GABA, сопоставимы между собой, т.е. тормозные интернейроны примерно равномерно распределяются в слоях неокортекса. После воздействия гипоксии численность нейронов, иммунопозитивных на GABA, в слоях почти не меняется за исключением их числа в слое V, где оно значительно сокращается.

Оптическая плотность (D) продукта иммунной реакции на GAT₁ в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии

У животных в контроле на П5 обнаружен самый высокий показатель оптической плотности продукта иммунной реакции на GAT₁ в слое I, самый низкий в слоях II–III (рис. 1c) и слое VI (табл. 2). После воздействия перинатальной гипоксии у крыс на П5 в верхних слоях I и II–III D существенно возрастает (в 1.25 и 2.4 раза соответственно). В слоях IV и VI почти не изменяется, а в слое V снижается почти в 1.5 раза (табл. 2).

Оптическая плотность (D) продукта иммунной реакции на GAT₁ в разных слоях соматосенсорной области неокортекса на 10-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия перинатальной гипоксии

У контрольных крыс D в слое I (по сравнению с П5) резко снижается (в 2 раза). В слоях II–III (рис. 1d), IV, V и VI существенно повышается (в 3.1; 1.3; 1.3 и 1.4 раза соответственно) (табл. 2). После воздействия перинатальной гипоксии у крыс на П10 D в слое I почти соответствует контрольному уровню (0.142 ± 0.007 и 0.128 ± 0.008), в слоях II–III (рис. 1e), IV и V D значительно снижается по сравнению с контрольными значениями в 3.8, 2.9 и 2.2 раза соответственно, однако, в слое VI D соответствует таковому значению в контроле (табл. 2). Таким образом, на протяжении неонатального периода у крыс в контроле в разных слоях соматосенсорной области коры интенсивность экспрессии GAT₁ меняется. В слое I на П5 она имеет самое высокое значение по сравнению с другими слоями, к концу неонатального периода (П10) она значительно снижается, а во всех остальных слоях интенсивность экспрессии GAT₁ существенно повышается. Воздействие гипоксии приводит к резкому увеличению экспрессии GAT₁ во всех слоях

на П5. К концу неонатального периода (П10) интенсивность экспрессии GAT_1 в слоях I и VI соответствует контрольным значениям, а в остальных слоях (II–III, IV и V) значительно снижается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что во время развития подавляющее большинство ГАВАергических нейронов происходит из медиального ганглиозного возвышения, одной из пролиферативных зон области subpallium, локализуемой в вентральной части конечного мозга [16–20]. Из этой зоны молодые ГАВАергические нейроны мигрируют в развивающиеся формации мозга, в том числе, и неокортекс, однако, механизмы, которые контролируют распределение мигрирующих нейронов по слоям коры, в настоящее время до конца неясны.

Во время раннего развития мозга высвобождаемая незрелыми нейронами ГАВА представляет транsmиттер, оказывающий возбуждающее действие, обусловленное деполяризацией незрелых нейронов. К деполяризации приводит активация ГАВА A рецептора, который открывает ионные каналы и вызывает отток ионов хлора, значительно снижая его внутриклеточную концентрацию и приводя к возникновению возбуждающего потенциала. Полагают, что возбуждающий эффект ГАВА необходим для осуществления процессов миграции (в этот момент ГАВА выступает как хемоаттрактант), для начальной дифференцировки нейронов, экспрессии рецепторов и установления нейронных связей [21, 22]. Одновременно с созреванием тормозной системы появляются коррелированные паттерны спонтанной активности нейронов у новорожденных грызунов и человека. Эта сетевая спонтанная активность обеспечивается деполяризацией незрелых нейронов, которая вызывается возбуждающим эффектом ГАВА. Установлено, что деполяризующее действие ГАВА и сетевая нейронная активность являются ключевыми регуляторами процессов, происходящих на субклеточном уровне, таких как экспрессия транспортеров, высвобождение хлоридов, экспрессия рецепторов к ГАВА и ГАВАергический синаптогенез, которые, в результате, лежат в основе смены возбуждающей функции ГАВА на тормозную [23, 24]. Было выявлено, что для поддержания уровня сетевой активности необходима определенная численность популяции интернейронов в развивающемся неокортексе [25].

Развитие неокортекса у млекопитающих и человека происходит на протяжении длительного времени, как в пренатальный, так и неонатальный периоды. Во время последнего завершаются процессы миграции нейронов, их дифференцировка и становление нейронами. Установлено, что верхние слои (II–III) неокортекса образуются последними [26, 27].

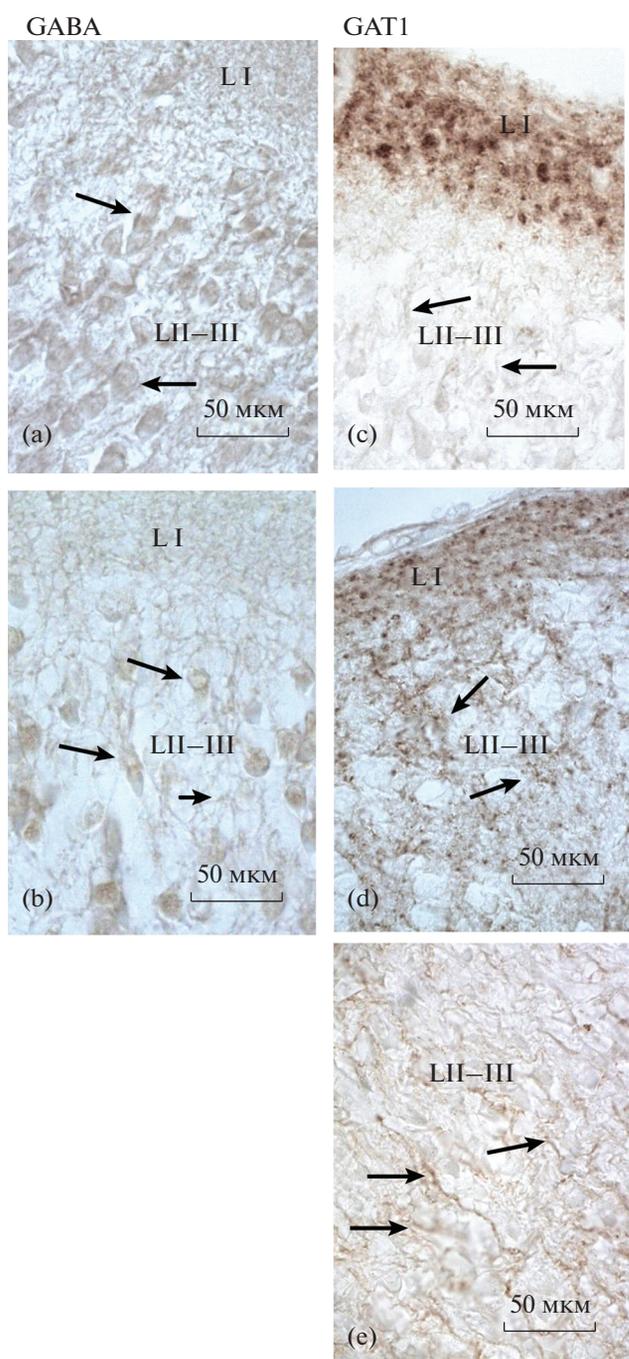


Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крысы на П5 (а,с) и П10 (b, d, e), верхние слои II–III (L II–III) у контрольных животных (a,b,c,d) и после воздействия перинатальной гипоксии (e). Иммуногистохимические реакции на ГАВА (a, b) и GAT_1 (c, d, e); a – плотное расположение нейронов, содержащих ГАВА (стрелки); b – снижение плотности распределения нейронов, содержащих ГАВА (длинные стрелки), сеть иммунопозитивных на ГАВА отростков (короткая стрелка); c – отдельные иммунопозитивные на GAT_1 отростки (стрелки); d – сеть иммунопозитивных отростков и гранул (синаптических структур) на GAT_1 (стрелки); e – отдельные иммунопозитивные на GAT_1 отростки нейронов (стрелки).

Таблица 2. Показатели оптической плотности (D) продукта иммунной реакции на GAT_1 в слоях соматосенсорной области неокортекса на 5-е и 10-е неонатальные сутки у крыс в контроле и после воздействия гипоксии (в у. е.)

Слой неокортекса	D (у. е.)			
	Сроки развития			
	П5 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (контроль)	П10 (гипоксия)
I	0.280 ± 0.004	0.350 ± 0.008	$0.142 \pm 0.007^*$	0.128 ± 0.008
II–III	0.044 ± 0.002	0.106 ± 0.007	$0.138 \pm 0.005^*$	$0.036 \pm 0.004^*$
IV	0.071 ± 0.003	0.059 ± 0.006	$0.091 \pm 0.004^*$	$0.031 \pm 0.005^*$
V	0.095 ± 0.004	0.064 ± 0.008	$0.123 \pm 0.008^*$	$0.055 \pm 0.008^*$
VI	0.048 ± 0.005	0.053 ± 0.007	0.069 ± 0.003	0.067 ± 0.006

* Отличия значений D в разных слоях неокортекса между животными различных возрастных групп достоверны при $p < 0.05$.

Результаты проведенного исследования показали, что в неонатальный период у крыс, как у контрольных, так и переживших перинатальную гипоксию, в разных слоях неокортекса имеет место динамика изменения численности тормозных интернейронов и экспрессии GAT_1 . Выявлено, что на начальных сроках (П5) неонатального периода в верхних слоях II–III число клеток, иммунопозитивных на ГАВА, существенно превосходит их численность в более глубоких слоях. Кроме того, эти клетки имеют веретеновидную форму, которая, как правило, характерна для незрелых нейронов, здесь слабо развит нейропил и крайне мало синаптических структур. Ранее было высказано предположение, что одним из факторов, оказывающих влияние на миграционное поведение нейронов, является программа внутреннего созревания ГАВАергических нейронов, согласно которому мигрирующие клетки, достигнув в неокортексе определенного местоположения, могут временно находиться в периоде ожидания: или завершения определенного этапа своей дифференцировки, или созревания своих будущих мишеней и, затем, могут продолжить миграцию [28]. Вероятно, повышенное число молодых интернейронов в верхних слоях II–III на П5 может быть временным локальным скоплением клеток, находящихся в состоянии ожидания, и свидетельствовать о том, что на П5 процессы формирования верхних слоев и дифференцировки нейронов еще не завершены.

К концу неонатального периода (к П10), в верхних слоях происходит значительное снижение числа нейронов, позитивных на ГАВА, которое становится сопоставимым с численностью интернейронов в слоях VI и V. Установлено, что на ранних сроках неонатального периода в развивающийся неокортекс продолжается миграция молодых ГАВАергических нейронов, которые проходят через белое вещество, слой VI и далее мигрируют в слои, расположенные выше [29]. Результаты данного исследования показали, что на П5 в слое VI (также как и в слоях II–III) присутствует значи-

тельное число ГАВАергических нейронов, которое также можно рассматривать как скопление молодых нейронов, находящихся либо в состоянии транзита, либо в определенном периоде ожидания. Далее в слое VI численность ГАВАергических нейронов снижается более, чем в 2 раза, и становится сопоставимой с числом интернейронов в остальных слоях II–V, т.е. к концу неонатального периода у контрольных животных тормозные ГАВАергические интернейроны в разных слоях коры распределяются почти равномерно.

Слой I играет важную роль в формировании слоев неокортекса [30, 31]. В неонатальный период в слое I присутствуют две популяции нейронов: клетки Cajal-Retzius и ГАВАергические интернейроны, мигрирующие сюда из области subpallium [32, 33]. Находящиеся в нейропиле слоя I отростки локальных ГАВАергических нейронов и аксоны клеток Мартинотти образуют мощные ГАВАергические связи с клетками Cajal-Retzius, здесь же присутствуют дендриты пирамидных нейронов нижележащих слоев, устанавливающие связи с клетками Cajal-Retzius [34]. Результаты исследования показали, что у контрольных животных на протяжении неонатального периода в слое I количество ГАВАергических нейронов не изменяется, однако, при этом на П5 имеет место самая высокая интенсивность экспрессии GAT_1 . К концу неонатального периода в слое I интенсивность экспрессии GAT_1 значительно снижается. Ранее было показано, что на клетках Cajal-Retzius вблизи ГАВАергических синапсов количество ГАВА снижается в 2 раза в период с П2 по П7 и имеет тенденцию к дальнейшему снижению [35]. Следовательно, уменьшение количества ГАВА будет приводить к снижению экспрессии транспортера GAT_1 . Это предположение было подтверждено данными, полученными при изучении синтеза поверхностных белков, показавших, что снижение экспрессии поверхностного транспортера GAT_1 коррелирует с сокращением транспорта ГАВА [35]. Вероятно, снижение трансмиссии ГАВА в слое I к концу

неонатального периода связано с завершающими процессами формирования верхних слоев неокортекса и установлением дефинитивных синаптических связей.

Полученные данные показали, что воздействие перинатальной гипоксии приводит к существенному повышению численности ГАВАергических нейронов во всех слоях неокортекса на ранних сроках неонатального периода. Эти данные согласуются с результатами других авторов, сообщивших, что перинатальная гипоксия вызывает длительное повышение уровня ГАВА в неокортексе и гиппокампе [3, 36, 37]. Однако к концу неонатального периода число ГАВАергических нейронов во всех слоях неокортекса снижается и примерно соответствует контрольным значениям на П10, кроме слоя V, где количество ГАВАергических нейронов значительно меньше, чем в контроле.

Вероятно, воздействие гипоксии вызывает временную задержку процессов миграции нейронов, развития нейропиля, что может приводить к их скоплению в слоях неокортекса, которое нивелируется к концу неонатального периода. В этот период мигрирующие нейроны в слой V, вероятно, оказываются самыми высокочувствительными к гипоксии, что приводит к их частичной утрате. Было высказано предположение, что у части молодых ГАВАергических нейронов, направляющихся в неокортекс, период их миграции через белое вещество головного мозга совпадает с периодом особой чувствительности к воздействию гипоксии [38].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что у контрольных животных на протяжении неонатального периода, в отличие от слоя I, во всех слоях неокортекса происходит постепенное увеличение экспрессии GAT_1 и количества синаптических структур. Выявлено, что воздействие гипоксии приводит (на П5) к увеличению экспрессии GAT_1 в верхних слоях I–III, однако, в глубоких слоях IV–VI было отмечено снижение экспрессии GAT_1 . К концу неонатального периода (П10) было обнаружено резкое снижение экспрессии GAT_1 во всех слоях неокортекса, даже в тех слоях, в которых численность ГАВАергических нейронов соответствовала контрольным значениям.

Наблюдения, полученные в недавних работах, показали, что воздействие гипоксии на ранних сроках неонатального периода вызывает нарушение ветвления дендритных отростков нейронов коры. Считают, что уменьшение сложности ветвления дендритных ветвей является отражением нарушения созревания основных проекционных нейронов [39]. В другом исследовании в ответ на воздействие гипоксии у плода овцы были выявлены нарушения созревания дендритного отростка пирамидных нейронов во всех кортикальных слоях и общее уменьшение объема мозга. Показано, что эти нарушения созревания нейронов совпадают с

критическим периодом установления нейронных связей [40]. Наряду с упрощением сложности ветвления дендритного отростка будут происходить нарушение процессов синаптогенеза и сокращение количества синаптических контактов между пирамидными и ГАВАергическими нейронами, что, в свою очередь, будет приводить к снижению синаптической трансмиссии ГАВА во всех слоях неокортекса. Вероятно, этим можно объяснить выявленное нами значительное снижение экспрессии GAT_1 во всех слоях неокортекса после воздействия гипоксии, не смотря на сходное число ГАВАергических интернейронов в слоях коры у контрольных и подопытных животных, установившееся к концу неонатального периода.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в течение неонатального периода в разных слоях неокортекса существует динамика изменения как числа нейронов, содержащих ГАВА, так и экспрессии GAT_1 . Середина неонатального периода (П5) – это срок, когда активно идет процесс стратификации, который заканчивается к П7 и, вероятно, происходит завершение формирования верхних слоев, которые в ходе развития образуются последними. Показано, что у животных в контроле к концу неонатального периода молодые ГАВАергические нейроны распределяются по слоям неокортекса почти равномерно и к этому времени существенно повышается уровень экспрессии GAT_1 , что может свидетельствовать об установлении синаптической трансмиссии ГАВА. Воздействие гипоксии приводит сначала к повышению числа интернейронов в слоях коры, но к концу неонатального периода их количество снижается и соответствует контрольным значениям, при этом резко снижается уровень экспрессии GAT_1 , что скорее всего можно рассматривать как нарушение ГАВАергического синаптогенеза и общего созревания нейронов неокортекса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00052\22.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.А.О., Л.И.Х.), сбор, обработка и анализ данных (Л.И.Х.), написание и редактирование текста (Л.И.Х.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Otellin VA, Khozhai LI, Shishko TT, Vershinina EA* (2021) Nucleolar ultrastructure in neurons of the rat neocortical sensorimotor area during the neonatal period after perinatal hypoxia and its pharmacological correction. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1251–1256. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060053>
2. *McClendon E, Kevin C, Gong X, Sharifnia E, Hagen M, Cai V, Shaver D, Riddle A, Dean JM, Gunn AJ, Mohr C, Kaplan JS, Rossi DJ, Kroenke CD., Hohimer AR, Back SA* (2014) Prenatal cerebral ischemia triggers dysmaturation of caudate projection neurons. *Ann Neurol* 75: 508–524. <https://doi.org/10.1002/ana.24100>
3. *Pozdnyakova N, Dudarenko M, Borisova T* (2019) Age-dependency of levetiracetam effects on exocytotic GABA release from nerve terminals in the hippocampus and cortex in norm and after perinatal hypoxia. *Cel Mol Neurobiol* 39: 701–714. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00676-6>
4. *Fishell G, Rudy B* (2011) Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “where the wild things are”. *Annu Rev Neurosci* 34: 535–567. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113717>
5. *Sahara S, Yanagawa Y, O’Leary DD, Stevens CF* (2012) The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J Neurosci* 32: 4761–4761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6412-11.2012>
6. *Хожай ЛИ, Отеллин ВА* (2021) Реорганизация сети интернейронов, экспрессирующих парвальбумин, в неокортексе крыс после перинатальной гипоксии и возможность ее фармакологической коррекции. *Рос физиол журн* 107: 1–10. [*Khozhai LI, Otellin VA* (2021) Reorganization of a network of interneurons expressing parvalbumin in the rat’s neocortex after perinatal hypoxia and the possibility of its pharmacological correction. *Russ J Physiol* 107: 1–10. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813921100125>
7. *Gadea A, Lopez-Colome AM* (2001) Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res* 63: 461–468. <https://doi.org/10.1002/jnr.1040>
8. *Augood SJ, Herbison AE, Emson PC* (1995) Localization of GAT-1 GABA transporter mRNA in rat striatum: cellular coexpression with GAD67 mRNA, GAD67 immunoreactivity, and parvalbumin mRNA. *J Neurosci* 15: 865–874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00865.1995>
9. *Bernstein EM, Quick MWJ* (1999) Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. *Biol Chem*. 274: 889–895. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.889>
10. *Fattorini G, Melone M, Conti F* (2020) A reappraisal of GAT-1 localization in neocortex. *Front Cell Neurosci* 14: 9–20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00009>
11. *Loo DD, Eskandari S, Boorer KJ* (2000) Role of Cl⁻ in electrogenic Na⁺-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J Biol Chem* 275:37414–37422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007241200>
12. *Lu CC, Hilgemann DW* (1999) GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J Gen Physiol* 114:429–444. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.3.429>
13. *Qian Z, Lin Y, Xing J, Qiu Y, Ren L* (2018) Expression and functions of glutamate and γ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. *Mol Med Rep* 17: 8196–8202. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8888>
14. *Khazipov R, Zaynutdinova D, Ogievetsky E, Valeeva G, Mitrukhina O, Manent J-B, Represa A* (2015) Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front Neuroanat* 9: 161. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
15. *Guthmann A, Fritschy JM, Ottersen OP, Torp R, Herbert H* (1998) GABA, GABA transporters, GABA (A) receptor subunits and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. *J Comp Neurol* 400: 229–243.
16. *Butt SJ, Stacey JA, Teramoto Y, Vagnoni C* (2017) A role for GABAergic interneuron diversity in circuit development and plasticity of the neonatal cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 43: 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.03.011>
17. *Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marín O* (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27: 9682–9695. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2750-07.2007>
18. *Gelman DM, Marín O* (2010) Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31: 2136–2141. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07267.x>
19. *Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marín O, Pachnis V, Kessar N* (2007) Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* 27: 10935–10946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007>
20. *Taniguchi H, Lu J, Huang ZJ* (2013) The spatial and temporal origin of chandelier cells in mouse neocortex. *Science* 339: 70–74. <https://doi.org/10.1126/science.1227622>
21. *Teppola H, Aćimović J, Linne ML* (2019) Unique features of network bursts emerge from the complex interplay of excitatory and inhibitory receptors in rat neocortical networks. *Front Cell Neurosci* 13: 377388. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00377>
22. *Rheims S, Minlebaev M, Ivanov A, Represa A, Khazipov R, Holmes GL* (2008) Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro. *J Neurophysiol* 100: 609–619. <https://doi.org/10.1152/jn.90402.2008>
23. *Hanson E, Armbruster M, Lau LA, Sommer ME, Klafit ZJ, Swanger SA* (2019) Tonic activation of GluN2C/GluN2D-containing NMDA receptors by ambient glutamate facilitates cortical interneuron maturation. *J Neurosci* 39: 3611–3626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1392-18.2019>
24. *Flossmann T, Kaas T, Rahmati V, Kiebel SJ, Witte OW, Holthoff K* (2019) Somatostatin interneurons promote neuronal synchrony in the neonatal hippocampus. *Cell Rep* 26: 3173–3182. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.061>

25. *Sukenik N, Vinogradov O, Weinreb E, Segal M, Levina A, Moses E* (2021) Neuronal circuits overcome imbalance in excitation and inhibition by adjusting connection numbers. *Proc Natl Acad Sci USA* 118: e2018459118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018459118>
26. *Fishell G, Rudy B* (2011) Mechanisms of inhibition within the telencephalon: “where the wild things are”. *Annu Rev Neurosci* 34: 535–567. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113717>
27. *Sahara S, Yanagawa Y, O’Leary DD, Stevens CF* (2012) The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J Neurosci* 32: 4755–4761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6412-11.2012>
28. *Bartolini G, Ciceri G, Marín O* (2013) Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* 79: 849–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.014>
29. *Marín O, Rubenstein JLR* (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2 (11): 780–790. <https://doi.org/10.1038/35097509>
30. *Marín-Padilla M* (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21: 64–71. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01164-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01164-8)
31. *Soriano E, del Río JA* (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46: 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019>
32. *Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RAM, Fink A* (2003) Cajal–Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Devel Brain Res* 141: 39–53. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00641-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00641-7)
33. *Villar-Cerviño V, Molano-Mazón M, Catchpole T, Valdeolillos M, Henkemeyer M, Martínez LM, Borrell V, Marín O* (2013) Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 77: 457–471. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.023>
34. *Cosgrove KE, Maccafferri G* (2012) mGlu1 α -dependent recruitment of excitatory GABAergic input to neocortical Cajal-Retzius cells. *Neuropharmacology* 63: 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.025>
35. *Dvorzhak A, Myakhar O, Unichenko P, Kirmse K, Kirischuk S* (2010) Estimation of ambient GABA levels in layer I of the mouse neonatal cortex in brain slices. *J Physiol* 588: 2351–2360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187054>
36. *Pozdnyakova N, Dudarenko M, Yatsenko L, Himmelreich N, Krupko O, Borisova T* (2014) Perinatal hypoxia: different effects of the inhibitors of GABA transporters GAT1 and GAT3 on the initial velocity of [³H]GABA uptake by cortical, hippocampal, and thalamic nerve terminals. *Croat Med J* 55: 250–258. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.250>
37. *Qian Z, Lin Y, Xing J, Qiu Y, Ren L* (2018) Expression and functions of glutamate and γ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. *Mol Med Rep* 17: 8196–8202. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8888>
38. *Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y* (2003) Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Rev* 41:1–12. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00216-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00216-3)
39. *Warm D, Schroer J, Sinning A* (2021) GABAergic interneurons in early brain development: conducting and orchestrated by cortical network activity. *Front Mol Neurosci* 14: 807969. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.807969>
40. *Dean J, McClendon E, Hansen K, Azimi-Zonooz A, Chen K, Riddle A, Gong X, Sharifnia E, Hagen M, Ahmad T, Leigland L, Hohimer A, Kroenke C, Back S* (2013) Prenatal cerebral ischemia disrupts MRI-defined cortical microstructure through disturbances in neuronal arborization. *Sci Transl Med* 5(168): 168ra7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004669>

Distribution of GABAergic Neurons and Expression Levels of GABA Transporter 1 in the Rat Neocortex during the Neonatal Period after Perinatal Hypoxic Exposure

L. I. Khozhai^{a, #} and V. A. Otellin^a

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

[#]e-mail: astarta0505@mail.ru

The aim of this work was to study the distribution of GABA-expressing neurons and the level of GABA transporter type 1 (GAT₁) expression in different layers of the rat neocortex in the neonatal period after perinatal hypoxia. Perinatal hypoxic exposure was carried out on neonatal day 2 for 1 h (7.8% O₂ in the breathing gas mixture). GABA and GAT₁ were localized immunohistochemically. The neocortical somatosensory area was studied on postnatal days 5 and 10 (P5, P10). It was found that at the early neonatal stage (P5), perinatal hypoxic exposure leads to an increase in the number of GABAergic inhibitory interneurons in all layers of the neocortex. By the end of the neonatal period (P10), their number in the cortical layers decreases, while in layer V, decreases significantly. In control animals, the GAT₁ expression level gradually increases throughout the neonatal period in all layers of the neocortex. After perinatal hypoxic exposure, GAT₁ expression decreases significantly, including in the neocortical layers, where the number of GABAergic neurons corresponds to the control value. These findings indicate that the exposure to acute perinatal hypoxia can lead to changes in GABAergic synaptic transmission in all layers of the neocortex at the end of the neonatal period.

Key words: neocortex, hypoxia, GABA, GAT₁, neonatal period

СОДЕРЖАНИЕ РЕТИНОЛА И α -ТОКОФЕРОЛА В ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ (*CHIROPTERA*) В ПЕРИОДЫ ГИБЕРНАЦИИ И ЛЕТНЕЙ АКТИВНОСТИ

© 2022 г. Т. Н. Ильина¹, И. В. Баишникова^{1,*}, В. В. Белкин¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: iravbai@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 19.08.2022 г.

В работе впервые исследовалось содержание ретинола и α -токоферола у летучих мышей, обитающих и зимующих в Карелии на северной периферии их ареалов, на разных этапах гибернации и в период летней активности. Характерной особенностью рукокрылых северной зоны является пребывание большую часть года в состоянии гипобиоза. Циклы оцепенения–пробуждения в период зимней спячки связаны с быстрым повышением температуры тела и дыхания, что приводит к увеличению образования активных форм кислорода. Для исследования антиоксидантного статуса у летучих мышей пяти видов определяли содержание ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце методом ВЭЖХ. Объектами исследования послужили ночница Брандта (*Myotis brandtii*), усатая ночница (*Myotis mystacinus*), водяная ночница (*Myotis daubentonii*), бурый ушан (*Plecotus auritus*) и северный кожанок (*Eptesicus nilssonii*). Выявлено, что содержание антиоксидантов было выше у летучих мышей во время гибернации по сравнению с активными животными в летний период. В начале спячки наиболее высокое содержание α -токоферола в печени выявлено у северного кожанка, ретинола – у бурого ушана. Весной высокий уровень ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце был у ночницы Брандта. Обнаружено, что на разных этапах гибернации содержание α -токоферола в скелетной мышце может быть выше, чем в печени. Весной перед окончанием спячки самки демонстрировали более высокий уровень антиоксидантов в тканях по сравнению с самцами. У всех видов летучих мышей наблюдалась значительная вариабельность показателей, которую можно объяснить как видовыми, так и индивидуальными различиями животных, обитающих в природных условиях. Высокий уровень α -токоферола и ретинола в тканях может играть важную роль в стратегии антиоксидантной защиты у рукокрылых северной зоны во время зимней спячки.

Ключевые слова: витамины А и Е, рукокрылые, зимняя спячка, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S0044452922060031

Летучих мышей характеризует сезонность их жизненного цикла, которая включает четкую приуроченность биологических периодов к определенному времени года и связанные с этим изменения различных физиолого-биохимических показателей. Рукокрылые являются единственными млекопитающими, способными к полету, и в активном состоянии отличаются высокой скоростью обмена веществ, однако показатели метаболизма могут варьировать как у разных видов летучих мышей, так и в зависимости от сезонных изменений внешних факторов и физиологического состояния животных. Отсутствие или дефицит пищи в холодное время года являются одной из главных угроз для животных севера, поэтому гибернация служит ключевой стратегией выживания для ряда млекопитающих, обитающих в условиях выраженной годовой сезонности. На территории Карелии руко-

крылые в состоянии гипобиоза проводят большую часть года – семь месяцев и более, в зависимости от условий внешней среды, вида животных и ряда других факторов. У летучих мышей во время гибернации длительные периоды оцепенения перемежаются короткими периодами разогрева, когда температура тела восстанавливается до нормального эутермического уровня. Например, в результате проведенных в лабораторных условиях наблюдений было обнаружено, что во время спячки продолжительность периода оцепенения у северного кожанка составляла в среднем 214.8 ч, длительность активного состояния – 1.2 ч, а максимальная продолжительность оцепенения – 428 ч [1]. Для летучих мышей зимняя спячка является физиологической адаптацией, при которой происходит снижение уровня метаболизма, сопровождающееся понижением температуры тела, замедлением дыха-

ния, частоты сердцебиения и значительным уменьшением потребления кислорода [1–4]. При гибернации генерация активных форм кислорода (АФК) понижена, но она значительно усиливается при периодических пробуждениях и сократительном термогенезе во время разогревания животных, так как вместе с этим повышается уровень окислительного метаболизма. Считается, что основным фактором адаптации, способным защищать клетки от АФК путем снижения уровня их генерации, может быть усиление антиоксидантных механизмов [4–6].

Витамины А (ретинол) и Е (токоферол) играют важную роль в метаболизме животных, характеризуются разносторонними физиологическими эффектами и биохимическим действием и проявляют себя как низкомолекулярные антиоксиданты. Витамин А имеет особое значение в процессе восприятия света, необходим для нормального развития плода, регуляции пролиферации и дифференциации клеток в течение всего жизненного цикла, является значимым компонентом циркадной системы организма, а также влияет на процесс увеличения белой и бурой жировой ткани, имеющих важное значение для благополучной зимовки млекопитающих [7, 8]. Витамин Е в тканях выполняет роль основного биологического антиоксиданта, препятствующего развитию свободнорадикальных процессов перекисного окисления ненасыщенных тканевых липидов (ПОЛ) молекулярным кислородом [5, 9]. Кроме того, токоферол является регулятором энергетического метаболизма, а процесс впадения в спячку и выход из нее у зимоспящих животных рассматриваются как результат влияния токоферола [10].

В литературе имеется мало сведений о содержании витаминов А и Е у рукокрылых. В единичных работах исследовался уровень ретинола и α -токоферола у летучих мышей, обитающих в природных условиях [4, 11, 12], отдельные данные получены на животных, содержащихся в неволе [13]. Особый интерес в этих условиях представляет вопрос об участии в естественной спячке рукокрылых антиоксидантной системы, в частности, ее неферментативного звена, включающего витамины Е и А. Цель настоящей работы состояла в исследовании содержания низкомолекулярных антиоксидантов ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце летучих мышей, обитающих и зимующих в Карелии на северной периферии их ареалов, на разных стадиях гибернации и в период летней активности. Ранее подобные исследования летучих мышей севера европейской части России не проводились.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования послужили представители пяти видов гладконосых летучих мышей (Chiroptera, Vespertilionidae): ночница Брандта

(*Myotis brandtii* Eversmann, 1845) ($n = 18$), усатая ночница (*Myotis Mystacinus* Kuhl, 1817) ($n = 5$), водяная ночница (*Myotis Daubentonii* Kuhl, 1817) ($n = 28$), бурый ушан (*Plecotus auritus*, Linnaeus, 1758) ($n = 9$), северный кожанок (*Eptesicus nilssonii*, Keyserling, Blasius, 1839) ($n = 43$), обитающие в природных условиях в республике Карелия (61–63° с.ш., 30–36° в.д.). Сбор и отлов летучих мышей производили в разные сезоны года: осенью в период подготовки и начала гибернации (конец сентября–ноябрь), зимой в фазу глубокого сна (декабрь–февраль), весной (март, апрель) на позднем этапе спячки, и летом (конец июля–начало августа) в период наибольшей активности животных. Сбор летучих мышей в период гибернации осуществляли на зимовках в подземных укрытиях разного типа. Поиск животных проводили методом сплошного визуального осмотра зимовок, определяли пол и видовую принадлежность. Летний отлов животных проводили паутинными сетями. Встречаемость и относительное обилие [14] летучих мышей зимой определяли в подземных убежищах различного типа, а относительное обилие и относительную численность летом – на ночных автомобильных маршрутах с ультразвуковым детектором Song Meter SM 2 BAT+ (США) с последующей обработкой с использованием программного обеспечения Kaleidoscope Pro. Разрешения для отлова выданы Управлением охотничьего хозяйства Министерства сельского, рыбного и охотничьего хозяйства республики Карелия. Работа выполнена в соответствии с этическими стандартами, утвержденным правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета Института биологии КарНЦ РАН (протокол № 2 от 10 февраля 2021 г.).

Содержание ретинола и α -токоферола определяли в печени и скелетной мышце, взятой из области бедра, методом ВЭЖХ [15]. Образцы тканей (100 мг) гомогенизировали в 0.9 мл 0.25 М раствора сахарозы (рН 7.4) в качестве суспензирующей среды. К гомогенату добавляли 0.025%-ный раствор бутилокситолуола в этиловом спирте и тщательно смешивали для осаждения белков. Приливали 0.0125%-ный раствор бутилокситолуола в н-гексане, смесь встряхивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 3000 \times g в течение 10 мин и выдерживали в течение 40 мин при 4°C. Пробу для хроматографического анализа отбирали из верхнего гексанового слоя. Хроматографическое разделение проводили методом микроколоночной хроматографии, элюентом служила смесь гексана с изопропанолом в соотношении 98.5:1.5. Для проведения анализа использовали колонку с прямой фазой, наполнителем для которой служил силикагель. Детектирование проводили при 292 нм для α -токоферола и 324 нм для ретинола. Нижний предел определения 0.01 мкг/г влажной ткани. При построении калибровочных кривых использовали

Таблица 1. Содержание ретинола в печени и скелетной мышце летучих мышей во время гибернации и летней активности, мкг/г влажной ткани (*M*, min – max)

Вид	Пол	Осень (начало гибернации)		Зима (глубокий сон)		Весна (поздний этап гибернации)		Лето (период активности)	
		печень	скелетная мышца	печень	скелетная мышца	печень	скелетная мышца	печень	скелетная мышца
Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i>)	f	23.45 (2) 18.91–27.98	1.71 (1)	142.58 (3) 11.75–400.84	0.65 (3) 0.20–1.49	204.31 (3) 17.6–552.72	0.21 (2) 0.31–1.11	36.05 (4) 6.22–72.84	0.98 (3) 0.20–2.55
	m	11.22 (2) 0.41–18.34	0.5 (1)	2.54 (1)	0.13 (1)	16.17 (3) 23.0–9.9	1.20 (2) 1.11–1.28	н.и.	н.и.
Усатая ночница (<i>M. mystacinus</i>)	f	34.8 (2) 1.1–68.5	0.45 (2) <–0.9	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	m	< (1)	< (1)	79.32 (1)	н.и.	3.44 (1)	1.38 (1)	н.и.	н.и.
Водяная ночница (<i>M. daubentonii</i>)	f	54.25 (4) 8.17–100.13	1.16 (4) <–2.67	5.12 (1)	0.07 (1)	15.96 (1)	0.09 (1)	12.25 (10) 2.54–26.27	1.75 (17) 0.12–7.79
	m	6.55 (2) 4.7–8.39	0.38 (2) <–0.77	47.03 (1)	0.41 (1)	н.и.	н.и.	3.8 (1)	< (1)
Бурый ушан (<i>Plecotus auritus</i>)	f	102.19 (2) 18.54–185.83	0.14 (2) <–0.28	139.35 (1)	2.84 (1)	55.89 (3) 21.80–116.09	1.17 (4) 0.38–3.03	н.и.	н.и.
	m	н.и.	н.и.	5.90 (1)	н.и.	10.0 (1)	< (1)	н.и.	н.и.
Северный кожанок (<i>Estesicus nilssonii</i>)	f	2.03 (8) 0.26–4.11	0.29 (8) <–1.41	45.82 (6) 1.37–101.60	0.82 (6)	14.37 (13) 0.79–68.88	0.85 (14) <–2.92	н.и.	н.и.
	m	68.70 (4) 1.37–264.3	3.03 (5) 0.16–12.1	9.38 (2) 0.58–18.17	0.21 (2) 0.15–0.27	18.62 (8) <–131.2	0.27 (5) <–1.14	н.и.	н.и.

Здесь и в табл. 2: в скобках количество исследованных особей; <– значения содержания ниже предела обнаружения; н.и. – не исследован.

стандартные растворы ретинола и α -токоферола (“Sigma-Aldrich”, США). Для контроля физиологического состояния в разные сезоны года определяли массу тела летучих мышей. Полученные данные обрабатывали с применением непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Влияние на содержание витаминов таких факторов, как “сезон”, “пол” и “вид” оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA). В связи с большой вариабельностью изучаемых показателей в табл. 1 и 2 кроме среднего приводятся минимальное и максимальное абсолютные значения.

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Осенью в начальный период гибернации содержание ретинола в печени самок северного кожанка было достоверно ниже, чем у самок бурого ушана ($p < 0.05$), ночницы Брандта ($p < 0.05$) и водяной ночницы ($p < 0.05$) (табл. 1). В печени самцов се-

верного кожанка обнаружен высокий уровень ретинола, причем у одной особи отмечено максимальное (264.3 мкг/г) по сравнению с другими видами значение. Зимой в печени самок всех видов, кроме водяной ночницы, уровень ретинола был выше, чем в осенний период. Содержание ретинола в печени самок северного кожанка зимой увеличилось более, чем в 20 раз ($p < 0.05$), в то время как у самцов снизилось в 7 раз по сравнению с осенними показателями. В скелетной мышце летучих мышей содержание ретинола было существенно ниже по сравнению с печенью. У некоторых особей в скелетной мышце ретинол не обнаружен. Весной содержание витамина А в печени самок северного кожанка было выше, чем осенью ($p < 0.05$), но снижалось по сравнению с зимним периодом. У самок ночницы Брандта уровень ретинола весной был выше, чем у самцов этого вида в 12.5 раза. На этом фоне особенно выделялась одна из самок ночницы Брандта, содержание витамина А в печени которой было чрезвычайно высоким и составляло 552.72 мкг/г. В летний период содержание витаминов А и Е смогли определить только у двух видов – ночницы Брандта и водяной ночницы. В результате обнаружено, что уровень ретинола в печени ночницы Брандта летом был ниже, чем зимой и весной во время спячки, но превышал содержание в пече-

Таблица 2. Содержание α -токоферола в печени и скелетной мышце летучих мышей во время гибернации и летней активности, мкг/г влажной ткани (M , min – max)

Вид	Пол	Осень (начало гибернации)		Зима (глубокий сон)		Весна (поздний этап гибернации)		Лето (период активности)	
		печень	скелетная мышца	печень	скелетная мышца	печень	скелетная мышца	печень	скелетная мышца
Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i>)	f	7.34 (2) 4.02–10.65	20.61 (1)	6.24 (3) 4.26–9.64	7.66 (3) 7.02–8.01	9.47 (3) 3.20–15.39	6.41 (2) 4.58–8.24	1.66 (4) 0.90–2.51	1.67 (3) 1.27–2.21
	m	3.16 (2) 2.19–4.13	13.65 (1)	1.46 (1)	1.45 (1)	6.59 (3) 5.75–8.0	12.92 (2) 11.45–14.35	н.и.	н.и.
Усатая ночница (<i>M. mystacinus</i>)	f	18.74 (2) 14.49–23.0	9.97 (2) 9.5–10.45	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	m	1.5 (1)		16.25 (1)		1.35 (1)	2.02 (1)		
Водяная ночница (<i>M. daubentonii</i>)	f	4.26 (4) 2.77–6.18	16.70 (4) 4.61–43.14	0.93 (1)	2.19 (1)	0.81 (1)	2.99 (1)	2.17 (10) 0.97–3.32	1.69 (18) 0.73–3.06
	m	5.88 (2) 5.6–6.16	8.10 (2) 6.0–10.19	11.29 (1)	22.30 (1)	н.и.	н.и.	3.6 (1)	1.5 (1)
Бурый ушан (<i>Plecotus auritus</i>)	f	6.4 (2) 5.75–7.05	45.99 (2) 8.07–83.92	23.27 (1)	22.32 (1)	7.92 (3) 11.14–1.50	5.84 (4) 1.39–9.76	н.и.	н.и.
	m	н.и.	н.и.	0.95 (1)	н.и.	4.05 (1)	2.5 (1)	н.и.	н.и.
Северный кожанок (<i>Estesicus nilssonii</i>)	f	54.62 (8) 1.09–407.53	4.15 (8) 0.76–11.24	6.20 (6) 3.05–12.59	7.70 (6) 0.72–18.09	6.65 (13) 0–26.97	6.33 (14) 0.91–18.52	н.и.	н.и.
	m	6.63 (4) 0.81–14.49	3.58 (5) 1.01–9.88	1.07 (2) 0.75–1.39	3.38 (2) 1.10–5.65	5.09 (8) 1.17–13.63	3.00 (5) 1.07–8.62	н.и.	н.и.

ни водяной ночницы в 3 раза. Исследования уровня ретинола в мышцах двух видов ночниц в летний период показали более высокие значения, чем во время гибернации.

Наиболее значительные запасы α -токоферола осенью в начале гибернации обнаружены в печени северного кожанка (табл. 2). Анализ индивидуальных данных показывает, что не все особи накапливают к зиме значительные запасы витамина Е – минимальные значения выявлены как у самок, так и у самцов этого вида. В скелетной мышце наиболее высокое содержание α -токоферола выявлено у бурого ушана. В зимний период гибернации основной тенденцией было снижение α -токоферола по сравнению с осенними показателями, хотя у отдельных особей значения превышали предыдущие значения. Весной как в печени, так и в скелетной мышце выявлен довольно значительный уровень α -токоферола, при этом самки имели в печени большие запасы витамина Е по сравнению с самцами. Влияние пола на содержание α -токоферола в печени установлено у ночницы Брандта ($F = 4.76$; $df = 1$; $p = 0.048$; $\eta^2 = 16.91$) и водяной ночницы ($F = 9.23$; $df = 1$; $p = 0.008$; $\eta^2 = 23.09$). Содержание α -токоферола в печени исследованных летом самок ночницы Брандта было значительно ниже ($p = 0.05$), чем в зимний период. У самок водяной ночницы летом выявлены различия по сравнению

с осенними значениями α -токоферола как в печени, так и в скелетной мышце ($p < 0.05$). Многофакторный анализ выявил влияние сезона года на уровень токоферола в печени ($F = 4.88$; $df = 3$; $p = 0.017$; $\eta^2 = 51.98$) и скелетной мышце ($F = 7.06$; $df = 3$; $p = 0.012$; $\eta^2 = 67.04$) ночницы Брандта, а также в скелетной мышце водяной ночницы ($F = 3.41$; $df = 3$; $p = 0.034$; $\eta^2 = 25.76$).

Исследования динамики массы тела летучих мышей тела показали, что у всех видов максимальный вес наблюдался осенью в начальный период гибернации (рис. 1). Масса тела животных является видовым признаком, поэтому вес летучих мышей разных видов имел существенные различия. За время зимней спячки отмечалось достоверное снижение массы тела у самцов северного кожанка ($p < 0.05$). Кроме того, выявлено влияние пола на массу тела северного кожанка ($F = 7.68$; $df = 1$; $p = 0.009$; $\eta^2 = 15.37$), самки которого были тяжелее самцов. Масса тела существенно зависела от сезона года у бурого ушана ($F = 11.35$; $df = 2$; $p = 0.022$; $\eta^2 = 47.87$) и водяной ночницы ($F = 7.74$; $df = 3$; $p = 0.002$; $\eta^2 = 58.10$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование летучих мышей, обитающих в природных условиях, выявило значительную вари-

абельность содержания ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце, что обусловлено физиологическим состоянием животных, которое зависит от уровня питания, времени перехода в состояние гибернации, возраста животных, участия в спаривании, наличия эктопаразитов и др. О содержании ретинола и токоферола в тканях летучих мышей, обитающих в природных условиях, известно немного. При исследовании плодоядных и всеядных видов летучих мышей субэкваториальной зоны выявлена очень низкая концентрация ретинола в крови, причем у некоторых видов каротиноиды и ретинол не обнаружены. В то же время уровень α -токоферола в печени и почках этих видов был выше, чем у крыс и мышей, и показал обратную связь с уровнем ПОЛ. Дефицит витамина Е не был зафиксирован у насекомоядных видов летучих мышей, обитающих в дикой природе, в отличие от живущих в неволе [4, 12, 16].

Проведенные нами исследования показали, что уровни ретинола и токоферола в печени разных видов летучих мышей северной зоны имели различия, однако закономерностью является более высокий уровень витаминов А и Е во время зимней спячки по сравнению с периодом летней активности. Содержание ретинола и α -токоферола в печени гибернирующих летучих мышей сохранялось на высоком уровне или даже увеличивалось весной перед окончанием спячки. Вероятно, такое увеличение связано с интенсивной мобилизацией из жировых депо в этот период. Так, содержание ретинола и α -токоферола в печени самок и самцов ночницы Брандта весной было выше, чем осенью в начале гибернации, причем высокие значения отмечались и у особей других видов. Это свидетельствует о большой пластичности организма рукокрылых относительно потребностей в микронутриентах для успешной зимней спячки. У зимоспящих все процессы связаны с обменом липидов, от которого зависит содержание в тканях витаминов А и Е, липофильных по своей природе соединений. Обнаружено, что уровень вырабатываемого адипоцитами гормона адипонектина, секреция которого обратно пропорционально запасам липидов и стимулирует окисление жирных кислот, в начале периода накопления жира низкий и увеличен во время спячки [17]. Тринадцатиполосные суслики (*Ictidomys tridecemlineatus*) в период зимней спячки имели более высокий уровень витамина А в печени по сравнению с весной и летом. Полагают, что поддержание высокого уровня ретинола в печени может отражать повышенную потребность в витамине А во время гипотермии [8]. При исследовании европейских видов летучих мышей к концу зимней спячки отмечено увеличение содержания каротиноидов [11]. Печень у летучих мышей, как и у большинства млекопитающих, является основным местом хранения и метаболизма витамина А, где гидролиз ретиниловых эфиров приводит к об-

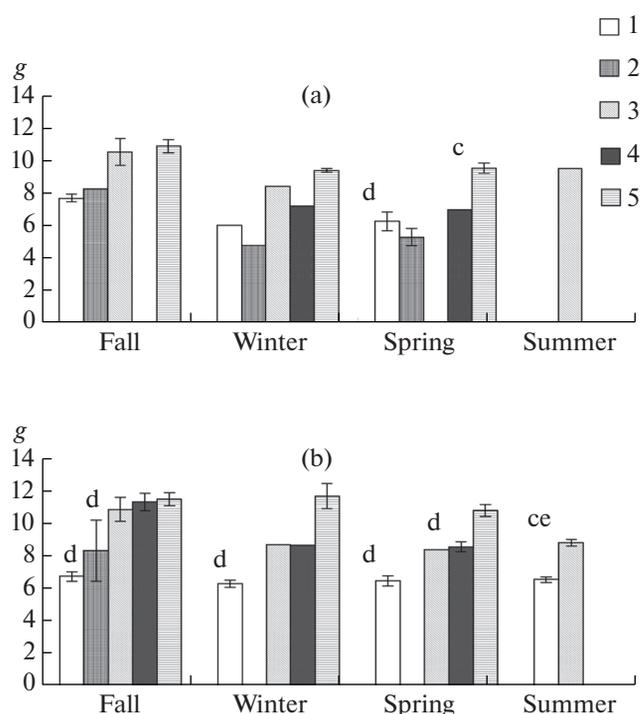


Рис. 1. Масса тела летучих мышей в разные сезоны года. Обозначения: а – самцы; б – самки; по оси абсцисс – время года; 1 – ночница Брандта; 2 – усатая ночница; 3 – водяная ночница; 4 – бурый ушан; 5 – северный кожанок; с – различия достоверны по сравнению с осенью (начало гибернации) при $p < 0.05$; d – различия достоверны по сравнению с северным кожанком; e – различия достоверны по сравнению с ночницей Брандта.

разованию ретинола, который связывается затем с ретинолсвязывающим белком. Во время зимней спячки биосинтез белка, а также экспрессия генов, кодирующих транспортные белки ретинола, в печени значительно увеличены. Считается, что модуляция экспрессии генов во время зимней спячки представляет собой молекулярный механизм адаптации к экстремальным условиям [18]. Кроме того, у зимоспящих устойчивость к холоду печени обеспечивается за счет удержания гепатоцитами большого количества α -токоферола для предотвращения перекисного окисления липидов [19]. Установлено, что процесс впадения в спячку и выход из нее у зимоспящих млекопитающих рассматриваются как результат влияния витамина Е. У адаптированных к холоду животных депо витамина Е является жировая ткань и осеннее ожирение сочетается также с увеличением токоферола, являющегося ингибитором обменных процессов [10]. Очевидно, что продолжительная спячка рукокрылых требует наличия механизма резервирования и экономии всех веществ, необходимых для поддержания организма в хорошем физическом состоянии.

В организме наиболее высокий уровень витаминов А и Е обнаруживается в печени, откуда они пе-

реносятся в другие органы и ткани. Уровень ретинола и токоферола в скелетной мышце обычно значительно ниже, чем в печени, но данная ткань также является местом хранения необходимых организму микронутриентов. Кроме того, при адаптации к холоду печень и скелетная мышца участвуют в энергетическом метаболизме. Во время зимней спячки летучие мыши проходят повторяющиеся циклы оцепенения-возбуждения с чередованием состояний гипотермии и нормотермии. Генерация АФК, пониженная при гибернации, значительно усиливается при периодических пробуждениях, которые сопровождаются окислительным стрессом, ассоциированным с резким повышением потребления кислорода, необходимого для поддержания бурой жировой ткани и скелетными мышцами термогенеза. В скелетной мышце и в печени у гибернирующих арктических сусликов и черных медведей обнаружено снижение транскрипции генов, ответственных за ключевые окислительно-восстановительные процессы [18, 20], что является энергосберегающей адаптацией во время спячки. Целый ряд физиологических механизмов, имеющихся у зимоспящих млекопитающих, вносит вклад в окислительную способность скелетной мышцы, включая высокий уровень антиоксидантов. При дефиците витамина Е происходит активация ПОЛ и накопление продуктов этого процесса в скелетной мышце, поэтому токоферол играет важную роль в поддержании функционального состояния ткани во время гипобриоза [6, 21, 22]. Так, у самок северного кожанка уровень α -токоферола и ретинола в мышце зимой и весной был выше, чем осенью, а у самцов северного кожанка и ночницы Брандта содержание α -токоферола практически не отличалось от полученных осенью результатов. Весной у летучих мышей высокий уровень α -токоферола обнаружен как в печени, так и в скелетной мышце, в то время как летом содержание снижалось по сравнению с периодом гибернации. В скелетной мышце самок ночницы Брандта летом содержание α -токоферола было ниже, чем осенью и зимой в 12 и 4.6 раза соответственно. Схожая динамика наблюдалась у водяной ночницы, у которой содержание α -токоферола в мышце летом было меньше почти в 10 раз по сравнению с осенью. В то же время уровень ретинола в скелетной мышце летом увеличивался по сравнению с весенним периодом гибернации у самок ночницы Брандта и водяной ночницы. Содержание ретинола и α -токоферола в тканях летучих мышей весной было сопоставимо, а в ряде случаев даже превышало значения, обнаруженные осенью, что может свидетельствовать об изменении в конце зимней спячки ее стратегии, направленной на мобилизацию ресурсов. В конце спячки в скелетной мышце также усиливается синтез белка в отличие от процессов в печени, где существенных изменений не отмечено [23]. Считается, что печень может служить субстра-

том для восстановления мышц у зимоспящих [24]. Дисбаланс между образованием АФК и уровнями антиоксидантов может привести к окислительному стрессу, поэтому, вероятно, у зимоспящих антиоксидантная способность активизируется не в начале, а в конце пробуждения от оцепенения [9]. У сусликов во время спячки антиоксидантная мощность икроножной мышцы была на 156% выше по сравнению с летними особями в период их наибольшей активности [25]. Можно предположить наличие у рукокрылых общих с другими зимоспящими млекопитающими механизмов регуляции процессов метаболизма в период гибернации.

Содержание в органах и тканях витаминов А и Е определяется поступлением с пищей, которое прекращается в холодное время года, когда происходит переключение с углеводного и белкового обмена на липидный. При температурной адаптации липиды играют важную роль в регуляции метаболизма, так как у находящихся в спячке животных обменные процессы в значительной степени зависят от температуры среды [10, 16, 26]. Спячка рукокрылых в Карелии в основном проходит при отрицательной температуре воздуха, которая в феврале в отдельных зимних укрытиях может кратковременно опускаться до -8.9°C . В то же время понижение температуры воздуха на 10° приводит к снижению обмена примерно в 2–2.5 раза [27]. Печень и скелетная мышца, на долю каждой из которых приходится примерно по трети всего запаса жира, потребляют для своего функционирования при гипотермии наибольшее количество свободных жирных кислот. Во время спячки в митохондриях печени и скелетных мышц подавляется дыхание и выработка АФК снижается [19, 28], в то время как в тканях сердца и мозга подавления метаболизма не происходит [21]. Снижение окислительных процессов уменьшает расход эндогенных запасов ретинола и токоферола у летучих мышей во время гибернации. Высокое содержание глутатиона и активность антиоксидантных ферментов в крови находящихся в состоянии гипотермии летучих мышей по сравнению с активными указывает на то, что повышение уровня антиоксидантов может модулироваться для минимизации окислительного стресса у рукокрылых [4]. Во время гибернации уровень α -токоферола в плазме крови сирийских хомяков увеличивался в 3.5 раза, так как существует баланс между высвобождением токоферола вместе с липопротеинами из печени в кровь и поглощением клетками и тканями посредством эндоцитоза. При пробуждениях во время спячки α -токоферол защищает полиненасыщенные жирные кислоты или липиды клеточных мембран против ПОЛ [9]. Обнаружено, что уровень антиоксидантов увеличивается во время гибернации и истощается при периодических пробуждениях, которые необходимы для мобилизации метаболитов и восстановления системного гомеостаза [29].

Во время спячки снижение массы тела у рукокрылых происходит за счет жира, и чем чаще летучая мышь за зиму просыпается, тем меньше становятся его запасы, поэтому сохранение энергетических резервов может дать репродуктивное преимущество [30]. Наши наблюдения показали, что среди животных с характерными признаками пробуждения (“в росе”) преобладали водяная и усатая ночницы. У северного кожанка общая продолжительность спячки и периодов оцепенения в лабораторных условиях больше, чем у других видов, а длительность активного состояния, требующего больших энергетических затрат, меньше [1]. У летучих мышей во время спячки вес самцов снижается интенсивнее, чем у самок, медленнее расходующих свои жировые запасы зимой [30–32].

Витамины А и Е необходимы для нормального функционирования репродуктивной системы самок и самцов, поэтому обеспеченность витамином является существенным условием не только для перенесения летучими мышами зимней спячки, но и их благополучного размножения. Различия в содержании ретинола и токоферола у самок и самцов могут быть связаны с более медленным расходом самками имеющихся резервов. Это связано с разными периодами репродуктивной активности, которая у самцов происходит летом или в начале осени. У самцов сперматогенный процесс проявляется только в благоприятное время года, когда животные активны и имеется достаточно корма. Самки, которые спариваются как весной, так и осенью перед спячкой, могут иметь очень длинный латентный период беременности [32]. Вероятно, это обуславливает более высокое содержание ретинола и токоферола в тканях самок по сравнению с самцами. Ранее подобная закономерность отмечалась у других видов европейских рукокрылых [11], в то же время при исследовании концентрации ретинола и токоферола в крови летучих мышей субэкваториальной зоны различий между полами не обнаружено [12]. Функция половых желез имеет наибольшее значение для формирования сезонных состояний организма, поэтому существует взаимосвязь между состоянием системы размножения летучих мышей и временем выхода из зимней спячки [33]. Наблюдения показывают, что северный кожанок после спячки вылетает из зимних убежищ раньше, чем другие виды. Хотя на зимовках в Карелии зарегистрировано пять видов рукокрылых, северный кожанок занимает доминирующее положение, что тесно связано с экофизиологической адаптацией данного вида к условиям севера.

В период активности летучие мыши обладают очень высоким уровнем потребления кислорода. Чем больше подвижность и выше уровень метаболизма, тем быстрее идут реакции окисления и накопления продуктов распада в тканях. В период летней активности, когда потребление энергии усиливается, уровень ретинола и токоферола у

ночницы Брандта и водяной ночницы был ниже, чем в период гибернации. К завершению этой фазы скорость метаболизма снижается, что приводит к значительному увеличению отложения липидов и повышению уровня витаминов А и Е в тканях. Однако большую часть года на территории Карелии рукокрылые проводят в состоянии гипобиоза, что позволяет экономить энергию и ресурсы организма в холодное время года. Так, у северного кожанка потребление кислорода во время спячки снижается в 25 раз [33]. С понижением обмена ряд исследователей связывают более медленное старение и высокую продолжительность жизни летучих мышей по сравнению с другими видами животных подобного размера [2–4]. Считается, что одной из главных причин долголетия рукокрылых является высокая устойчивость к окислительному повреждению по сравнению с короткоживущими видами. Летучие мыши способны ослаблять окислительное повреждение, производя низкие уровни АФК, что определяет базальные эндогенные уровни антиоксидантов и продолжительность жизни. Кроме того, при адаптации к холоду выявляется динамическое равновесие между потреблением кислорода и образованием АФК [2, 4, 26, 34]. В то же время исключительно высокая продолжительность жизни отмечается только у самцов летучих мышей [3, 35]. Высокий уровень антиоксидантов у самок может зависеть от ряда причин, и одной из основных являются значительные затраты на репродукцию [32].

Сезонные изменения содержания витаминов А и Е в тканях летучих мышей являются отражением их видоспецифических черт. Виды, продвинувшиеся на север дальше других, являются и самыми устойчивыми к холоду. Существует положительная корреляция между температурной устойчивостью вида и температурой среды обитания [36, 37]. Такие арктические виды, как белый медведь и песец, не только накапливают к зиме большие запасы жира, но также обладают чрезвычайно высокой способностью к накоплению ретинола и токоферола [38, 39]. Способность к гибернации и накопление перед этим жировых запасов – одни из существенных отличий летучих мышей северных широт от видов тропического и экваториального поясов планеты, которых относят к “примитивным” формам с несовершенной терморегуляцией [40]. В подзонах средней и северной тайги Карелии, в отличие от более южных частей лесной зоны, как на зимовках, так и в период летней активности преобладает северный кожанок [41]. В нашем исследовании самки и самцы этого вида к концу зимней спячки имели нормальную массу тела, а также значительный уровень ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце. В то же время у особей других видов, переживших продолжительный холодный период, выявлены запасы витаминов А

и Е, и наиболее высокое их содержание весной обнаружено у ночницы Брандта.

Таким образом, содержание ретинола и α -токоферола в печени и скелетной мышце у пяти видов летучих мышей европейского Севера имеет определенные различия, однако общим для них является значительный уровень витаминов А и Е в тканях во время гибернации, который обеспечивает антиоксидантную защиту тканей для минимизации окислительного стресса, связанного с переходом летучих мышей в активное состояние. Во время летней активности уровень антиоксидантов ниже, чем во время зимней спячки. Содержание ретинола и α -токоферола в тканях летучих мышей в значительной степени является результатом экофизиологической адаптации определенного вида к обитанию в условиях севера. Способность рукокрылых накапливать резервы и поддерживать необходимый их уровень в период продолжительной гибернации можно рассматривать как наследственно закрепленную реакцию, сформированную в процессе эволюции для выживания в условиях низких температур и отсутствия пищи. Значительное снижение метаболизма в период гибернации позволяет сокращать затраты эндогенных ресурсов организма и является основным фактором выживания летучих мышей во время зимовки, положительный исход которой обеспечивается благодаря действию общих и специфических эколого-физиологических механизмов зимней спячки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.А. Хижкину, д.б.н. В.А. Илюхе и к.б.н. А.Н. Ляпунову за помощь в проведении полевых работ, а также Э.Ф. Печориной и к.б.н. С.Н. Калининой за техническую помощь в летнем исследовании.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания — тема № FMEN-2022-0003.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Учет и отлов животных, камеральная обработка, редактирование манускрипта — В.В.Б.; получение и обработка данных, редактирование манускрипта — И.В.Б., написание и редактирование манускрипта — Т.Н.И.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ануфриев АИ, Ревин ЮВ* (2006) Биоэнергетика зимней спячки летучих мышей (Chiroptera, Vespertilionidae) в Якутии. *Plecotus et al* 9: 8–17. [*Anufriev AI, Revin YuV* (2006) Bioenergetics of hibernation of bats (Chiroptera, Vespertilionidae) in Yakutia. *Plecotus et al* 9: 8–17. (In Russ)].
2. *Brunet-Rossinni AK, Austad SN* (2004) Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology* 5: 211–222. <https://doi.org/10.1023/B:BGEN.0000038022.65024.d8>
3. *Podlutzky AJ, Khritankov, AM, Ovodov ND, Austad SN* (2005) A New Field Record for Bat Longevity. *J Gerontol: Biol. Sci* 60A 11: 1366–1368. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1366>
4. *Filho DW, Althoff SL, Dafre AL Boveris A* (2007) Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp Biochem Physiol C* 146: 214–220. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2006.11.015>
5. *Меньшикова ЕБ, Ланкин ВЗ, Зенков НК, Бондарь ИА, Круговых НФ, Труфакин ВА* (2006) Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М. Фирма “Слово”. [*Menshchikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, Bondar IA, Krugovykh NF, Trufakin VA* (2006) Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants. M. Firm “Slovo”. (In Russ)].
6. *Allan ME, Storey KB* (2012) Expression of NF- κ B and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Cell Biochem Funct* 30: 166–174. <https://doi.org/10.1002/cbf.1832>
7. *Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A* (2001) Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR γ 2 expression. *Obes Res* 9: 500–509. <https://doi.org/10.1038/oby.2001.65>
8. *Sprenger RJ, Tanumihardjo SA, Kurtz CC* (2018) Developing a Model of Vitamin A Deficiency in a Hibernating Mammal, the 13-Lined Ground Squirrel (*Ictidomys tridecemlineatus*). *Compar Med* 3: 196–203. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-17-000113>
9. *Okamoto I, Kayano T, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M* (2006) Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comp Biochem Physiol C* 144: 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.003>
10. *Калабухов НИ* (1985) Спячка млекопитающих. М. Наука. [*Kalabukhov NI* (1985) Hibernation of mammals. M. Nauka. (In Russ)].
11. *Czeczuga B, Ruprecht AL* (1982) Carotenoid Contents in Mammals. II. Carotenoids of Some Vespertilionidae from the Seasonal Variation Aspect. *Acta Theriologica* 6: 83–96.
12. *Müller K, Voigt CC, Raila J, Hurtienne A, Vater M, Brunberg L, Schweigert FJ* (2007) Concentration of carotenoids, retinol and α -tocopherol in plasma of six microchiroptera species. *Comp Biochem Physiol B* 147: 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.03.002>
13. *Dierenfeld ES, Seyjagat J* (2000) Plasma fat-soluble vitamin and mineral concentrations in relation to diet in captive Pteropodid bats. *J Zoo Wildl Med* 3: 315–321.

- [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0315:PFSVAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0315:PFSVAM]2.0.CO;2)
14. Стрелков ПП, Ильин ВЮ (1990) Рукокрылые (Chiroptera, Vespertilionidae) юга Среднего и Нижнего Поволжья. Фауна, систематика и эволюция млекопитающих. Рукокрылые, грызуны. Тр Зоол инст Л. 225: 42–167. [Strelkov PP, Ilyin VU (1990) Bats (Chiroptera, Vespertilionidae) of the south of the Middle and Lower Volga region. Fauna, systematics and evolution of mammals. Bats, rodents. Proc Zool Inst L. 225: 42–167. (In Russ)].
 15. Скурихин ВН, Двинская ЛМ 1989 Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. С-х биол (4): 127–129. [Skurikhin VN, Dvinskaya LM 1989 Determination of α -tocopherol and retinol in the blood plasma of farm animals by micro-column high-performance liquid chromatography. Agricult Biol (4):127–129. (In Russ)].
 16. Lilley TM, Stauffer J, Kanerva M, Eeva T (2014) Interspecific variation in redox status regulation and immune defence in five bat species: the role of ectoparasites. *Oecologia* 175: 811–823. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2959-x>
 17. Anegawa D, Sugiura Y, Matsuoka Y, Sone M, Shichiri M, Otsuka R, Ishida N, Yamada KI, Suematsu M, Miura M, Yamaguchi Y (2021) Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived α -tocopherol. *Commun Biol*. 4 (1): 796. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02297-6>
 18. Fedorov VB, Goropashnaya AV, Stewart NC, Tøien Ø, Chang C, Wang H, Yan J, Showe LC, Showe MK, Barnes BM (2014) Comparative functional genomics of adaptation to muscular disuse in hibernating mammals. *Mol Ecol* 23 (22): 5524–5537. <https://doi.org/10.1111/mec.12963>
 19. Giroud S, Hahold C, Nespolo RF, Mejías C, Terrien J, Logan SM, Henning RH, Storey KB (2021) The Torpid State: Recent Advances in Metabolic Adaptations and Protective Mechanisms. *Front Physiol* 11: 623665. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.623665>
 20. Fuster G, Busquets S, Almendro V, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2007) Antiproteolytic effects of plasma from hibernating bears: a new approach for muscle wasting therapy? *Clin Nutr* 26: 658–661. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.07.003>
 21. Gallagher K, Staples JF (2013) Metabolism of Brain Cortex and Cardiac Muscle Mitochondria in Hibernating 13-Lined Ground Squirrels *Ictidomys tridecemlineatus*. *Physiol Biochem Zool* 86 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1086/668853>
 22. Jiang S, Gao Y, Zhang Y, Liu K, Wang H, Goswami N (2013) The research on the formation mechanism of extraordinary oxidative capacity of skeletal muscle in hibernating ground squirrels (*Spermophilus dauricus*). *J Exp Biol* 216 (Pt 14): 2587–2594. <https://doi.org/10.1242/jeb.080663>
 23. Hindle AG, Otis JP, Epperson LE, Hansberger TA, Goodman CA, Carey HV, Martin SL (2015) Prioritization of skeletal muscle growth for emergence from hibernation. *J Exp Biol* 218: 276–284. <https://doi.org/10.1242/jeb.109512>
 24. Regan MD, Chiang E, Liu Y, Tonelli M, Verdoorn KM, Gugel SR, Suen G, Carey HV Assadi-Porter FM (2022) Nitrogen recycling via gut symbionts increases in ground squirrels over the hibernation season. *Science* 6579: 460–463. <https://doi.org/10.1126/science.abh2950>
 25. James RS, Staples JF, Brown JCL, Tessier ST, Storey KB (2013) The effects of hibernation on the contractile and biochemical properties of skeletal muscles in the thirteen-lined ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus*. *J Exp Biol* 216: 2587–2594. <https://doi.org/10.1242/jeb.080663>
 26. Seim I, Fang X, Xiong Z, Lobanov AV, Huang Z, et al. (2013) Genome analysis reveals insights into physiology and longevity of the Brandt's bat *Myotis brandtii*. *Nat Commun* 1:2221. <https://doi.org/10.1038/ncomms3212>
 27. Колومیцева ИК (2011) Липиды в гибернации и искусственном гипобиозе млекопитающих. *Биохимия* 12: 1604–1614. [Kolomyitseva IK (2011) Lipids in hibernation and artificial mammalian hypobiosis. *Biochemistry* 12: 1604–1614. (In Russ)].
 28. Brown JCL, Chung DJ, Cooper AN, Staples JF (2013) Regulation of succinate-fuelled mitochondrial respiration in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. *J Exp Biol* 216 (Pt 9): 1736–1743. <https://doi.org/10.1242/jeb.078519>
 29. Epperson LE, Karimpour-Fard A, Hunter LE, Martin SL (2011) Metabolic cycles in a circannual hibernator. *Physiol Genomics* 13: 799–807. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00028.2011>
 30. Голенко АС, Дзеве́рин ИИ (2007) Изменение массы тела и двигательная активность поздних кожанов (*Eptesicus serotinus*) в период спячки в лабораторных условиях. *Plecotus et al* 10: 14–20. [Golenko AS, Dzeverin II (2007) Body weight change and motor activity of late leather bat (*Eptesicus serotinus*) during hibernation in laboratory conditions. *Plecotus et al* 10: 14–20. (In Russ)].
 31. Speakman JR, Rowland A (1999) Preparing for inactivity: how insectivorous bats deposit a fat store for hibernation. *Proc Nutr Soc* 58: 123–131. <https://doi.org/10.1079/pns19990017>
 32. Czenze Z, Jonasson K, Willis CKR (2017) Thrifty Females, Frisky Males: Winter Energetics of Hibernating Bats from a Cold Climate. *Physiol Biochem Zool* 4: 502–511. <https://doi.org/10.1086/692623>
 33. Ануфриев АИ (2008) Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии. Новосибирск. Изд-во СО РАН. [Anufriev AI (2008) Mechanisms of hibernation of small mammals of Yakutia. Novosibirsk. Publ SB RAS. (In Russ)].
 34. Орлов ОД, Каминская ЛА, Мещанинов ВН (2012) Почему летучие мыши долго живут: предварительный анализ гипотез высокой продолжительности жизни рукокрылых. *Научный диалог* 2: 147–151. [Orlov OD, Kamenskaya LA, Meshchaninov VN (2012) Why bats live long: preliminary analysis of hypotheses of high life expectancy of bats. *Scientific Dialogue* 2: 147–151. (In Russ)].

35. *Khritankov AM, Ovodov ND* (2001) Longevity of Brandt's bats (*Myotis brandtii* Eversmann) in central Siberia. *Plecotus et al* 4: 20–24.
36. *Шмидт-Нюельсен К* (1982) Физиология животных. Приспособление и среда. М. Мир. [*Schmidt-Nielsen K* (1982) Animal physiology. Adaptation and environment. M. Mir. (In Russ)].
37. *Boyles JG, Dunbar MB, Storm JJ, Brack V Jr* (2007) Energy availability influences microclimate selection of hibernating bats. *J Exp Biol* 210: 4345–4350. <https://doi.org/10.1242/jeb.007294>
38. *Blanera WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EMC, Piantadosi R, Libien J* (2009) Hepatic stellate cell lipid droplets: A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 1791: 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.bbailp.2008.11.001>
39. *Baishnikova I, Ilyina T, Ilyukha V, Tirronen K* (2021) Species- and age-dependent distribution of retinol and α -tocopherol in the Canidae family during the cold season. *Biol Communicat* 3: 225–235. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2021.304>
40. *Кольтовер ВК* (2009) Теория надежности и старение: схоластическая реализация генетической программы. Проблемы старения и долголетия 1: 26–31. [*Coltover VK* (2009) Reliability theory and aging: scholastic implementation of the genetic program. Problems of aging and longevity 1: 26–31. (In Russ)].
41. *Belkin VV, Fyodorov FV, Ilyukha VA, Yakimova AE* (2021) Characteristics of the bat (*Chiroptera*) population in protected areas in the northern and middle taiga subzones of European Russia. *Nature Conservat Res* 1: 17–31. <https://doi.org/10.24189/ncr.2021.002>

Retinol and α -Tocopherol Content in the Liver and Skeletal Muscle of Bats (*Chiroptera*) during Hibernation and Summer Activity

T. N. Ilyina^a, I. V. Baishnikova^{a,#}, and V. V. Belkin^a

^a Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

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

In this work, the content of retinol and α -tocopherol in bats living and wintering in Karelia at the northern periphery of their natural habitats, was studied for the first time at different stages of hibernation and during summer activity. A characteristic feature of chiropterans of the northern area is staying most of the year in a state of hypobiosis. Torpor–arousal cycles during hibernation are associated with a rapid increase in body temperature and respiration, which leads to an increase in the production of reactive oxygen species. To study the antioxidant status in five bat species (*Myotis brandtii*, *Myotis mystacinus*, *Myotis daubentonii*, *Plecotus auritus* and *Eptesicus nilssonii*), retinol and α -tocopherol levels were determined by HPLC in their liver and skeletal muscle. It was found that the antioxidant content was higher in torpid bats during hibernation compared to active animals in the summer period. At the beginning of hibernation, a highest α -tocopherol level in the liver was found in *Eptesicus nilssonii*, while the retinol level was the highest in *Plecotus auritus*. Retinol and α -tocopherol levels in the liver and skeletal muscle of *Myotis brandtii* in spring were higher compared to other species. At different stages of hibernation, α -tocopherol levels in the skeletal muscle can be higher than in the liver. In spring, before exiting from hibernation, females demonstrated a higher antioxidant level in tissues compared to males. In all bat species, there was a significant variability in indices, which can be explained by both species-specific and individual differences among animals living in natural conditions. High tocopherol and retinol levels in tissues may play an important role in the strategy of antioxidant defense in bats of the northern area during hibernation.

Keywords: vitamins A and E, bat, hibernation, antioxidant

РОЛЬ P2Y-РЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ АТРОФИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В *M. SOLEUS* ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ

© 2022 г. К. А. Зарипова¹, С. П. Белова¹, Б. С. Шенкман¹, Т. Л. Немировская^{1,*}

¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*e-mail: Nemirovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 18.08.2022 г.

Принята к публикации 29.08.2022 г.

Атрофия скелетных мышц при их функциональной разгрузке обусловлена снижением белкового синтеза и резким увеличением его распада. Накопление АТФ в мышце при разгрузке, обнаруженное на ранних сроках, может быть одним из стимулов, запускающих этот процесс. Показано, что паннексиновые каналы пропускают АТФ при разгрузке мышц из цитоплазмы во внеклеточное пространство. Внеклеточный АТФ может восприниматься P2Y2-рецепторами. Для проверки гипотезы об участии P2Y2-рецепторов в регуляции сигнальных процессов в скелетных мышцах на ранних этапах функциональной разгрузки был применен селективный ингибитор P2Y2-рецепторов AR-C 18925XX. Ингибирование P2Y2-рецепторов AR-C 18925XX при 3-дневной функциональной разгрузке крыс снижает атрофию *m. soleus*, предотвращает накопление АТФ в *m. soleus*, замедляет экспрессию мРНК E3-лигазы MAFbx, убиквитина и рецепторов IL6, способствует повышению уровня фосфорилирования AMPK, а также увеличивает интенсивность белкового синтеза.

Ключевые слова: *m. soleus*, атрофия, E3-лигазы MuRF1 и MAFbx, убиквитин, интенсивность синтеза белка, P2Y2-рецепторы

DOI: 10.31857/S0044452922060134

Скелетная мышца чрезвычайно пластична. Снижение сократительной активности, или ее полное прекращение приводит к снижению массы мышц, площади поперечного сечения мышечных волокон, снижению максимальной силы и скорости мышечного сокращения, а также работоспособности [1–3]. Атрофия обусловлена снижением белкового синтеза и резким увеличением белкового распада [4]. Беловой и соавт. показано, что даже трехнедельное нахождение крыс в клетках ограниченного размера вызывает атрофию скелетных мышц, изменения клеточных сигнальных путей и ускоренный набор массы тела животных [5]. Атрофия скелетных мышц при функциональной разгрузке развивается очень быстро, и масса мышцы снижается уже после 3 дней воздействия [6]. В то же время ранние этапы развития атрофии менее изучены. Негативные изменения в маркерах сигнальных путей мышц начинают проявляться уже через несколько часов функциональной разгрузки. Например, экспрессия основных мышечных E3-лигаз, участвующих в процессе деградации белка (MuRF1, MAFbx), достоверно повышается через 24 ч разгрузки мышц и достигает пика к 3-м суткам [7]. Поэтому мы исследовали триггерные механизмы, запускающие белковую деградацию, при 3-суточном воздействии функциональ-

ной разгрузки на мышцу. Мы предположили, что одним из таких механизмов может быть накопление АТФ в мышце при разгрузке, обнаруженное ранее нами и другими авторами [6, 8, 9]. Стимул, активирующий работу АТФ-зависимых путей регуляции сигналинга скелетных мышц при их разгрузке, может быть следующий. Функциональная разгрузка мышц ведет к снижению электрической мышечной активности, открытию дигидропиридиновых (DHPR) Ca-зависимых каналов L-типа, которые плотно соединены с паннексиновыми каналами [10]. Ранее показано, что паннексиновые каналы пропускают АТФ из цитоплазмы во внеклеточное пространство [11]. В 2021 г. подтверждено, что внеклеточный АТФ при функциональной разгрузке может являться одним из основных сигналов в скелетных мышцах для регулирования различных процессов, среди которых – экспрессия генов [6]. Показано, что паннексин (Panx1) – опосредованный транспорт АТФ влияет на экспрессию мышечно-специфичных E3 убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx и регулирует сигнальные пути, контролирующие процессы трансляции и элонгации белка при функциональной разгрузке мышц [6]. Высказано предположение о возможном вовлечении пуриnergических рецепторов P2Y2 в эти процессы. В литературе имеются данные о том,

что внеклеточный АТФ может восприниматься как P2Y₂-, так и P2Y₁-рецепторами [10, 12–15]. Для проверки нашей гипотезы об участии пуринергических рецепторов P2Y₂ в процессе атрофии мышц мы блокировали P2Y₂-рецепторы (чувствительные к адениловым нуклеотидам) специфическим ингибитором AR-C 118925XX, животные при этом подвергались 3-дневной мышечной разгрузке путем вывешивания. Специфические ингибиторы пуринергических рецепторов появились недавно и используются впервые при моделировании функциональной разгрузки мышц крыс. Мы впервые показали, что при разгрузке мышц активация специфических транскрипционных программ запускается в том числе с помощью передачи АТФ-опосредованных сигналов и пуринергические рецепторы принимают в этом участие. Ингибирование пуринергических рецепторов P2Y₂ при 3-дневной разгрузке снижает атрофию мышц.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент был одобрен комиссией по биоэтической этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 585) и соответствует современным нормам и стандартам работы с животными.

24 самца крыс Вистар массой тела 190 ± 10 г случайным образом были распределены на 3 группы по 8 крыс в каждой: контроль (группа С) с введением плацебо (10%-ный раствор диметилсульфоксида в физиологическом растворе, объем инъекции – 400 мкл), 3-суточное вывешивание (группа HS) с введением плацебо, 3-суточное вывешивание с введением ингибитора P2Y₂-рецепторов AR-C 118925XX (10 мг/кг в день в 10%-ном растворе диметилсульфоксида в физиологическом растворе, внутривенно) (группа А). AR-C 118925XX – химическое наименование: 5-[[5-(2,8-Dimethyl-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yl)-3,4-dihydro-2-oxo-4-thioxo-1(2H)-pyrimidinyl]methyl]-N-2H-tetrazol-5-yl-2-furancarboxamide. Первая инъекция вводилась одновременно с вывешиванием, последующие – через 24 ч, не снимая животных с экспериментального стенда.

Вывешивание задних конечностей по методике Ильина–Новикова в модификации Morey–Holton [16] делалось так, что задние конечности крыс не касались пола, а передние свободно опирались на пол, и животные свободно передвигались. Крысы были подвешены на специальных мягких шинках. Данные показывают, что при таком способе проведения вывешивания животные не подвергаются стрессу, кровообращение хвоста не нарушается. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. Через 3 дня эксперимента крыс наркотизировали внутривенной инъекцией трибром-

этанола (240 мг/кг массы тела), выделяли *m. soleus*, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C . Животных умерщвляли введением летальной дозы трибромэтанола (480 мг/кг).

ОБРАБОТКА БИОМАТЕРИАЛА

Электрофорез с последующим вестерн-блоттингом

С каждого образца *m. soleus* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (10–15 мг) на микротоме–криостате фирмы Leica и немедленно прогомогенизированы в течение 25 мин в 125 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, США), содержащего 50 мМ Tris (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 мМ EDTA (pH 8.0) 1 мМ DTT, 1 мМ PMSF, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ PMSF, апротинин (10 мкг/мл), леупептин (10 мкг/мл), пепстатин А (10 мкг/мл), протеазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США) и фосфатазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США), либо 50 мМ NaF и 50 мМ бета-глицерофосфата. Затем образцы центрифугировали при 20 000 g в течение 15 мин. Часть супернатанта отбирали для определения концентрации общего белка с помощью реактива Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, США). Определения проводились на современном планшетном фотометре Epoch при длине волны 595 нм. Остальная часть белковых образцов была разаликвотирована в пробирки для дальнейшего проведения электрофоретических анализов. Образцы для нанесения разложились в 2-кратном Laemmli буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий).

Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем ПААГ (0.2%-ный метилбисакриламид, 0.1%-ный Ds-Na, 375 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 0.05%-ный персульфат аммония, 0.1%-ный TEMED) и в 5%-ном концентрирующем ПААГ (0.2%-ный метилбисакриламид, 0.1%-ный Ds-Na, 125 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 0.05%-ный аммоний персульфат, 0.1%-ный TEMED). Для проведения электрофореза был использован трис-глициновый буфер (192 мМ Tris-глицин (pH 8.6), 0.1%-ный Ds-Na). Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Образцы загружались из расчета 25 мкг общего белка в каждой пробе на дорожку и нормировались относительно уровня GAPDH, содержащегося в той же пробе. При необходимости для некоторых белков объем нанесения мог подбираться индивидуально. Электрофорез проводился при 15 мА на гель в мини-системе Bio-Rad Laboratories при комнатной температуре.

Вестерн-блоттинг. Электроперенос белков проводился в буфере (25 мМ Tris (pH 8.3), 192 мМ глицин, 20%-ный метанол, 0.04%-ный Ds-Na) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4°C в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad

Laboratories) в течение 2 ч. После электропереноса нитроцеллюлозные мембраны инкубировались в течение 5 мин в 0.3%-ном растворе Ponceau Red в 5%-ной уксусной кислоте, затем отмывались в PBS (Биолот) с 0.1%-ным Tween20 (PBST) до появления четких белковых полос на мембране. Этот этап проводился для контроля эффективности переноса, а также для того, чтобы убедиться, что количества общего белка, внесенного в каждую дорожку, было одинаковым. Мембраны блокировались в растворе 5%-ного сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST в течение 1 ч при комнатной температуре, затем помещались в раствор первичных антител на ночь при 4°C. Для выявления белковых полос были использованы первичные антитела против pErk1/2 (1:1000, #9101), Erk1/2 (1:1000, #4695), pAMPK (1:500, #2535), AMPK (1:1000, #2532), pP90 (1:1000, #9344), P90 (1:1000, #8408) фирмы "Cell Signaling Technology" (США), Puro-mycin (1:3000, EQ0001) фирмы Kerafast Inc. (США), GapDH (1:10000, #G401) фирмы ABM (США).

Затем мембрана отмывалась от первичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере и инкубировалась 1 ч со вторичными антителами goat-anti-rabbit (1:30000, Jackson Immuno Research, США) или goat-anti-mouse (1:20000, Bio-Rad Laboratories, США). Потом мембрана отмывалась от вторичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере. Выявление проводилось с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, США). Хемилюминесцентный сигнал детектировался с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Затем полученные на сканере изображения обрабатывались с помощью прилагаемого программного обеспечения Image Studio Software (LI-COR) для получения количественных данных для анализа. Для каждого параметра электрофорез с последующим иммуноблоттингом был повторен не менее 3 раз. Хемилюминесцентный сигнал исследуемых белков нормировался на сигнал GapDH. Данные вестерн-блоттинга представлены в виде соотношения сигнала фосфорилированной формы белка и сигнала, детектирующего весь этот белок, лишь при условии, что последний не изменяется.

Содержания АТФ в мышце

Для определения содержания АТФ в мышце использовался набор ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (МАК190; Sigma, St. Louis, MO, США). Образец ткани взвешивали, добавляли в пробирку 2 Н хлорную кислоту, 10 мкл/мг ткани и гомогенизировали. Затем пробы выдерживались на льду 30–45 мин. После этого образцы центрифугировали при 13000 g 2 мин при 4°C, супернатант переносился в чистую пробирку. Объем супернатанта измеряли, доводили до 500 мкл с помощью ATP Assay Buffer. Хлорную кислоту нейтрализовали добавле-

нием 2 М КОН (КОН добавляли постепенно, перемешивая и проверяя pH с помощью индикаторной бумаги до тех пор, пока pH пробы не достигал 6.5–8). Далее пробы центрифугировали при 13000 g в течение 15 мин при 4°C. Супернатант использовали для дальнейшего определения АТФ.

В лунки планшета вносили по 50 мкл образца (и по 50 мкл подготовленных стандартов в диапазоне 2–10 нмоль/лунка) и 50 мкл ATP Reaction Mix, затем инкубировали 30 мин в темноте. Оптическую плотность каждого образца измеряли с помощью планшетного спектрофотометра при 570 нм. Концентрация АТФ рассчитывалась по следующей формуле:

Концентрация АТФ = $V \cdot DDF / V$, где

V – количество АТФ в лунке с образцом, рассчитанное по стандартной кривой;

V – объем пробы, добавленный в лунки (50 мкл в нашем случае);

DDF – deproteinization dilution factor – фактор разведения, считался по формуле:

$DDF = (500 \text{ мкл} + \text{объем КОН (мкл)}) / \text{начальный объем пробы}$.

Исследование интенсивности синтеза белка

Для определения общего синтеза белка применялась методика SUnSET (surface sensing of translation) [17, 18]. За полчаса до введения наркоза животным вводили внутривенно 500 мкл 0.8%-ного раствора пурамицина, который ингибирует рост полипептидной цепи на рибосоме. При этом содержание пурамицина в скелетной мышце коррелирует с интенсивностью синтеза белка. Включение пурамициновой метки оценивалось с помощью вестерн-блоттинга. Пептиды, меченные пурамицином, выявляются с использованием антител против пурамицина. Скорость или общее количество включения пурамицина, обнаруженное антителом против пурамицина, служит прямым показателем синтеза белка.

Исследование экспрессии генов

Выделение мРНК из мышечной ткани. Для проведения ПЦР в реальном времени и оценки количества мРНК в экспериментальных группах была выделена РНК из образцов мышечной ткани. Для выделения тотальной РНК из скелетных мышц была использована методика выделения РНК на микроколонках RNeasy Micro (Qiagen, Германия). Производилась нарезка *m. soleus* крысы на микро-томе при толщине срезов 20 мкм. 4–6 мкг нарезанной ткани помещались в эпэндорф с 300 мкл лизирующего буфера RLT, содержащего гуанидин тиоцианат, сильный белковый детергент, в который добавлялось 10 мкл β-меркаптоэтанола. Гомогенат был перемешан в течение 1 мин на Microspin

FV-2400 (Biosan, Латвия). Затем к гомогенату было добавлено 589 мкл воды, очищенной от РНКазы, и 11 мкл раствора протеиназы К (18.7 мг/мл) (Синтол, Россия). Далее раствор инкубировался в течение 15 мин при 55°C, а затем центрифугировался при комнатной температуре 3 мин при 10000 g. Супернатант переносился в новую пробирку с 450 мкл 96–100%-ного этилового спирта, смесь перемешивалась пипетированием. Данный лизат был перенесен на колонку в пробирке и центрифугировался 15 с при ≥ 8000 g. Смыв был отброшен. Колонка промывалась 350 мкл буфера RW1 центрифугированием в течение 15 с при 13000 g, далее на 20 мин на силикагелевую мембрану колонки было нанесено 80 мкл ДНКазы I. Затем колонка последовательно была промыта буферами RW1, RPE, 80%-ным этанолом. Для элюции колонка была перенесена в эппендорф, на мембрану нанесено 30 мкл воды, проведено центрифугирование в течение 1 мин при 10000 g. Эппендорф с водным раствором РНК немедленно был помещен в лед, а затем на хранение в холодильник (–85°C). При помощи данного метода выделяются в основном молекулы мРНК.

Концентрация мРНК определялась по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLN, способного проводить измерения в объеме 2 мкл. Снимались показания в диапазоне от 200 до 320 нм. Измерение каждой пробы проводилось не менее 3 раз. Чистота образцов была оценена, исходя из соотношений показателей поглощения при различных длинах волн. Соотношение A260/A230 экспериментальных образцов было >2.0 , это указывает на то, что они являлись достаточно чистыми от углеводов, пептидов, фенолов или ароматических соединений.

Обратная транскрипция

Для проведения обратной транскрипции были использованы реагенты фирмы Синтол, Россия. Для подготовки кДНК водный раствор, содержащий 1 мкг тотальной РНК, 30 мкМ случайных гексануклеотидов и 17.4 мкМ олиго-d(T)15, инкубировался 3 мин при 70°C и немедленно переносился на лед. Далее к смеси было добавлено 11.5 мкл мастер-микса (1.3 мМ дНТФ, 0.02 ед/мкл ингибитора РНКазы, 6 ед/мкл M-MLV-ревертазы, 4 мкл 5x-буфера для M-MLV-ревертазы, Синтол). После этого пробы помещались в амплификатор (iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories) для проведения обратной транскрипции: 10 мин при 25°C, 60 мин при 37°C, 5 мин при 95°C, 30 мин при 4°C. После проведения реакции образцы, содержащие кДНК, хранились при –25°C.

Проведение ПЦР в реальном времени

Для проведения ПЦР в реальном времени смешивалось 2 мкл кДНК, 2 мкл праймеров с концентрацией 10 мкМ и 21 мкл мастер-микса (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10x ПЦР-буфера Б (pH 8.8), 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, Синтол). Затем пробы были помещены в амплификатор для проведения реакции.

Используемые в работе праймеры:

5'-ctgccaggcaccctgtctactt-3' и 5'-ctgaggtcaagt-gatcggaaggag-3' для P2Y2;

5'-gccaatgtgtgctttttgt-3' и 5'-aaattcagtcctctccccgt-3' для MuRF-1;

5'-ctacgatgttgagccaaga-3' и 5'-ggcagtcgagaagtc-cagtc-3' для MAFbx/Atrogine-1;

5'-caccagaaggtaaacacagga-3' и 5'-gcaagaactttat-tcaaag-tgcaa-3' для убиквитина;

5'-tca-cag-agc-aga-gaa-tgg-act-3' и 5'-gta-tgg-ctg-ata-cca-caa-ggt-3' для IL6R;

5'-gta-ccc-ttc-ctc-ttc-cct-atg-c-3' и 5'-caa-tgc-caa-ctc-tcg-tca-aca-g-3' для RPL19.

Все праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Для анализа полученных с помощью ПЦР в реальном времени данных применялось относительное количественное определение исследуемого гена, нормализованное к референсному, метод 2-ΔΔCt (метод Ливака). В качестве референсного гена был использован RPL19, экспрессия которого постоянна в *m. soleus* в условиях эксперимента.

Анализ полученных данных и статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы REST 2009 v.2.0.12 и OpenOffice.org Calc, находящихся в свободном доступе. REST 2009 v.2.0.12 позволяет анализировать данные по нескольким референсным генам, что снижает вероятность ошибки. Достоверность отличий между группами определялась с помощью критерия Краскела–Уоллиса. В тексте и на гистограммах результаты анализа экспрессии представлены в виде медианы и интерквартильной широты, результаты анализа относительного содержания белков с помощью вестерн-блоттинга представлены в виде среднего значения и ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние введения ингибитора на массу разгруженной m. soleus, экспрессию мРНК P2Y2-рецепторов и энергетической гомеостаз

За время эксперимента изменения массы тела крыс ни в одной из групп не наблюдалось. В группе

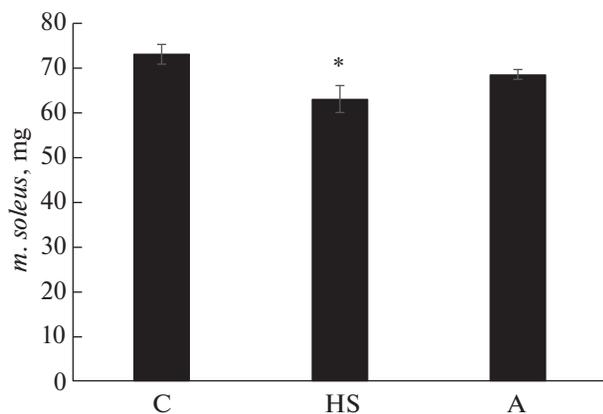


Рис. 1. Масса *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – Достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$).

вывешенных без препарата крыс (HS) масса *m. soleus* через 3 дня вывешивания была достоверно снижена на 10 мг по отношению к группе контроля ($p < 0.05$, рис. 1), в то время как между группой крыс, вывешенных с введением ингибитора P2Y2-рецепторов (группа А) и контролем различий не наблюдалось.

Мы обнаружили пониженную на 36% экспрессию мРНК P2Y2 (гр. А) при применении специфического ингибитора у вывешенных животных ($p < 0.05$) относительно контрольной группы (рис. 2). В группе HS отличий от контроля не наблюдалось. Результат свидетельствует о специфическом действии ингибитора на белок-мишень и снижении его экспрессии в мышце.

Уровень АТФ был существенно повышен только в группе вывешенных животных без введения препарата (HS) (на 62% по сравнению с группой контроля, $p < 0.05$, рис. 3). В группе А (с ингибированием P2Y2-рецепторов) этот параметр не отличался от группы контроля (рис. 3).

В нашем исследовании содержание рАМПК в группе HS было существенно ниже, чем в группе контроля (рис. 4). Однако в группе А (с ингибированием P2Y2-рецепторов) ее уровень в *m. soleus* не отличался от контрольной группы.

Влияние введения ингибитора P2Y2-рецептора на маркеры белковой деградации

Мы определили уровень экспрессии мРНК E3-убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx. Экспрессия MuRF1 у всех вывешенных животных была достоверно выше по сравнению с группой контроля ($p < 0.05$, рис. 5a). Экспрессия мРНК MAFbx была высокой в вывешенных группах относительно уровня группы контроля ($p < 0.05$), однако в группе

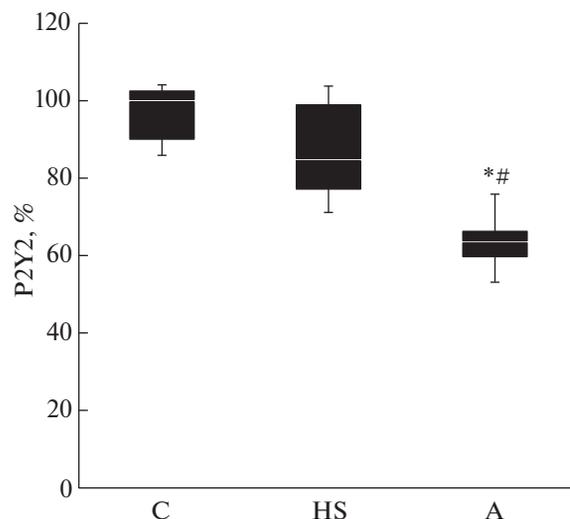


Рис. 2. Экспрессия мРНК P2Y2 в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

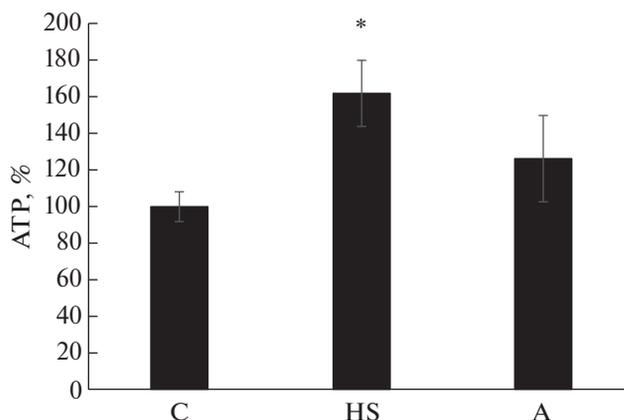


Рис. 3. Содержание АТФ в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – Достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$).

А экспрессия мРНК MAFbx была существенно ниже, чем в группе HS (вывешивания без препарата) ($p < 0.05$, рис. 5b).

Увеличение экспрессии мРНК убиквитина частично было предотвращено в группе животных, вывешенных с ингибированием P2Y2-рецепторов относительно группы контроля. В вывешенной без препарата группе HS его уровень был на 114% выше, чем в группе контроля, в то время как в группе с ингибированием P2Y2-рецепторов (т.е. в той группе, где не было атрофии камбаловидной мыш-

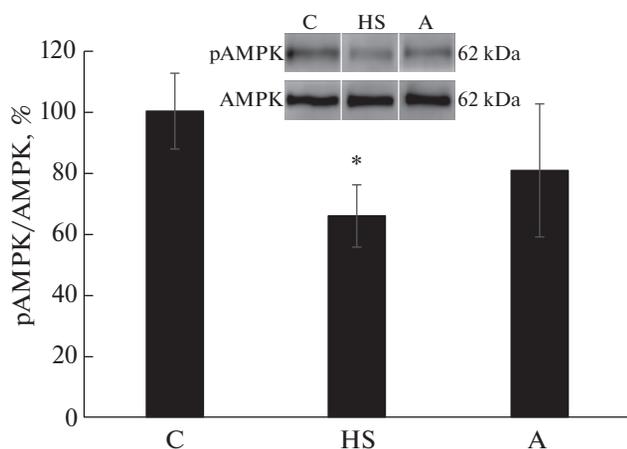


Рис. 4. Содержание pAMPK в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – Достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$).

цы) его экспрессия была повышена только на 48% ($p < 0.05$, рис. 6).

Мы обнаружили увеличение экспрессии рецептора интерлейкина 6 (IL-6R) во всех *m. soleus* вывешенных животных (гр. HS и А) относительно группы контроля на 199 и 48% соответственно (рис. 7). Однако стоит отметить, что в группе А (где масса *m. soleus* не отличалась от группы контроля) экспрессия рецепторов IL-6 была значительно ниже, чем в группе вывешивания без препарата HS ($p < 0.05$).

Влияние введения ингибитора P2Y2-рецептора на маркеры, участвующие в регуляции белкового синтеза

Мы исследовали уровень фосфорилирования Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase) в *m. sole-*

us. Фосфорилирование Erk1/2 в *m. soleus* было снижено в группе вывешенных крыс (HS) на 63%. Введение ингибитора P2Y2-рецептора полностью предотвратило индуцированное разгрузкой снижение фосфорилирования Erk1/2 в группе А (рис. 8).

Уровень фосфорилирования p90RSK также был значительно снижен в вывешенной группе HS на 28% ($p < 0.05$) относительно группы контроля (рис. 9). Однако в группе А, вывешенной с ингибированием пуринергических рецепторов, уровень фосфорилирования p90RSK в *m. soleus* не отличался от группы контроля.

Интенсивность синтеза белка была достоверно снижена на 60% в группе вывешивания HS ($p < 0.05$) относительно группы контроля. В группе А это снижение было почти в 2 раза ниже – 37% относительно контроля (рис. 10).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами обнаружено, что масса *m. soleus* была достоверно снижена относительно контроля только в группе вывешивания без препарата, указывая на замедление скорости атрофических процессов при ингибировании пуринергических рецепторов P2Y2. Мы впервые получили такой результат, так как ингибитор AR-C 118925XX рецепторов P2Y2 был выпущен недавно, и ингибирование пуринергических рецепторов при функциональной разгрузке мышц ранее не исследовалось. Наиболее близким способом (прототипом), направленным на предотвращение атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке, можно считать способ Chen и соавт. [19]. В этой работе исследовали первичные мышечные фибробласты, выделенные из мышечных дикого типа и мышечных с отсутствием гена белка P2Y2, после повреждения у них нерва *sciatic* в течение 2, 4 и 6 нед. Авторы обнаружили меньшую

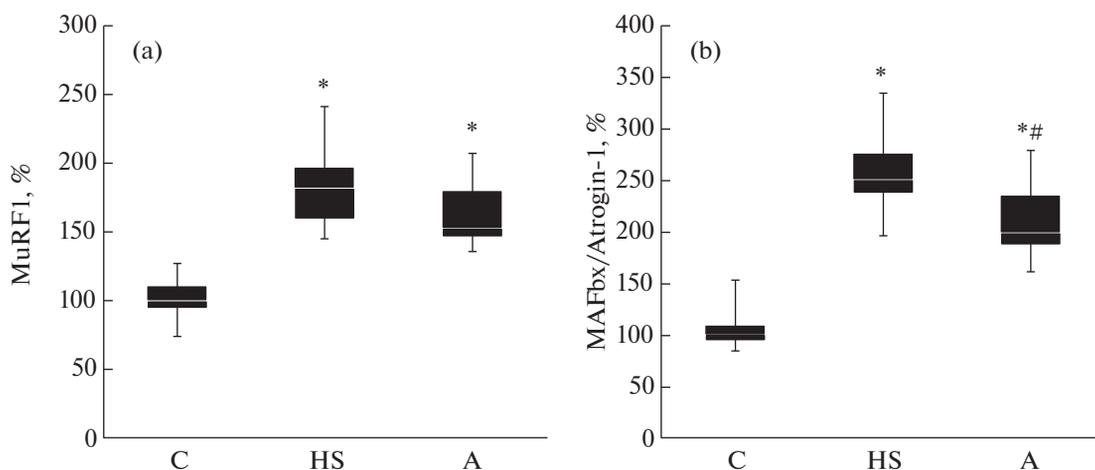


Рис. 5. Экспрессия мРНК MuRF1 (а) и MAFbx/Atrogin (b) в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – Достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

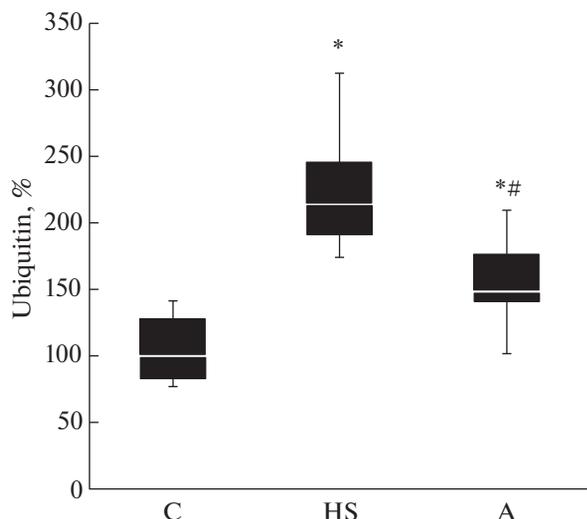


Рис. 6. Экспрессия мРНК убиквитина в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

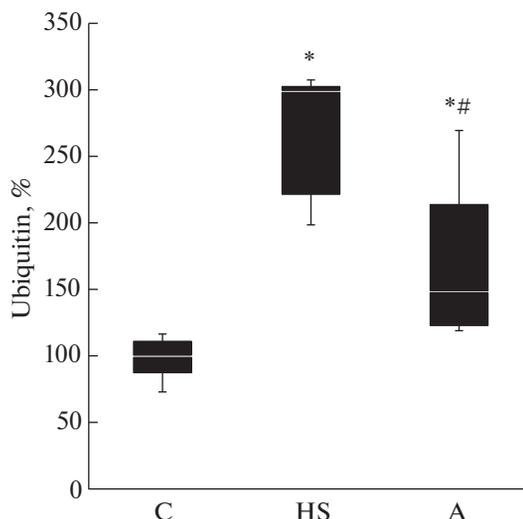


Рис. 7. Экспрессия мРНК IL6R в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

атрофию мышцы у мышей при денервации, у которых отсутствовал ген белка P2Y2. Было показано, что P2Y2 усиливают атрофию скелетных мышц и активацию фибробластов после мышечного повреждения. Стоит отметить, что использование метода генных модификаций и воздействий на геном человека для предотвращения атрофии мышц у людей неприменимо. Можно полагать, что фармакологическое применение ингибиторов пуриnergических рецепторов может быть использовано в медицине.

Рецепторы P2Y (в том числе Y1 и Y2) (связаны с рецептором, сопряженным с G-белком (GPCR)), активируются как ди-, так и трифосфат-пуриновыми или пиримидиновыми нуклеотидами. Мы исследовали роль рецепторов P2Y2 в регуляции клеточного сигналинга при функциональной разгрузке мышц. Экспрессия мРНК P2Y2-рецепторов при применении селективного ингибитора AR-C 118925XX была снижена относительно уровня группы контроля (рис. 2). Результат свидетельствует о специфическом действии ингибитора на белок-мишень и снижении его экспрессии в мышце. Так как этот рецептор взаимодействует с нуклеотидами, мы определили содержание АТФ в *m. soleus* всех экспериментальных групп. Уровень АТФ был существенно повышен только в группе вывешенных без введения препарата животных (HS), (на 62% по сравнению с группой контроля, рис. 3). О таком же повышении уровня АТФ при 3-дневном вывешивании крыс сообщалось ранее [6]. В группе с ингибированием P2Y2-рецепторов такого увеличения АТФ в *m. soleus* не было. Ранее показано, что

АТФ вызывает увеличение Ca^{2+} путем активации рецептора P2Y2 и нижележащего пути IP3R специфически в медленной *m. soleus* [20]. Итак, ингибирование пуриnergических P2Y2-рецепторов при разгрузке мышцы эффективно влияет на уровень в ней АТФ.

АМПК (аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа) является ключевым регулятором энергетического гомеостаза. Уровень фосфорилирования АМПК может меняться в зависимости от продолжительности мышечной разгрузки [21–23]. В нашем исследовании содержание рАМПК в группе HS было значительно снижено относительно группы контроля (рис. 4). Однако в группе с ингибированием P2Y2-рецепторов (А) уровень ее фосфорилирования в *m. soleus* не отличался от уровня группы контроля. Фосфорилирование АМПК может регулироваться несколькими механизмами, включая метилирование [24] и содержание АМФ (аденозинмонофосфата). Активация АМПК регулируется также кальцием [25]. Можно отметить, что в группе с ингибированием P2Y2-пуриnergических рецепторов снижение фосфорилирования АМПК при функциональной разгрузке *m. soleus* было полностью предотвращено. Можно предположить, что это произошло потому, что уровень АТФ, ингибирующий ее фосфорилирование, в этой группе не отличался от уровня группы интактного контроля (в отличие от группы HS).

Итак, ингибирование P2Y2-рецепторов в *m. soleus* при ее функциональной разгрузке замедляет развитие в ней атрофии, накопление АТФ и сни-

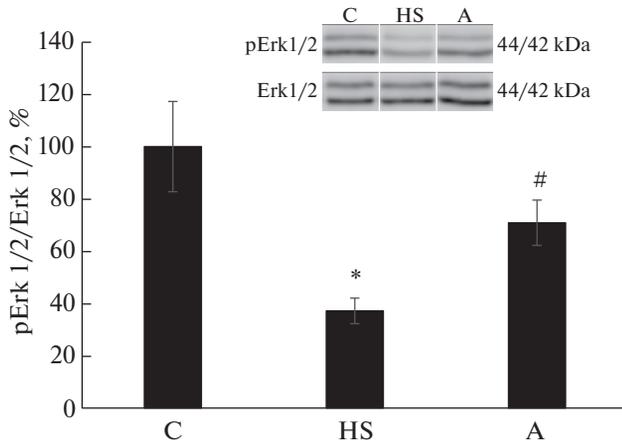


Рис. 8. Содержание pErk1/2 в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

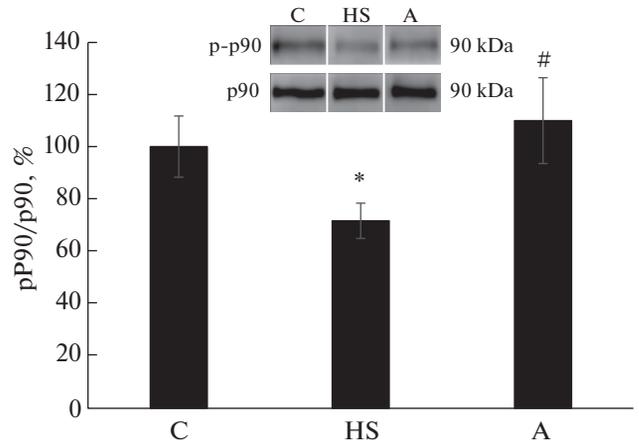


Рис. 9. Содержание p-p90 в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

жение фосфорилирования AMPK – ключевого регулятора энергетического гомеостаза.

Влияние введения ингибитора P2Y2-рецептора на маркеры белковой деградации

Экспрессия E3-лигаз MuRF1 и MAFbx в *m. soleus* обеих групп вывешенных крыс была существенно выше, чем в группе контроля (рис. 5a, b). Однако в группе А увеличение экспрессии мРНК MAFbx (но не MuRF1) было значительно заторможено относительно группы вывешивания без препарата (рис. 5b). MAFbx является убиквитинлигазой, участвующей в убиквитинировании белков, что ведет к атрофии мышц [26]. Ранее было показано увеличение экспрессии мРНК этих E3-лигаз при 3-дневном вывешивании крыс [6]. Увеличение экспрессии мРНК убиквитина частично предотвращалось в группе, вывешенной с ингибированием P2Y2-рецепторов, относительно группы контроля (рис. 6), т.е. в той группе, где не было атрофии камбаловидной мышцы. Убиквитинирование белков является меткой их дальнейшей деградации [26, 27].

Увеличение экспрессии мРНК рецептора интерлейкина 6 (IL-6R) было обнаружено в *m. soleus* всех вывешенных животных (рис. 7), но в группе А оно было в 2 раза ниже, чем в группе HS. Известно, что содержание интерлейкина-6 (IL-6), миокина увеличивается при функциональной разгрузке мышц, что ассоциируется с экспрессией в них атрогенов (MuRF1 и MAFbx) и атрофией [28]. Блокирование рецепторов IL-6 предотвращает развитие атрофии *m. soleus* [28], а введение IL-6 в мышцу, напротив, ведет к ее атрофии [29]. IL-6

способен влиять на генную экспрессию через эпигеномную модификацию [30].

Пуринергические рецепторы P2Y2 имеют отношение к регуляции экспрессии мРНК MAFbx и убиквитина, и их ингибирование при разгрузке *m. soleus* существенно замедляет в ней экспрессию мРНК IL-6R, что может способствовать снижению степени ее атрофии.

Влияние введения ингибитора P2Y2-рецептора на маркеры, участвующие в регуляции белкового синтеза

Мы исследовали маркер MAPK сигнального пути Erk1/2. MAPK фосфорилируют белки-мишени по остаткам серина и треонина и таким образом передают сигнал дальше. Фосфорилирование Erk1/2 (по сайтам Thr202/Tyr204) в *m. soleus* в нашем эксперименте было снижено в группе HS на 63%, $p < 0.05$. Ранее мы отмечали снижение уровня фосфорилирования Erk1/2 при 1- и 3-дневном вывешивании крыс [6]. Введение ингибитора P2Y2-рецептора полностью предотвратило индуцированное разгрузкой снижение фосфорилирования Erk1/2 в группе А. В большинстве случаев событие фосфорилирования Erk1/2 по сайтам Thr202/Tyr204 не зависит от рапамицина и, следовательно, считается, что оно происходит независимо от пути mTORC1 [31]. Активированный Erk1/2 может фосфорилировать и активировать p90RSK [31–33]. P90RSK (рибосомальная серин/треонин киназа p90) является маркером Erk1/2-сигнального пути и участвует в трансляции белка [34]. p90RSK регулирует активность mTORC1 и синтез белка посредством фосфорилирования TSC2 и Raptor [35–38]. Уровень ее фосфорилирования из-

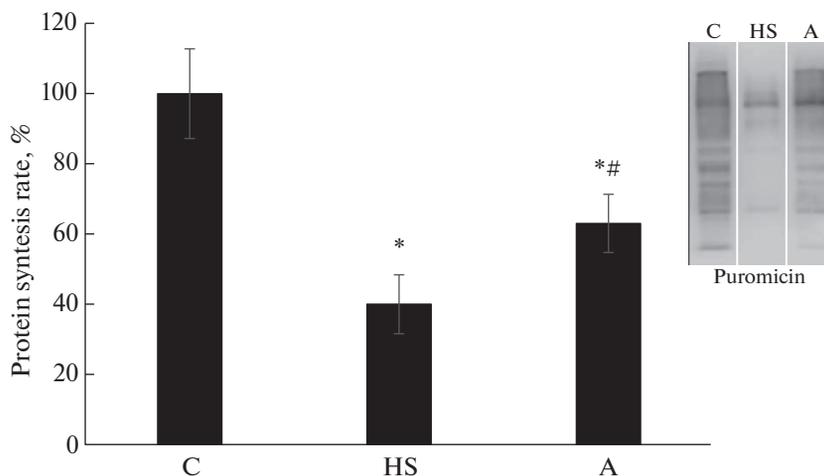


Рис. 10. Интенсивность синтеза белка в *m. soleus* крыс после 3-дневного вывешивания. С – контроль, HS – 3-суточное вывешивание с введением плацебо, А – 3-суточное вывешивание с введением AR-C 118925XX. * – Достоверные отличия от группы С ($p < 0.05$); # – достоверные отличия от групп HS ($p < 0.05$).

менялся в нашем эксперименте синхронно с уровнем Erk1/2: был значительно снижен в вывешенной группе HS (на 28%) относительно группы контроля (рис. 9). Снижение содержания p-p90RSK при 3-дневном вывешивании выявляли ранее [6]. Однако в группе А уровень фосфорилирования p90RSK в *m. soleus* не отличался от группы контроля. Различия в уровне фосфорилирования p90RSK между группами HS и А указывают на то, что снижение атрофии *m. soleus* в группе А могло быть связано с лучшим регулированием процессов белкового синтеза в вывешенной с ингибированием P2Y2-рецепторов группе.

Оценивая интегральный показатель интенсивности синтеза белка с помощью введения пурамицина (метод SUnSET), мы также обнаружили существенно более высокий уровень интенсивности синтеза белка в группе А относительно группы вывешивания без препарата, что свидетельствует об активизации белкового синтеза в этой группе.

Вывод. Впервые показано, что активация атрофических процессов при разгрузке *m. soleus* запускается в том числе с помощью передачи АТФ-опосредованных сигналов, и пуриnergические рецепторы P2Y2 принимают участие в ее регуляции.

Блокирование рецепторов P2Y2 замедляет развитие атрофии *m. soleus* при разгрузке как за счет снижения протеолитических процессов (экспрессии МАФbх и убиквитина), так и за счет увеличения интенсивности синтеза белка (в 1.5 раза) через сигнальный каскад ERK/p90RSK.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа финансировалась за счет грант РФФИ № 20-015-00138.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Л.Н.Т. – идея работы, планирование эксперимента, написание и редактирование манускрипта; С.П.Б. – планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование манускрипта; К.А.З. – сбор данных, обработка данных и редактирование манускрипта, Б.С.Ш. – идейное руководство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81 (11 Suppl): S40–S51. <https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D>
2. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ (2000) Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 89 (2): 823–839. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.2.823>
3. Fluck M, Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 159–216. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0004-7>
4. Hodson N, West DWD, Philp A, Burd NA, Moore DR (2019) Molecular regulation of human skeletal muscle protein synthesis in response to exercise and nutrients: a compass for overcoming age-related anabolic resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* 317 (6): C1061–C1078. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00209.2019>
5. Белова СП, Тыганов СА, Мочалова ЕП, Шенкман БС (2021) Ограничение двигательной активности и синтез белка в постуральных и локомоторных мыш-

- цах. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 107: 842–853. [Belova SP, Tyganov SA, Mochalova EP, Shenkman BC (2021) Restricted Activity and Protein Synthesis in Postural and Locomotor Muscles. *Russ J Physiol* (2021) 107: 842–853. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030194>
6. Zaripova KA, Kalashnikova EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2021) Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 22 (19).
<https://doi.org/10.3390/ijms221910444>
 7. Shenkman BS (2020) How Postural Muscle Senses Disuse? Early Signs and Signals. *Int J Mol Sci* 21 (14).
<https://doi.org/10.3390/ijms21145037>
 8. Ohira Y, Yasui W, Kariya F, Wakatsuki T, Nakamura K, Asakura T, Edgerton VR (1994) Metabolic adaptation of skeletal muscles to gravitational unloading. *Acta Astronaut* 33: 113–117.
[https://doi.org/10.1016/0094-5765\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0094-5765(94)90115-5)
 9. Gupta RC, Misulis KE, Dettbarn WD (1989) Activity dependent characteristics of fast and slow muscle: biochemical and histochemical considerations. *Neurochem Res* 14 (7): 647–655.
<https://doi.org/10.1007/BF00964874>
 10. Casas M, Buvinic S, Jaimovich E (2014) ATP signaling in skeletal muscle: from fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* 42 (3): 110–116.
<https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000017>
 11. Dahl G (2015) ATP release through pannexon channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370 (1672).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0191>
 12. May C, Weigl L, Karel A, Hohenegger M (2006) Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a Ca²⁺ independent manner in differentiated human skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol* 71 (10): 1497–1509.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.003>
 13. Arias-Calderon M, Almarza G, Diaz-Vegas A, Contreras-Ferrat A, Valladares D, Casas M, Toledo H, Jaimovich E, Buvinic S (2016) Characterization of a multiprotein complex involved in excitation-transcription coupling of skeletal muscle. *Skelet Muscle* 6: 15.
<https://doi.org/10.1186/s13395-016-0087-5>
 14. Riquelme MA, Cea LA, Vega JL, Boric MP, Monyer H, Bennett MV, Frank M, Willecke K, Saez JC (2013) The ATP required for potentiation of skeletal muscle contraction is released via pannexin hemichannels. *Neuropharmacology* 75: 594–603.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.022>
 15. Liu B, Cao W, Li J, Liu J (2018) Lysosomal exocytosis of ATP is coupled to P2Y2 receptor in marginal cells in the stria vascularis in neonatal rats. *Cell Calcium* 76: 62–71.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.09.006>
 16. Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G (2005) The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med* 10: 7–40.
[https://doi.org/10.1016/s1569-2574\(05\)10002-1](https://doi.org/10.1016/s1569-2574(05)10002-1)
 17. Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, Hornberger TA (2011) Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J* 25 (3): 1028–1039.
<https://doi.org/10.1096/fj.10-168799>
 18. Ravi V, Jain A, Mishra S, Sundaresan NR (2020) Measuring Protein Synthesis in Cultured Cells and Mouse Tissues Using the Non-radioactive SUnSET Assay. *Curr Protoc Mol Biol* 133 (1): e127.
<https://doi.org/10.1002/cpmb.127>
 19. Chen M, Chen H, Gu Y, Sun P, Sun J, Yu H, Zheng H, Chen D (2021) P2Y2 promotes fibroblasts activation and skeletal muscle fibrosis through AKT, ERK, and PKC. *BMC Musculoskelet Disord* 22 (1): 680.
<https://doi.org/10.1186/s12891-021-04569-y>
 20. Ito N, Ruegg UT, Takeda S (2018) ATP-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels and Subsequent Activation of mTOR as Regulators of Skeletal Muscle Hypertrophy. *Int J Mol Sci* 19 (9).
<https://doi.org/10.3390/ijms19092804>
 21. Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Nemirovskaya TL, Mirzoev TM, Turtikova OV, Shenkman BS (2017) Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol (London)* 595 (23): 7123–7134.
<https://doi.org/10.1113/JP275184>
 22. Tyganov SA, Mochalova EP, Belova SP, Sharlo KA, Rozhkov SV, Vilchinskaya NA, Paramonova, II, Mirzoev TM, Shenkman BS (2019) Effects of Plantar Mechanical Stimulation on Anabolic and Catabolic Signaling in Rat Postural Muscle Under Short-Term Simulated Gravitational Unloading. *Front Physiol* 10: 1252.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01252>
 23. Stouth DW, Manta A, Ljubicic V (2018) Protein arginine methyltransferase expression, localization, and activity during disuse-induced skeletal muscle plasticity. *Am J Physiol Cell Physiol* 314 (2): C177–C190.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00174.2017>
 24. Stouth DW, van Lieshout TL, Ng SY, Webb EK, Manta A, Moll Z, Ljubicic V (2020) CARM1 Regulates AMPK Signaling in Skeletal Muscle. *iScience* 23 (11): 101755.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101755>
 25. Mathew TS, Ferris RK, Downs RM, Kinsey ST, Baumgartner BL (2014) Caffeine promotes autophagy in skeletal muscle cells by increasing the calcium-dependent activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 453 (3): 411–418.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.094>
 26. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294 (5547): 1704–1708.
<https://doi.org/10.1126/science.1065874>
 27. Glass DJ (2003) Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5 (2): 87–90.
<https://doi.org/10.1038/ncb0203-87>
 28. Yakabe M, Ogawa S, Ota H, Iijima K, Eto M, Ouchi Y, Akishita M (2018) Inhibition of interleukin-6 decreases atrogenes expression and ameliorates tail suspension-

- induced skeletal muscle atrophy. PLoS One 13 (1): e0191318.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191318>
29. Sun H, Sun J, Li M, Qian L, Zhang L, Huang Z, Shen Y, Law BY, Liu L, Gu X (2021) Transcriptome Analysis of Immune Receptor Activation and Energy Metabolism Reduction as the Underlying Mechanisms in Interleukin-6-Induced Skeletal Muscle Atrophy. Front Immunol 12: 730070.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730070>
 30. Hodge DR, Cho E, Copeland TD, Guszczynski T, Yang E, Seth AK, Farrar WL (2007) IL-6 enhances the nuclear translocation of DNA cytosine-5-methyltransferase 1 (DNMT1) via phosphorylation of the nuclear localization sequence by the AKT kinase. Cancer Genomics Proteomics 4 (6): 387–398.
 31. Hodson N, Philp A (2019) The Importance of mTOR Trafficking for Human Skeletal Muscle Translational Control. Exerc Sport Sci Rev 47 (1): 46–53.
<https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000173>
 32. Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev 75 (1): 50–83.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
 33. Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR (2001) Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. J Physiol 536 (Pt 1): 273–282.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00273.x>
 34. Mirzoev TM, Shenkman BS (2018) Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis. Biochemistry (Mosc) 83 (11): 1299–1317.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918110020>
 35. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev 68 (2): 320–344.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
 36. Kimball SR, Jefferson LS (2006) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. J Nutr 136 (1 Suppl): 227S–231S.
<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.227S>
 37. Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP (2008) The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. Front Biosci 13: 4258–4275.
<https://doi.org/10.2741/3003>
 38. Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP (2008) Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. Curr Biol 18 (17): 1269–1277.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.078>

The Role of P2Y Receptors in the Regulation of Atrophic Processes in Rat Skeletal Muscles under Unloading

K. A. Zaripova^a, S. P. Belova^a, B. S. Shenkman^a, and T. L. Nemirovskaya^{a, #}

^a Institute of biomedical problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

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

Skeletal muscle atrophy during their unloading is due to a decrease in protein synthesis and an increase in proteolysis. Accumulation of ATP in the muscle during unloading, detected at early stages of unloading, may be one of the stimuli triggering this process. It has been shown that pannexin channels let ATP pass from the cytoplasm to the extracellular space during muscle unloading. Extracellular ATP can be sensed by P2Y2 receptors. To test the hypothesis on the involvement of P2Y2 receptors in the regulation of signaling processes in skeletal muscles at early stages of unloading, they were inhibited by their selective inhibitor AR-C 18925XX. The inhibition of P2Y2 receptors during 3-day unloading decreased *m. soleus* atrophy, prevented ATP accumulation in this muscle, slowed down the expression of MAFbx E3-ligase mRNA, ubiquitin, and IL6 receptors, increased the level of AMPK phosphorylation and intensity of protein synthesis.

Keywords: soleus, atrophy, MuRF1 and MAFbx, ubiquitin, intensity of protein synthesis, P2Y2 receptors

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КЛЕТКАХ *PARAMECIUM CAUDATUM* И *АМОЕВА PROTEUS*

© 2022 г. Л. В. Чистякова¹, Д. Р. Файзуллина², С. В. Шмаков³, Н. Н. Петрищев^{2,*}

¹ Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алферова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: lasmed@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 01.09.2022 г.

Исследованы особенности распределения различных фотосенсибилизаторов (ФС) (радахлорина, бенгальского розового и копропорфирина) в клетках инфузорий *Paramecium caudatum* и лобозных амёб *Amoeba proteus*. Характер аккумуляции ФС оценивали по результатам как прижизненных наблюдений, так и на фиксированном материале, с использованием методов флуоресцентной и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. Показано, что исследованные одноклеточные эукариотные организмы имеют сходное с млекопитающими внутриклеточное распределение ФС и могут быть использованы в качестве модельных объектов на первых этапах доклинических исследований веществ – потенциальных ФС. Предложены некоторые методические рекомендации по выявлению клеточных компартментов, в которых происходит избирательное накопление ФС.

Ключевые слова: протисты, фотосенсибилизатор, инфузории, амёбы, фотодинамическая терапия, флуоресцентная микроскопия, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия

DOI: 10.31857/S004445292206002X

Одноклеточные эукариоты – перспективный модельный объект исследований в различных научных направлениях; наиболее широко протисты используются при изучении характера воздействия разнообразных веществ и соединений на живые организмы. В литературе имеются сведения об использовании подвижных простейших, в том числе инфузорий, как чувствительных объектов для изучения светового воздействия, оценки сравнительной токсичности препаратов и определения распределения и накопления препаратов в клетках [1–3]. Особенности строения одноклеточных позволяют оценивать результат экспериментальных воздействий как на клеточном, так и на организменном уровне. Возможность лабораторного культивирования позволяет получать большие количества генетически однородного материала и максимально стандартизировать условия проведения эксперимента. Оптимальным представляется использование в качестве модельных объектов нескольких видов протистов, относящихся к разным крупным таксонам ранга типа, например, инфузорий (*Alveolata*, *Ciliophora*) и лобозных

амёб (*Amoebozoa*, *Tubulinea*). Подобный подход позволяет изучать механизмы воздействия тестируемых веществ на клетки с разным типом организации и детально охарактеризовать процессы, протекающие в различных компартментах. Сравнительный анализ результатов подобных экспериментов позволяет более достоверно аппроксимировать полученные данные на многоклеточные организмы, а также сократить объем исследований на млекопитающих.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой вариант фототерапии, получивший широкое распространение в различных областях медицины, обеспечивающий достижение высоких результатов при лечении патологических процессов, протекающих в доступных для облучения зонах. Фотодинамическое воздействие подразумевает комбинацию препарата, локализованного в клетках-мишенях – фотосенсибилизатора (ФС), и света определенной длины волны, который поглощается ФС, в присутствии молекулярного кислорода [4]. Взаимодействие препарат-свет приводит к разрыву химических и биохимических процессов,

Таблица 1. Краткая характеристика ФС, использованных в работе

ФС	Действующее вещество	ФД	ϵ_{λ} , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	ФГ	λ , нм	Растворимость
Радахлорин	натриевые соли хлорина еб (80–90%), пурпурина 5 (5–20%) и хлорина рб (0–15%)	0.64 (водный раствор)	$\epsilon_{660} = 5 \cdot 10^4$	0.04	662	амфи-фильный
Копропорфирин	тетракалиевая соль копропорфирина III	0.37 фосфатный буфер (0.17 в присутствии альбумина)	$\epsilon_{400} = 4 \cdot 10^5$	0.03	635	гидро-фильный
Бенгальский розовый	4,5,6,7-тетрахлоро-2',4',5',7'-тетрайодофлуоресцеин	0.75 (водный раствор)	$\epsilon_{532} = 5 \cdot 10^4$	0.05	532	гидро-фильный

Примечание: λ – длины волн, использованные в работе; ϵ_{λ} – молярный коэффициент экстинкции, ФГ – квантовый выход флуоресценции, ФД – квантовый выход синглетного кислорода. Физико-химические характеристики приведены по данным литературных источников [11–16].

которые вызывают повреждение активными формами кислорода (АФК) на клеточном уровне. Среди АФК наибольшее значение имеют: синглетный кислород (1O_2) и супероксидный анион-радикал, который обычно превращается в более реакционноспособные пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал ($HO\cdot$). На сегодняшний день определены несколько потенциальных мишеней 1O_2 в клетке – белки, нуклеиновые кислоты, липиды мембран. Белки обладают более высокой реакционной способностью в отношении 1O_2 , по сравнению с нуклеиновыми кислотами или ненасыщенными липидами, и именно взаимодействие с белками АФК является ключевым в развитии фотодинамического эффекта [5]. Радиус действия 1O_2 составляет около 1–1.5 мкм внутри H_2O -инкубированной клетки [6]. Таким образом, фотодинамический эффект определяется в первую очередь характеристиками ФС (одной из которых является квантовый выход генерации 1O_2 (ФД)), а также особенностями локализации препарата внутри клетки. В связи с этим важнейшие направления исследований в области ФДТ связаны, с одной стороны, с поиском и тестированием новых веществ – потенциальных ФС, а с другой – с разработкой методов, облегчающих импорт ФС через плазматическую мембрану и избирательное связывание с молекулами-мишенями [7, 8].

В настоящей работе с использованием методов флуоресцентной, а также конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (КСЛМ) исследованы особенности распределения различных ФС (радахлорина (РДХ), бенгальского розового (БР) и копропорфирина (КПФ)) в клетках инфузорий *Paramecium caudatum* (Ciliophora, Oligohymenophorea) и лобозных амёб *Amoeba proteus* (Tubulinea, Eumycetozoa). Проведен сравнительный анализ характера аккумуляции ФС у исследованных одноклеточных эукариот и различных культур клеток млекопитающих, с целью определения целесообразности использования *P. caudatum* и *A. proteus* в

качестве модельных объектов на первых этапах доклинических исследований веществ – потенциальных ФС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инфузории *Paramecium caudatum* (клон 39–9) были получены из Коллекции культур ресурсного центра “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ. Инфузорий культивировали по стандартной методике [9]. Амёбы *Amoeba proteus* (изолят Pskov) были получены из Коллекции штаммов свободноживущих амёб ИНЦ РАН. Культуру амёб поддерживали на среде Прескотта с рисовыми зёрнами и инокулированной в среду смесью инфузорий *Colpidium* sp. и жгутиконосцев *Chilomonas* sp., в культуральной среде также присутствовали одноклеточные зелёные водоросли [10].

В качестве ФС использовали препараты различного химического строения: радахлорин® (ООО “РАДА-Фарма”, Россия), копропорфирин® (ООО “НПФ “ЭЛЕКТ”, Россия), бенгальский розовый (“Acros organics”, США) (табл. 1).

Все эксперименты проводили в 24 луночных культуральных планшетах (Corning, США). Для флуоресцентной микроскопии (ФМ) использовали микроскоп Leica DM2500, оснащенный флуоресцентным модулем с фильтр-кубами B\G\R и N2.1 и камерой Leica DFM 495 (Leica-Microsystems, Wetzlar, Германия). КСЛМ проводили на приборе Axio Observer Z1 с конфокальным модулем Yokogawa CSU-X1 (Carl Zeiss, Германия), с использованием иммерсионного объектива при увеличении 40/60/100x, с ПО Leica Application Suite (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия) и AxioVision SE64 Software (Carl Zeiss, Германия) соответственно. Регистратю флуоресценции проводили при ФМ и КСЛМ следующих параметрах: БР – 515–60/580 и 488.545/580–690 нм; РДХ – 450–90/510 и 488/640–680 нм; КПФ 450–90/510 и 405.630/660–680 нм соответственно.

В первой серии экспериментов для выявления в клетках митохондрий использовали MitoTracker™ Red CMXRos (M7512, ThermoFisher Scientific Inc., США) в концентрации 250 нМ при окраске инфузорий и 500 нМ при окраске амёб. Клетки инкубировали в растворе митотрекера в течение получаса в темноте, затем отмывали водой 5–7 мин, помещали на предметное стекло и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. Для выявления лизосом и пищеварительных вакуолей у инфузорий использовали лизотрекер CytoPainter (ab112136, Abcam, США), компоненты набора смешивали в соответствии с протоколом и добавляли в культуру инфузорий в соотношении 1:1. Для выявления лизосом и пищеварительных вакуолей у амёб использовали LysoTracker™ Green DND-26 (L7526, ThermoFisher Scientific Inc., США) в концентрации 100 нМ. Клетки инкубировали в растворе лизотрекера в течение 30 мин в темноте, затем отмывали водой 5–7 мин, помещали на предметное стекло и исследовали при помощи микроскопии.

Во второй серии экспериментов, направленных на оценку внутриклеточного распределения ФС, перед обработкой клеток инфузорий растворами ФС их помещали в стерильную среду на основе листьев салата на 1 ч при комнатной температуре (21–22°C), для уменьшения количества пищевых вакуолей, маскирующих другие органеллы. Затем переносили клетки в лунки планшета – 30 клеток в серии эксперимента, по 5 клеток в лунке планшета объемом 15 мкл. К клеткам добавляли 10 мкл готового водного раствора ФС (см. табл. 2), затем инкубировали в полной темноте в течение 30 мин. После этого клетки трижды последовательно отмывали фосфатным буферным солевым раствором (НПЦ “Эко-Сервис”, Россия) в течение 15 мин. Отмытые клетки помещали на предметные стекла, которые имели адгезивное покрытие Polysine (“Thermo Scientific Inc.”, США), и исследовали с помощью микроскопии. При необходимости инфузории фиксировали в течение 10 мин при помощи 4% параформальдегида (“Sigma-Aldrich”, США) непосредственно на предметном стекле. Далее выполняли однократное (в связи с высоким риском разрушения клеток) отмывание в фосфатно-солевом буфере в течение 5 мин. После удаления фосфатно-солевого буфера препарат заключали в глицерин и накрывали предметным стеклом. Ядра окрашивали DAPI (1351303, Bio-Rad, США) в концентрации 2 мкг/мл непосредственно перед приготвлением препарата. Препарат помещали в холодильник (+4°C) на 20–30 мин.

В третьей серии экспериментов контролировали фотодинамический эффект с использованием культуры *P. caudatum* после определения нецитотоксичных концентраций растворов ФС. Для этого после подсчета клеток, инфузорий отделяли от питательной среды центрифугированием (15 мин при

Таблица 2. Нецитотоксичные молярные концентрации растворов, использованные в работе

Действующее вещество	Молекулярная масса вещества, г/моль	Молярная концентрация раствора, моль/л
хлорин е ⁶ *	596.7	6.3×10^{-6}
бенгальский розовый	1049.8	6.3×10^{-6}
тетракалиевая соль копропорфирина III**	654.7	6.3×10^{-5}

Примечание: * – радахлорин – препарат хлоринового ряда, имеет следующий состав: хлорин е⁶ (80–90%), пурпурин 5 (5–20%), пурпурин 18 – хлорин р⁶ (0–15%); ** – копропорфин – препарат, состоящий из водорастворимой тетракалиевой соли копропорфирина III (89.25%), не более чем на 1% – из белковых и пептидных соединений и приблизительно на 10% – из примесей других порфиринов, продуцентом которых является культура *Arthrobacter globiformis*.

5000 об/мин), ресуспендировали в 2 мл готовых растворов ФС и переносили в стеклянные чашки Петри диаметром 6 см. Инкубировали в течение 30 мин, далее чашки облучали диодными лазерными аппаратами с длинами волн соответствующими ФС. Параметры облучения: диаметр облучаемой поверхности 70.0 мм; расстояние от торца волокна до поверхности питательной среды – 100.0 мм; плотность мощности 52 мВт/см² ($\lambda = 662, 635$ нм); плотность мощности 106 мВт/см² ($\lambda = 532$ нм). Плотность энергии увеличивали постепенно с шагом в 1 Дж/см², летальную дозу простейших контролировали, измеряя динамику движения объектов при помощи ПО “МультиМедиа Каталог” (MMCSoft, Россия).

Методами ФМ и КСЛМ анализировали не менее 20 клеток в каждой постановке опытов. Было выполнено не менее 10 повторов для каждой экспериментальной группы. Отмечали высокую воспроизводимость результатов в соответствии с описанной методикой. Стандартизации исследований способствовали: соблюдение и контроль условий культивирования, соблюдение методики проведения исследования, особенно в части работы с препаратами, контроль параметров облучения, подбор фильтров и длин волн для оценки флуоресценции методами микроскопии в соответствии с исследуемыми ФС.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью лизотрекера в клетках инфузорий *P. caudatum* обнаруживаются округлые равномерно флуоресцирующие тельца диаметром 7–10 мкм (рис. 1а). В клетках амёб *A. proteus* выявляются многочисленные округлые вакуоли диаметром 5–12 мкм, равномерно флуоресцирующие зеленым цветом, флуоресцирующие зеленым цветом по периферии и красным в центре, или же окрашенные

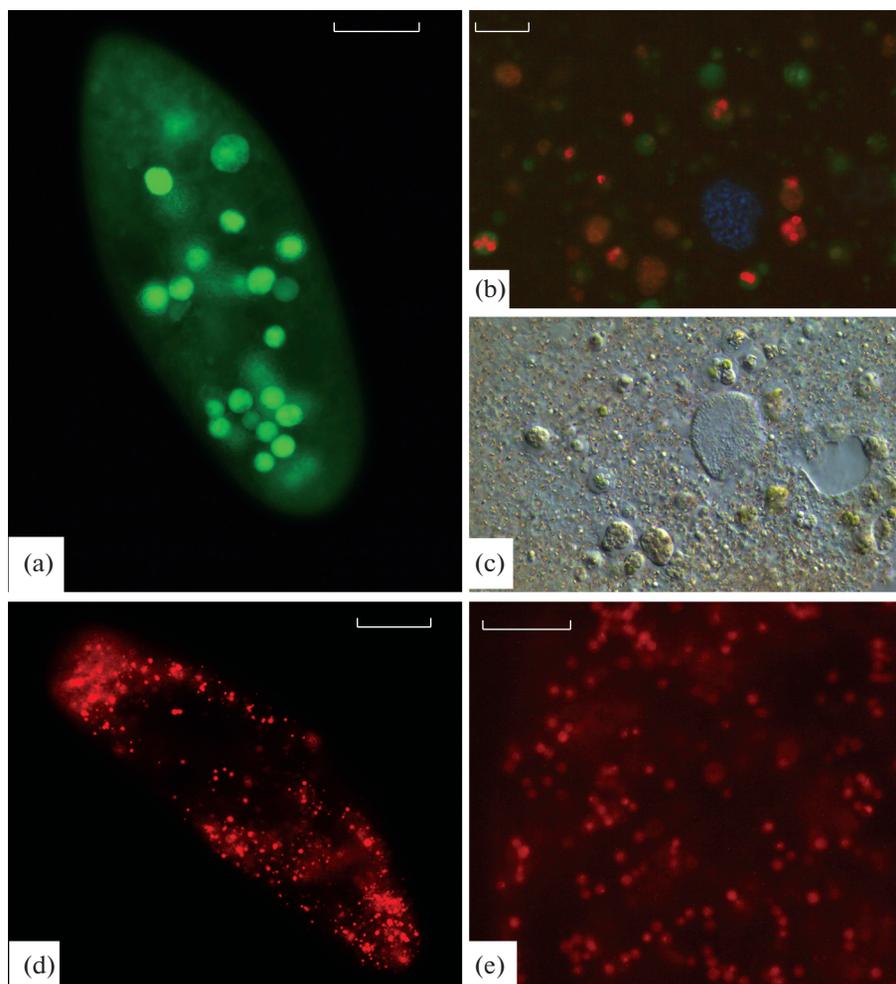


Рис. 1. Флуоресцентная микроскопия протистов *in vivo*, с лизотрекерами: *P. caudatum* (a), *A. proteus* (b), тот же участок клетки амебы методом ДИК (c); с митотрекером: *P. caudatum* (d), *A. proteus* (e). Масштабные линейки a, d – 30 мкм, b, c, e – 20 мкм.

в бурые тона (рис. 1b). Сопоставление результатов флуоресцентной и дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (ДИК) позволяет предположить, что вакуоли содержат одно-клеточные зеленые водоросли на разных стадиях переваривания, красная и бурая окраска обусловлены автофлуоресценцией хлорофилла (рис. 1b,c). При окраске митотрекером в цитоплазме инфузорий и амеб обнаруживаются многочисленные округлые тельца диаметром 1–1.5 мкм (рис. 1d,e).

Особенности накопления ФС в клетках *P. caudatum* и *A. proteus* оценивали, основываясь на сопоставлении данных, полученных в экспериментах, и результатов окрашивания инфузорий и амеб мито-лизотрекерами. Характер аккумуляции ФС в клетках инфузорий исследовали как на прижизненных, так и на фиксированных препаратах, с использованием как ФМ, так и КСЛМ. На рис. 2 показаны результаты ФМ, демонстрирующие накопление БР и КПФ в клетках *P. caudatum*. Суще-

ственным отличием между рис. 2a, 2c и рис. 2b, 2d является то, что первые фото – живые клетки, а вторые – фиксированные. У живых инфузорий, обработанных БР, флуоресценция визуализируется преимущественно в пищевых вакуолях, отмечается отсутствие препарата в ядерном аппарате (макро- и микронуклеус) – отрицательная генотоксичность (рис. 2a). Кроме того, на препаратах видны многочисленные флуоресцирующие тельца диаметром 1–1.5 мкм, сходные с теми, которые выявлялись у инфузорий с помощью митотрекера (рис. 2a (вклейка)). Флуоресценция фиксированной клетки более интенсивная, отмечается более равномерное распределение БР в клетке, визуализируются мембрана и реснички (рис. 2b). КПФ при ФМ живых клеток удавалось визуализировать только в эндосомах, не зафиксировано его накопление в цитоплазме в концентрации с отсутствием цитотоксичности (рис. 2c). У фиксированных кле-

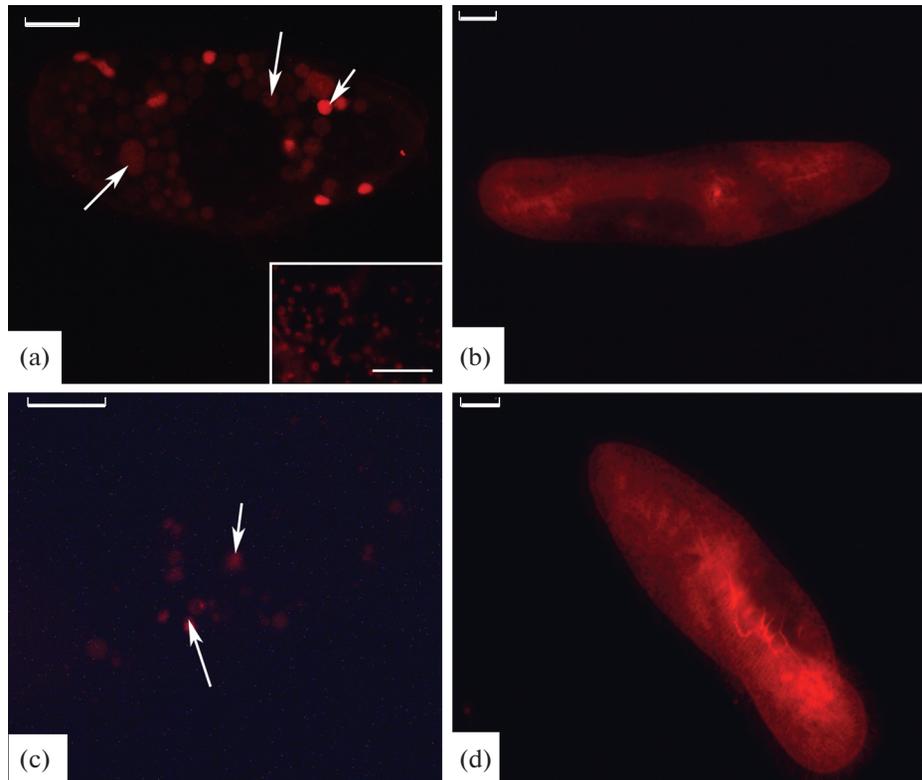


Рис. 2. Сравнение флуоресцентной микроскопии живых и фиксированных клеток *P. caudatum* после инкубации с бенгальским розовым и копропорфирином (30 мин): живая клетка с БР (а); фиксированная клетка с БР (b); живая клетка с КПФ (с); фиксированная клетка с КПФ (d). Стрелки – пищевые вакуоли. Масштабные линейки: а, с – 20 мкм (вклейка 10 мкм); b, d – 20 мкм.

ток наблюдалась довольно равномерная флуоресценция по всему объему клетки (рис. 2d).

При ФМ инфузорий, инкубированных с РДХ, отмечается интенсивная флуоресценция, которая не позволяет визуализировать внутриклеточное распределение препарата.

С использованием КЛСМ в фиксированных клетках инфузорий БР определяется в цитоплазме, трихоцистах (рис. 3а–с). Очевидно, происходит накопление БР в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), однако на фоне интенсивной окраски этого компартмента дифференцировать другие органеллы, аккумулирующие препарат, не удается. Окрашивание в области расположения макронуклеуса также можно объяснить концентрацией препарата в ЭПР, а также общим избыточным накоплением БР в фиксированных клетках, поскольку на прижизненных препаратах флуоресценции в области ядра не наблюдалось. РДХ накапливается на наружной мембране, кортексе, визуализируются реснички, что объясняет интенсивное свечение клеток при исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа. С помощью КСЛМ удастся продемонстрировать, что в клетке РДХ аккумулируется преимущественно в митохондриях, а также, по-видимому, в пищеварительных вакуолях (рис. 3d–е).

Несмотря на разницу во внутриклеточном распределении БР и РДХ, лазерное облучение соответствующими длинами волн с плотностью энергии 10 Дж/см² приводило к 100% гибели клеток инфузорий. КПФ требовал более высокой плотности энергии для достижения эффекта – 15 Дж/см².

Исследование особенностей аккумуляции ФС у амёб методом КСЛМ показало, что БР и РДХ накапливаются преимущественно в митохондриях и пищеварительных вакуолях (рис. 4а–d). КПФ является исключительно в пищеварительных вакуолях; свечение в красной области спектра, по всей видимости, обусловлено автофлуоресценцией хлорофилла фагоцитированных одноклеточных водорослей (рис. 4е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химико-физические свойства препаратов, такие как растворимость (гидрофильность, гидрофобность, амфифильность), заряд, определяют взаимодействия с мембранами и органеллами, а следовательно, и особенности внутриклеточного распределения ФС [4, 17]. Присутствие ФС внутри клеток в функционально-активных органеллах яв-

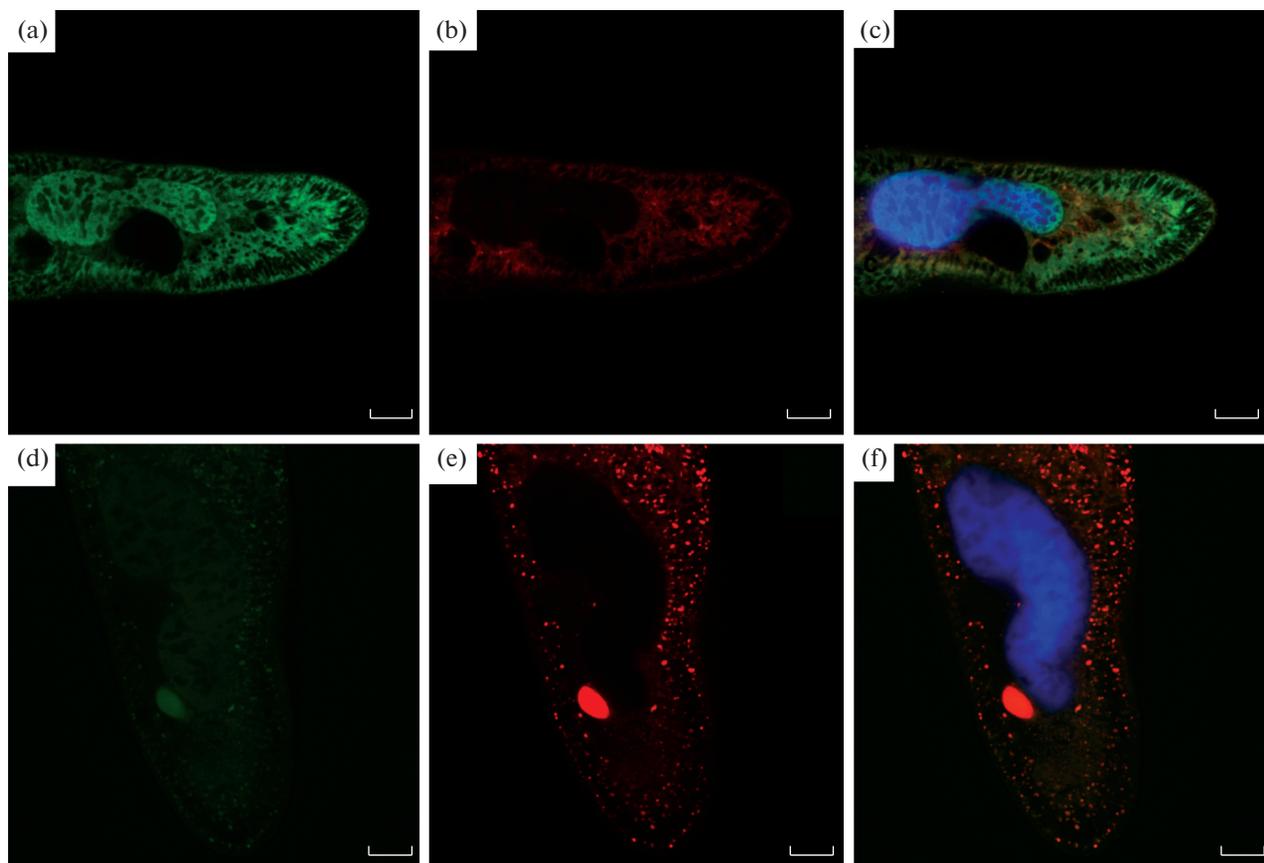


Рис. 3. КСЛМ исследование накопления водных растворов ФС в клетках *P. caudatum* после инкубации в течение 30 мин. а – БР (488 нм); б – БР (660 нм); в – БР совмещенное изображение +ДАПИ; д – РДХ (488 нм); е – РДХ (660 нм); ф – РДХ совмещенное изображение +ДАПИ. Масштабные линейки 10 мкм.

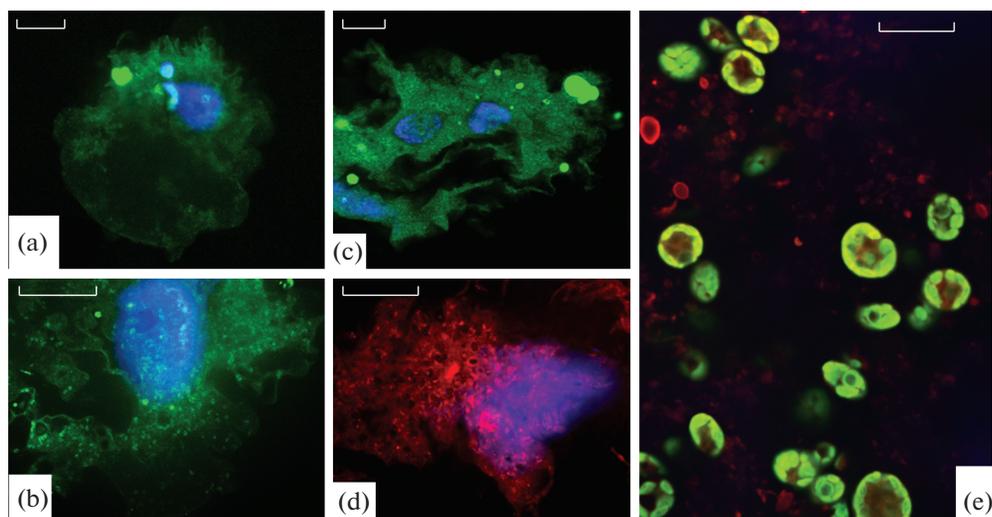


Рис. 4. Оценка накопления ФС различного химического строения в *A. proteus*: бенгальский розовый (а, б); радахлорин (с, д), копропорфирин (е). Масштаб фото: а – д 20 мкм, е – 10 мкм.

ляется критичным для развития как некроза, так и апоптоза после ФДТ, при этом отмечено, что наилучшие результаты наблюдаются при использовании ФС, локализующихся в митохондриях [4].

Согласно полученным нами данным, все три исследованных ФС – КПФ, БР и РДХ в клетках инфузорий и амёб выявляются в пищеварительных вакуолях. Сравнительный анализ результатов ФМ

и КЛСМ позволяет заключить, что у обоих исследованных видов одноклеточных РДХ и БР также аккумулируются в митохондриях. БР, по крайней мере у парамеций, выявляется в ЭПР. Следует отметить, что после инкубации инфузорий с КПФ фотодинамический эффект наблюдался при использовании лазерного излучения с большей плотностью энергии, по сравнению с клетками, проинкубированными с РДХ и БР, что согласуется с полученными нами данными об особенностях аккумуляции исследованных ФС у протистов. Сходные данные об эффективности использования различных ФС для ФДТ были получены и при изучении фотодинамического повреждения сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс при сравнении РДХ и КПФ. Снижение кожного кровотока и структурно-морфологические изменения при одинаковой дозе облучения – 50 Дж/см², при использовании РДХ в качестве ФС, в сравнении с КПФ были значительно более выражены [18]. В работе на сосудах брыжейки крыс также была продемонстрирована сравнительно меньшая эффективность фотодинамического эффекта КПФ в сравнении с РДХ и БР [19].

Полученные нами результаты хорошо согласуются с имеющимися литературными данными о характере накопления ФС у различных линий культур клеток млекопитающих. В экспериментах с клетками гепатомы мыши было показано, что облучение после обработки БР вызывает выделение лизосомальных ферментов, что приводит к разрушению клетки [20]. Также было отмечено, что в клетках мышечных фибробластов NIH 3T3 БР накапливается в цитоплазме, правда, авторы не конкретизировали, в каких именно клеточных компартментах [21]. Позднее было показано, что обработка БР клеток HeLa вызывает изменения ферментативной активности митохондрий и лизосом, а также нарушения в структуре митохондрий [22]. РДХ, по литературным данным, в клетках аккумулируется преимущественно в митохондриях, лизосомах и ЭПР [23, 24]. Инфузорий (*P. primaurelia*) ранее использовали в качестве модельного объекта для изучения воздействия облучения разными длинами волн на физиологический статус клетки [25]. Эксперименты по определению характера аккумуляции различных ФС в клетках протистов ранее не проводились, за исключением одной работы, посвященной изучению особенностей проникновения БР в клетки инфузорий *P. aurelia* [26]. Было показано, что этот ФС накапливается на плазматической мембране клетки, также была отмечена слабая флуоресценция цитоплазмы. Нужно, однако, отметить, что в данной работе авторы высушивали клетки на стекле без предварительной фиксации, что могло повлиять на полученный результат.

Таким образом, инфузории *Paramecium caudatum* и амобы *Amoeba proteus* демонстрируют сходное

с млекопитающими внутриклеточное распределение ФС, что, по нашему мнению, свидетельствует о наличии общих механизмов проникновения и аккумуляции исследованных веществ в клетках организмов, далеко отстоящих друг от друга на филогенетическом древе. Мы полагаем, что изученные в настоящей работе виды одноклеточных эукариот могут быть использованы в качестве модельных объектов на первых этапах доклинических исследований веществ – потенциальных ФС. При изучении характера аккумуляции ФС в клетках мы рекомендуем, по возможности, совмещать прижизненные наблюдения с изучением фиксированных клеток с использованием КЛСМ. С помощью КСЛМ удастся более детально охарактеризовать особенности накопления ФС в клетках протистов. При использовании метода ФМ для изучения особенностей накопления и распределения ФС предпочтительно проводить наблюдения на живых клетках. Это позволяет минимизировать избыточное окрашивание цитоплазмы и, в результате, более качественно визуализировать органеллы, в которых происходит избирательное накопление препарата. Возникновение артефактов при фиксации клеток происходит вследствие неспецифического проникновения ФС в клеточные компартменты. Однако в совокупности данные методы позволяют минимизировать влияние артефактов на результат анализа полученных изображений и наиболее детально охарактеризовать распределение ФС в клетках.

БЛАГОДАРНОСТИ

Инфузории *Paramecium caudatum* (клон 39-9) были получены из Коллекции культур ресурсного центра “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет госбюджета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Н.П. – идея работы, научное консультирование; Л.В.Ч. – планирование эксперимента, сбор и обработка данных, культивирование простейших; Д.Р.Ф. – сбор данных; С.В.Ш. – выполнение КСЛМ, обработка результатов; написание и редактирование манускрипта – все авторы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carrasco-Pujante J, Bringas C, Malaina I, Fedetz M, Martínez L, Pérez-Yarza G, Dolores Boyano M, Berdieva M, Goodkov A, López JI, Knafo S, De la Fuente IM (2021) Associative Conditioning Is a Robust Systemic Behavior in Unicellular Organisms: An Interspecies Comparison. *Front Microbiol* 12: 707086. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707086>
2. Petrishchev NN, Papayan GV, Chistyakova LV, Struy AV, Faizullina DR (2018) Effect of Photobiomodulation by Red and Infrared Laser Radiation on Motility of *Paramecium caudatum*. *J Evol Biochem Physiol* 54: 457–464. <https://doi.org/10.1134/s0022093018060054>
3. Herman P, Kiss A, Fábrián I, Kalmár J, Nagy G (2021) In situ remediation efficacy of hybrid aerogel adsorbent in model aquatic culture of *Paramecium caudatum* exposed to Hg(II). *Chemosphere* 275: 130019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130019>
4. Benov L (2015) Photodynamic therapy: current status and future directions *Med Princ Pract* 24: 14–28. <http://dx.doi.org/10.1159%2F000362416>
5. Nonell S, Flors C (2016) Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences. Royal Society of Chemistry. Cambridge. England.
6. Ogilby PR (2010) Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* 39: 3181–3209. <https://doi.org/10.1039/b926014p>
7. Sztandera K, Gorzkiewicz M, Wang X, Boye S, Appelhans D, Klajnert-Maculewicz B (2022) pH-stable polymerosome as nanocarrier for post-loaded rose bengal in photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 217: 112662. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112662>
8. Krechetov SP, Miroshkina AM, Yakovtseva MN, Mochalova EN, Babenyshev AV, Maslov IV, Loshkarev AA, Krasnyuk II (2021) Radachlorin-Containing Microparticles for Photodynamic Therapy. *Adv Pharm Bull* 11:458–468. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.053>
9. Sonneborn TM (1970) Methods in paramecium research. In *Methods of Cell Physiology*. Academic Press Inc., New York 4: 241–339.
10. Prescott DM, Carrier R (1964). Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: *Methods in cell biology* New York, London. Acad Press. 1: 85–95.
11. Mirzaei H, Djavid GE, Hadizadeh M, Jahanshahi-Moghadam M, Hajian P (2015) The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells. *J Photochem Photobiol B Biol* 142: 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.007>
12. Vargas F, Díaz Y, Yartsev V, Marcano A, Lappa A (2004) Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media Propiedades fotofísicas del nuevo fotosensibilizador Radaclorin en diferentes medios. *Sci J Exp Fac Sci* 12: 70–77.
13. Bagrov IV, Belousova IM, Gorelov SI, Dobrun MV, Kiselev VM, Kislyakov IM, Kris'ko AV, Kris'ko TK (2017) A comparative study of the processes of generation of singlet oxygen upon irradiation of aqueous preparations on the basis of chlorin e6 and coproporphyrin III. *Opt Spectrosc* 122: 163–167. <https://doi.org/10.1134/S0030400X17020060>
14. Murav'eva TD, Dadeko AV, Kiselev VM, Kris'ko TK, Kislyakov IM, Kris'ko AV, Starodubtsev AM, Bagrov IV, Belousova IM, Ponomarev G V (2018) Comparative study of the photophysical properties of low-toxicity photosensitizers based on endogenous porphyrins. *J Opt Technol* 85: 709–721. <https://doi.org/10.1364/JOT.85.000709>
15. Redmond RW, Gamlin JN (1999) A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem Photobiol* 70: 391–475.
16. Chang CC, Yang YT, Yang JC, Wu H Da, Tsai T (2008) Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dye Pigment* 79: 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.02.003>
17. Panzarini E, Inguscio V, Dini L (2011) Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy. *Int J Photoenergy* 2011: 11. <https://doi.org/10.1155/2011/713726>
18. Файзуллина ДР, Сухорукова ЕГ, Юкина ГЮ, Петрищев НН, Корнева ЕА (2020) Изменения микроциркуляции и структурных компонентов кожи при фотодинамическом воздействии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция 19 (1): 73–81. [Faizullina DR, Sukhorukova EG, Yukina GYu, Petrishchev NN, Korneva EA. (2020) Changes in microcirculation and structural components of the skin under photodynamic effects. Regional blood circulation and microcirculation 19 (1): 73–81. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81>
19. Гришачева ТГ, Белик АГ, Цыганенко ВН, Струй АВ, Михайлова ИА, Петрищев НН (2018) Фотореактивность сосудов микроциркуляторного русла. Рос физиол журн им ИМ Сеченова. 104 (2): 174–183. [Grishacheva TG, Belik AG, Tsyganenko VN, Struy AV, Mikhailova IA, Petrishchev NN (2018) Photoreactivity of mesenteric microvessels. *Russ J Physiol* 104 (2): 174–183.]
20. Wachter E, Dees C, Harkins J, Fisher W, Scott T (2002) Functional Imaging of Photosensitizers using Multiphoton Microscopy. In: *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences II* 4620: 143–147. <https://doi.org/10.1117/12.470688>
21. Theodossiou T, Hotherhall JS, Woods EA, Okkenhaug K, Jacobson J, MacRobert AJ (2003). Firefly luciferin-activated rose bengal: in vitro photodynamic therapy by intracellular chemiluminescence in transgenic NIH 3T3 cells. *Cancer Res* 63 (8): 1818–1821.
22. Panzarini E, Tenuzzo B, Palazzo F, Chionna A, Dini L (2006) Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *J Photochem Photobiol B Biol* 83: 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.11.014>
23. Biswas R, Moon JH, Ahn JC (2014) Chlorin e6 derivative radachlorin mainly accumulates in mitochondria, lysosome and endoplasmic reticulum and shows high affinity toward tumors in nude mice in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 90: 1108–1118. <https://doi.org/10.1111/php.12273>

24. Zhikhoreva AA, Belashov AV, Belyaeva TN, Salova AV, Litvinov IK, Semenova LV, Vasyutinskii OS (2022) Comparative analysis of radachlorin accumulation, localization and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescent microscopy Photodiagnosis Photodyn Therapy 39: 102973. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102973>
25. Amaroli A, Ravera S, Parker S, Panfoli I, Benedicenti A, Benedicenti S (2015) The protozoan, *Paramecium primaurelia*, as a non-sentient model to test laser light irradiation: the effects of an 808nm infrared laser diode on cellular respiration. Alternatives to Laboratory Animals 43 (3): 155–162. <https://doi.org/10.1177/026119291504300305>
26. Croce AC, Wyroba E, Bottioli G (1992) Distribution and retention of rose bengal and disulphonated aluminium phthalocyanine: a comparative study in unicellular eukaryote. J. Photochem Photobiol 16 (3–4): 318–330. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)80019-R](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)80019-R)

A Comparative Analysis of the Distribution of Different Photosensitizers in *Paramecium caudatum* and *Amoeba proteus*

L. V. Chistyakova^a, D. R. Faizullina^b, S. V. Shmakov^c and , and N. N. Petrishchev^{b,#}

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

^b Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

^c Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science,
St. Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: lasmed@yandex.ru

The accumulation patterns of different photosensitizers (PSs) (radachlorin, bengal rose, coproporphyrin) in ciliated infusoria *Paramecium caudatum* and amoebae *Amoeba proteus* were evaluated by the results of intravital observations and on the fixed material, using the methods of fluorescent and confocal scanning laser microscopy. It was found that the above single-celled eukaryotic organisms share similar intracellular distribution patterns of different PSs with mammalian cells and thus can be used as model objects at the initial stages of preclinical studies of various substances, potential PSs. Some methodological recommendations for the identification of intracellular compartments, where PSs selectively accumulate, are proposed.

Keywords: protists, photosensitizer, infusoria, amoebae, photodynamic therapy, fluorescent microscopy, confocal scanning laser microscopy

ГЕМОЦИТЫ АВСТРАЛИЙСКОГО КРАСНОКЛЕШНЕВОГО РАКА (*CHERAX QUADRICARINATUS*): МОРФОЛОГИЯ И ГЕМОГРАММА

© 2022 г. Д. Н. Скафарь^{1,*}, Д. В. Шумейко¹

¹ Кубанский государственный университет,
Краснодар, Россия

*e-mail: skafden@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.2022 г.

После доработки 08.09.2022 г.

Принята к публикации 14.09.2022 г.

Целью настоящей работы было проведение морфологического анализа гемоцитов, нахождение общего числа гемоцитов и процентной доли каждого типа гемоцитов австралийского красноклещевого рака (*Cherax quadricarinatus*). Изучали гемоциты в нативной, обработанной антикоагулянтом и окрашенной по Май-Грюнвальду и Романовскому гемолимфе. Гемолимфу отбирали шприцом из вентрального синуса. Микроскопию проводили при увеличении объектива 40× или 100×. Подсчет гемоцитов и определение процентной доли каждого типа производили в камере Горяева. Выделено три основных типа гемоцитов, а также обнаружены клетки, морфологически отличающиеся от первых трех, они названы прозрачными клетками. Агранулоциты (гиалиноциты) – клетки овальной или веретенообразной формы, длиной и шириной порядка 26.6 и 9.2 мкм. У них отсутствуют гранулы, однако иногда можно обнаружить малое число размером менее 0.5 мкм. Этот тип клеток способен дольше других оставаться на предметном стекле после извлечения. Полуагранулоциты – клетки овальной или веретенообразной формы, длиной и шириной 26.7 и 9.3 мкм, с умеренно развитыми небольшими гранулами размером менее 0.5 мкм и редко встречающимися средними гранулами размером от 0.77 до 1.69 мкм. Гранулоциты – клетки овальной формы, наиболее крупные из всех типов с длиной и шириной 28.7 и 11.1 мкм. Имеют крупные (0.8–2.48 мкм) обильно развитые гранулы и высокое лучепреломление, ввиду чего этот тип клеток хорошо определим под микроскопом. У них наблюдается наименьшее по сравнению с первыми двумя типами ядерно-цитоплазматическое отношение. Прозрачные клетки – особенностью данного типа клеток являются обильно развитые псевдоподии. Среднее значение диаметра клетки после ее округления составляет 10.7 ± 1.11 мкм. Клетки этого типа начинают проявляться через 10 мин после извлечения в необработанной антикоагулянтом гемолимфе. Доминирующим типом в гемолимфе являются агранулоциты, их доля составляет $48.3 \pm 11.4\%$. На долю полуагранулоцитов и гранулоцитов приходится $26.3 \pm 7.8\%$ и $25.2 \pm 6.9\%$ соответственно. Общее число гемоцитов колеблется в широком диапазоне от 820 до 5510 шт./мкл, среднее количество клеток составляет 2707 ± 1096 шт./мкл. Средняя доля прозрачных клеток составила $18.2 \pm 3.8\%$.

Ключевые слова: австралийский красноклещевый рак, *Cherax quadricarinatus*, гемолимфа, гемоциты, агранулоциты, полуагранулоциты, гранулоциты, прозрачные клетки, общее число гемоцитов, гемограмма

Принятые сокращения: ГЦ – гемоциты, ГЦ I – агранулоциты, ГЦ II – полуагранулоциты, ГЦ III – гранулоциты, ГЦ IV – прозрачные клетки

DOI: 10.31857/S0044452922060109

Кровь ракообразных представлена гемолимфой, клеточной частью которой являются гемоциты. Как правило, у декапод (Decapoda) выделяют три типа гемоцитов: агранулоциты (гиалиноциты), полуагранулоциты (гранулоциты с малыми гранулами) и гранулоциты [1–4], некоторые исследователи выделяют у речных раков видов *Astacus astacus* и *Pontastacus leptodactylus* четвертый тип гемоцитов – прозрачные клетки [5–7], а Roulston [8] выделил у морского краба *Hyas araneus*, помимо основных трех типов гемоцитов, еще и прогемоциты. В по-

следние несколько десятилетий происходит интенсивное изучение гемоцитов представителей семейства Decapoda. Для ряда ракообразных, являющихся объектами аквакультуры и промысла, даны классификация и характеристика как по морфологическим и цитохимическим показателям, так и по молекулярным особенностям гемоцитов, определены общее число гемоцитов и процентная доля каждого типа клеток в гемолимфе [8–22]. Полученные результаты позволяют без затруднений классифицировать клетки крови этих гидробион-

тов. При этом для некоторых видов существуют различные точки зрения по поводу классификации гемоцитов; так, Nose и соавт. [13] выделил три типа гемоцитов у *Homarus americanus*, в то время как Battison и соавт. [23] в своей работе выделяет одиннадцать типов, большая часть которых являются не отдельными клеточными линиями, а гемоцитами разных стадий развития. У перспективного объекта аквакультуры, австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868)) [24–26], гемоциты являются относительно хорошо изученными. На этом организме экспериментально подтверждена концепция, по которой различные типы гемоцитов происходят не от различных клеточных линий, как считалось ранее, а представляют собой гемоциты разных стадий развития [27]. Исходя из нее, предшественниками гранулоцитов являются полугранулоциты, при этом агранулоциты (гиалиноциты) считаются прогемоцитами, высвободившимися из гемопоэтической ткани. Также у *C. quadricarinatus* изучены иммунные функции гемоцитов [28, 29] и их молекулярные особенности [27, 29–31], проведены исследования популяций гемоцитов с помощью проточной цитометрии и с использованием флуоресцентных маркеров [27, 32]. Но при этом отсутствует подробная морфологическая характеристика гемоцитов, так, например, отсутствуют данные о ядерно-цитоплазматическом отношении и размерах гранул различных типов клеток. Среди прочего остается открытым вопрос о количестве типов гемоцитов. Так, в ряде вышеперечисленных работ авторы выделяют только три основных типа, однако Лагуткина и соавт. [33] выделяют в гемолимфе австралийского красноклешневого рака еще и прозрачные клетки, которые предположительно являются прогемоцитом или рано высвободившимися из гемопоэтической ткани гемоцитами. Это не единственная работа, в которой авторы выделили в гемолимфе помимо основных типов клеток еще и дополнительные; так, Wentao и соавт. [34] обнаружили с помощью иммуноцитохимии клетки CD34+, которые, возможно, являются подобными стволовым, полученными из недифференцированной гемопоэтической ткани. Предполагается, что эти клетки могут расти и дифференцироваться в зрелые гемоциты будучи циркулирующими в кровеносной системе. В работе по изучению гемоцитов, пораженных внутриклеточными микроорганизмами [35], были обнаружены инфицированные стволовые клетки кроветворной ткани, некоторые из которых по предположению авторов высвобождались в кровоток. Помимо этого, актуальной задачей является нахождение общего числа гемоцитов (ОЧГ) и процентной доли каждого типа гемоцитов, так как в различных источниках уровень ОЧГ и доля различных типов клеток австралийского красноклешневого рака имеют различные значения [29, 32, 33, 36, 37]. ОЧГ и процентная доля каждого типа гемоци-

тов являются важными показателями физиологического состояния ракообразных. Описанное выше создает необходимость проведения исследований с целью получения информации о морфологических особенностях каждого типа гемоцитов, их процентной доли и общем числе. Это расширит возможности более точного определения типов клеток при работе с гемолимфой рака как для научно-исследовательских целей, так и для прижизненного мониторинга физиологического состояния ракообразного в условиях рыбоводческих предприятий [3, 5, 7, 14, 38].

Целью настоящей работы было проведение морфологического анализа гемоцитов, нахождение ОЧГ и процентной доли каждого типа гемоцитов австралийского красноклешневого рака (*Cherax quadricarinatus*).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили в лаборатории перспективных технологий в аквакультуре на базе бизнес-инкубатора ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет».

Содержание животных. Раков содержали в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ), включающих в себя бассейны объемом 2.5 м³ и площадью 3.14 м² каждый при температуре воды 20–28° С. В УЗВ были размещены укрытия из ПВХ труб для снижения внутривидовой агрессии. В зависимости от массы, особи содержались раздельно при плотностях посадки от 6 до 20 особей/м². Кормление осуществляли ежедневно кормом Coppens Start Premium 1.5 мм (Нидерланды) (белок – 54%, жиры – 15%, зола – 10.4%, фосфор – 1.59%), суточная норма составляла 3% от биомассы ракообразных. Фотопериод составлял 12/12 ч (день/ночь). Концентрация кислорода в воде составляла 5 мг/л, pH 7.9.

Исследование состояло из нескольких частей. В первой изучали гемоциты в обработанной антикоагулянтом гемолимфе, когда они имели веретенообразную или овальную форму. В качестве антикоагулянта использовали 4%-ный раствор Трилона-Б (ЭДТА-Na₂) (BASF, Китай), так как по нашим наблюдениям этот антикоагулянт предотвращает быстрый распад и округление клеток, а также образование скоплений из них. Шприц заполняли антикоагулянтом в соотношении 1:1 к планируемому объему изымаемой гемолимфы. Во второй части исследовали гемоциты в нативной гемолимфе — определяли диаметр округлившихся клеток. В третьей части работы исследовали мазки, окрашенные по Май-Грюнвальду и Романовскому. Определяли ОЧГ и процентную долю каждого типа гемоцитов.

Окрашивание по Май-Грюнвальду. Для окраски по Май-Грюнвальду в краситель-фиксатор (Минимед, Россия), разведенный 1:3 в фосфатном буфе-

ре с рН 6.4 ± 0.2 (Минимед, Россия), помещали на 5 мин высушенные мазки, с последующей отмывкой буфером и высушиванием.

Окрашивание по Романовскому. При окраске по Романовскому в краситель (Минимед, Россия), разведенный в фосфатном буфере с рН 6.4 ± 0.2 в соотношении 1:24, помещали высушенные мазки на 2 мин, затем раствор разбавляли 1:1 фосфатным буфером и окрашивали еще 10 мин с последующей отмывкой буфером и высушиванием.

Отбор гемолимфы. Гемолимфу отбирали из вентрального синуса шприцом объемом 2 мл с иглой 23G с учетом норм санитарии. Такой способ позволяет прижизненно отбирать кровь, не нанося здоровью раков значительный ущерб [3].

Микроскопия и измерение гемоцитов. Микроскопию гемоцитов проводили на световом микроскопе Микромед-1 (Микромед, Россия) при увеличении объектива $40\times$ или $100\times$ с масляной иммерсией. Для морфометрических измерений использовали камеру UCMOS08000KPB (TourCam, Китай) с разрешением 3264×2448 пикселей и программное обеспечение TourView 3.7 (TourTek Photonics, Китай). Находили длину и ширину клетки и ядра у гемоцитов в нативном состоянии (имеющих овальную и веретеновидную формы), а также вычисляли ядерное-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Для этого произведения длины и ширины ядра и клетки использовали вместо площади этих структур, для последующего расчета ЯЦО по формуле: $\text{ЯЦО} = \text{Ся}/\text{Скл}$, где Ся – площадь ядра клетки; Скл – площадь клетки. В одном окрашенном образце гемолимфы исследовали гемоциты из 10–15 полей зрения. Для исследования гемолимфы, обработанной антикоагулянтом, проводили по 10 измерений гемоцитов каждого типа в одном образце гемолимфы, всего было проанализировано 10 образцов гемолимфы из 10 особей различной массы обоих полов.

Определение общего числа гемоцитов и их дифференцированный подсчет. Определение ОЧГ проводили на 138 разнополых раках массой от 8 до 100 г (40.4 ± 23.6 г). Установление процентной доли каждого типа гемоцитов проводили на 50 раках обоих полов (25 самок и 25 самцов) массой 56.5 ± 18.4 г, у них также определяли ОЧГ. Подсчет гемоцитов и определение процентной доли каждого типа производили в камере Горяева. Для подсчета общего числа гемоцитов (ОЧГ) применяли следующую формулу: $\text{ОЧГ в 1 мкл} = N \times 5$, где N – число всех гемоцитов в 50 больших квадратах на сетке камеры.

Статистическая обработка данных. Расчеты полученных данных производили с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и Statistica 14 (TIBCO Software Inc.). Вычисляли такие показатели, как среднее значение (μ), среднеквадратичное отклонение (σ). Для проверки

статистической достоверности различий использовали U-критерий Манна–Уитни и критерий Краскела–Уоллиса. Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$. Для обнаружения корреляционных связей использовали коэффициент корреляции Спирмена, корреляция считалась статистически достоверной при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основанием для классификации гемоцитов стали наличие и размер гранул в цитоплазме клеток, размеры клеток и ядра, их форма. Нами было выделено в гемолимфе *Cherax quadricarinatus* три основных типа гемоцитов: агранулоциты (гиалиноциты), полугранулоциты (гранулоциты с малыми гранулами), гранулоциты, а также были обнаружены клетки, морфологически отличающиеся от первых трех. Упоминание о них имеется в ряде работ [5–7], где они названы прозрачными клетками.

Все гемоциты сразу же после изъятия при отсутствии антикоагулянта начинают из нативной формы превращаться в округлые образования. Через 5–7 мин клетки начинают разрушаться. Спустя 30–40 мин после изъятия гранулоциты и полугранулоциты разрушаются, однако их учет и типизация возможны по выброшенным гранулам. Данные по морфологическим характеристикам гемоцитов представлены в табл. 1.

Размерные характеристики клеток могут варьировать в широком диапазоне и зависеть от того, как долго они находятся на стекле, какой антикоагулянт и в каком соотношении и концентрации используется, исходя из этого наиболее надежным критерием при классификации гемоцитов являются наличие и размер гранул.

Агранулоциты (гиалиноциты) (ГЦ I) (рис. 1a, 2d). Клетки овальной или веретенообразной формы, длиной и шириной порядка 25.2 и 8.5 мкм соответственно. Длина и ширина клеток колеблются в диапазоне 18.5–34.5 и 6.2–11.3 мкм соответственно, ЯЦО 9.7–44.6%. У агранулоцитов отсутствуют гранулы, однако иногда можно обнаружить малое число размером порядка 0.5 мкм и менее. После изъятия округляются в течение одной минуты (рис. 1a2). Этот тип клеток способен дольше других оставаться на предметном стекле после извлечения. При окрашивании по Романовскому ядра клеток окрашиваются в темно-фиолетовый цвет (рис. 2d). Окрашивание по Май-Грюнвальду (рис. 1a3) дает более светлое окрашивание ядра по сравнению с окраской по Романовскому (рис. 2d).

Полугранулоциты (гранулоциты с малыми гранулами) (ГЦ II) (рис. 1b, 2c). Клетки овальной или веретенообразной формы, длиной и шириной 26.6 и 9.2 мкм соответственно, с умеренно развитыми небольшими гранулами, варьирующих в широком

Таблица 1. Цитологические характеристики гемоцитов *C. quadricarinatus*

Показатели	Типы клеток		
	агранулоциты	полугранулоциты	гранулоциты
Форма клеток	овальная, веретенообразная	овальная, веретенообразная	овальная
Гранулы	отсутствуют или в небольшом количестве, мелкие менее 0.5 мкм	небольшого размера, умеренно развитые 0.5 мкм, реже встречаются среднего размера 1.05 ± 0.243 мкм	крупные, обильно развиты 1.4 ± 0.5 мкм
Ядро (расположение в клетке, форма)	центральное, овальное	центральное, овальное	центральное или эксцентричное, овальное, круглое или почкообразное
Длина клетки, мкм	25.2 ± 3.2	26.6 ± 4.5	28.8 ± 3.8
Ширина клетки, мкм	8.5 ± 1.0	9.2 ± 1.1	11.1 ± 1.7
Диаметр клетки после округления, мкм	10.3 ± 1.2	11.2 ± 0.8	14.6 ± 1.4
ЯЦО, %	25.9 ± 8.5	22.6 ± 6.9	13.2 ± 5.3

диапазоне, от гранул по размерам сопоставимых с гранулами агранулоцитов до редко встречающихся гранул среднего размера, схожих с гранулами гранулоцитов размером от 0.77 до 1.7 мкм, при этом есть статистические различия между размером гранул у полугранулоцитов и гранулоцитов ($p < 0.05$). Длина и ширина клеток колеблются в диапазоне 18.3–39.6 и 7.3–11.9 мкм соответственно, ЯЦО 10.8–40.8%. Начинают округляться через 1–2 мин после изъятия (рис. 1b2). В окрашенных по Май-Грюнвальду мазках полугранулоциты представляют из себя клетки с небольшими гранулами и цитоплазмой фиолетового цвета (рис. 1b3). При окраске по Романовскому цитоплазма и гранулы окрашиваются в синий цвет. Полугранулоциты, являясь предшественниками гранулоцитов, имеют различия по некоторым молекулярным характеристикам, цитохимии и функциям [1, 13, 31, 39], ввиду чего есть основание выделять гранулоциты и полугранулоциты в два отдельных типа.

Гранулоциты (ГЦ III). Клетки овальной формы (рис. 1c1, 2a,b, 3a,b). Наиболее крупные из всех типов гемоцитов с длиной и шириной 28.8 и 11.1 мкм соответственно, с крупными (0.8–2.48 мкм) обильно развитыми гранулами, имеющими высокое лучепреломление, ввиду чего этот тип клеток хорошо определим под микроскопом. Размер гранул варьирует от 0.8 до 2.5 мкм. Длина и ширина клеток колеблются в диапазоне 21.3–38.6 и 7.8–15.3 мкм соответственно, ЯЦО 4.1–34.8%. У гранулоцитов наблюдается наименьшее по сравнению с первыми двумя типами ядерно-цитоплазматическое отношение. Клетки начинают округляться через 2–3 мин после изъятия. Через 5–10 мин с момента изъятия происходит разрушение клетки, после которого остаются гранулы (рис. 3c). В окрашенных по Май-Грюнвальду мазках гранулоциты пред-

ставляют из себя клетки с крупными обильно развитыми окрашенными фиолетовым цветом гранулами (рис. 1b3). При окрашивании по Романовскому ядро и гранулы окрашиваются в фиолетовый цвет, в то время как цитоплазма в светло-фиолетовый. Дифференциальное окрашивание гранулоцитов несколькими красителями может свидетельствовать о гетерогенности их гранул или гетерогенности самих гранулоцитов, как это наблюдается у гранулоцитов асцидии *Halocynthia aurantium* [40], что может быть обусловлено их несинхронностью созревания. Так, в мазках можно выделить гранулоциты с крупным ядром и малым количеством гранул по сравнению с гранулоцитами, имеющими ядра меньшего размера, но превосходящие первые по количеству гранул. Первые могут быть более молодыми формами по сравнению с последним. Наблюдаются различия в окрашивании разновозрастных гранулоцитов, ядра молодых гранулоцитов способны окрашиваться более светлыми тонами по сравнению со старшевозрастными клетками. Морфологическую гетерогенность популяции гранулоцитов также можно заметить при световой микроскопии гемолимфы. Гипотеза о гетерогенности гранулоцитов ввиду нахождения в гемолимфе разновозрастных клеток подтверждается исследованиями [27], так как созревание гранулоцитов может доходить от одного до трех месяцев, а после созревания могут жить до двух месяцев.

Проведение сравнений длины, ширины, диаметра (после округления) и ЯЦО трех типов гемоцитов дали следующий результат: различий в длинах агранулоцитов и полугранулоцитов не наблюдается ($p > 0.05$), в то время как во всех остальных случаях различия статистически достоверны ($p < 0.05$).

Прозрачные клетки (ГЦ IV) (рис. 4a). Эти гемоциты начинают проявляться через 5–10 мин после

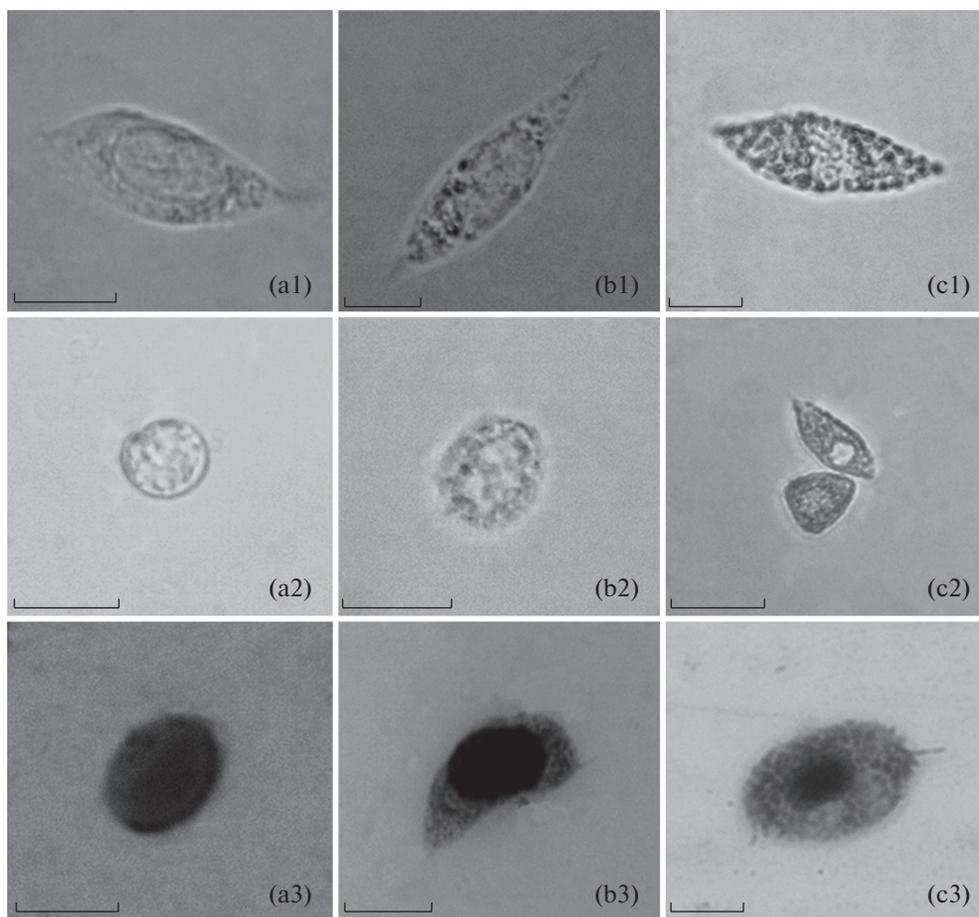


Рис. 1. Микрофотографии трех типов гранулоцитов. (a) – агранулоцит, (b) – полугранулоцит, (c) – гранулоцит. 1 – в антикоагулянте, 2 – округленный, 3 – окрашенный по Май-Грюнвальду. Размер масштабной линейки 10 мкм.

извлечения гемолимфы. Клетки овальной формы через 5–10 мин после проявления начинают округляться, среднее значение диаметра клетки после ее округления составляет 10.7 ± 1.11 мкм, что сопоставимо с диаметром агранулоцитов ($p > 0.05$) и полугранулоцитов ($p > 0.05$). Особенностью прозрачных клеток являются обильно развитые псевдоподии (рис. 4a). При микроскопировании эти клеточные структуры проглядываются тяжело, ввиду того, что являются прозрачными. Прозрачные клетки окрашивались только по Май-Грюнвальду в мазках, где использовалась нативная гемолимфа, не обработанная антикоагулянтом (рис. 4b). При окрашивании мазков по Романовскому этот тип клеток в нашем исследовании не обнаруживался.

Можно предположить, что это прикрепленный распластанный на стекле гиалиноцит, который практически не отличается по диаметру (10.3 ± 1.20 мкм), но это не объясняет проявление его только спустя некоторое время на тех участках, где они ранее отсутствовали. Возможно, проявление клеток спустя определенное количество времени

обусловлено тем, что из-за большого количества цитоплазмы они при рассмотрении под световым микроскопом просвечиваются, однако по прошествии 10 мин они начинают разрушаться, ввиду чего становятся видимыми. Этот механизм требует дополнительных исследований. Допустим, что мы могли принять характерные за прозрачные клетки, однако размерные характеристики цианоцитов [41] не соответствуют таковым. Цианоциты имеют размеры, в несколько раз превышающие размеры циркулирующих гемоцитов. Также можно предположить, что это клетки с отклонениями в дифференцировке, которые были охарактеризованы Ковачевой как не идентифицированные гемоциты [4], однако они морфологически отличаются от представленных нами.

Происхождение и функции прозрачных клеток остаются не ясны, возможно, именно этот тип клеток выделил у *Hyas araneus* Roulston и соавт. [8] и определил их как прогемоциты. Этот тип клеток может являться предшественником других гемоцитов. Этой гипотезе сопутствует тот факт, что из агранулоцитов, помеченных ^3H -тимидином,

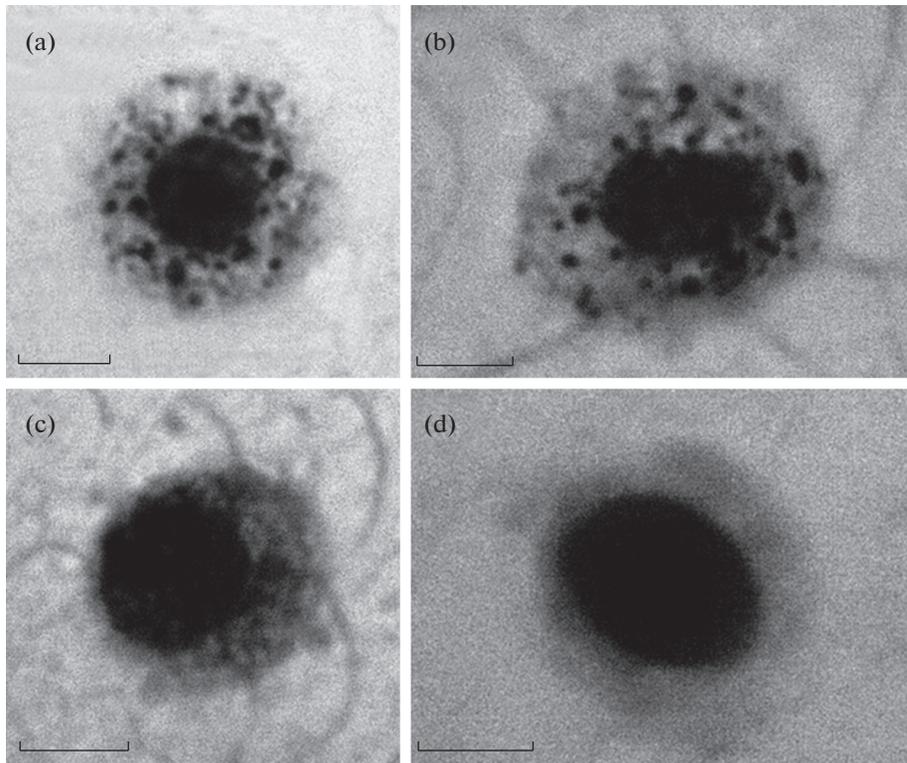


Рис. 2. Микрофотографии гемоцитов окрашенных по Романовскому. (a), (b) – гранулоциты, (c) – полугранулоцит, (d) – агранулоцит. Размер масштабной линейки 5 мкм.

не происходит образование гранулярных гемоцитов [42], как это считалось ранее [43]. Однако данные, полученные Li и соавт. [27], говорят о том, что гранулоциты развиваются из полугранулоцитов, при этом остается не до конца ясным процесс возникновения агранулярных клеток. Как было указано во введении в гемолимфе, *S. quadricarinatus* также были обнаружены прозрачные клетки или циркулирующие в гемолимфе стволовые клетки. Вентао и соавт. [34] обнаружили клетки CD34+, однако не привели данные о том, какой процент от всех гемоцитов составляют CD34+ клетки. Ромеро и соавт. [35] вместе с гемоцитами, пораженными внутриклеточными микроорганизмами, обнаружили инфицированные стволовые клетки кроветворной ткани, некоторые из которых предположительно высвобождались в кровоток. Перечисленные выше наблюдения могут свидетельствовать о том, что прозрачными клетками могут являться высвободившиеся из кроветворной ткани стволовые клетки, которые по сути представляют из себя незрелые формы гемоцитов. В этом случае вызывает интерес проведение работы с возможным выделением и культивированием прозрачных клеток с целью доведения их до созревших стадий гемоцитов *in vitro*, по аналогии с работой Li и соавт. [30], в которой осуществили полную дифференцировку гемоцитов из кроветворной ткани.

В исследованиях при работе с гемолимфой австралийского красноклещевого рака в ряде работ, например [27–29, 32], не обнаруживаются прозрачные клетки. Это может быть объяснено тем, что прозрачные клетки могут быть не зафиксированы прибором при проточной цитометрии, либо же просчитанные прозрачные клетки были отнесены к агранулоцитам, ввиду сопоставимых размеров и отсутствия гранул. При световой микроскопии эти клетки могли быть упущены из виду, так как в нативной гемолимфе их проявление начинается происходить через 10 мин после ее извлечения, а антикоагулянт сдвигает это время в большую сторону.

В связи с этим остаются актуальными дополнительные исследования по определению функций и происхождения прозрачных клеток, которые, возможно, помогут дать полную картину гемопоэза у ракообразных.

Не идентифицированные гемоциты. К этой группе клеток относятся гемоциты со смешанными морфологическими характеристиками, либо с характеристиками, не совпадающими с тремя известными типами гемоцитов, также гемоциты без гранул со слабо красящейся цитоплазмой. Не идентифицированные клетки затруднительно обнаружить в нативной гемолимфе, однако их можно обнаружить в мазке. Возможно, эти клетки являются переходными стадиями между циркулирую-

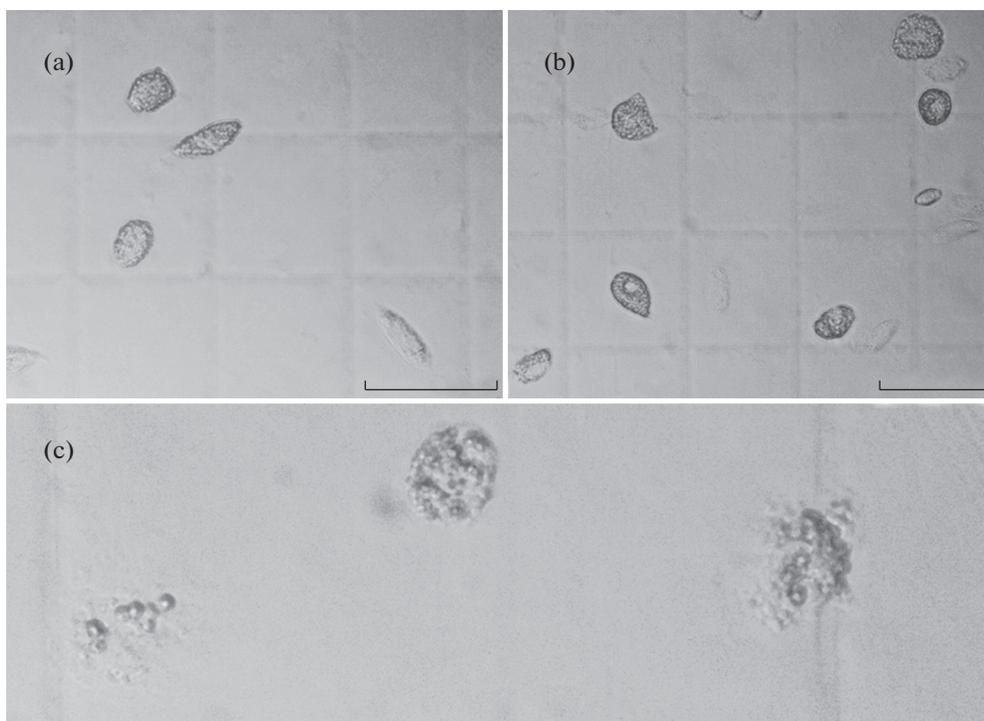


Рис. 3. (a), (b) – гемоциты в камере Горяева, (c) – разрушенные гранулоциты. Размер масштабной линейки 50 мкм.

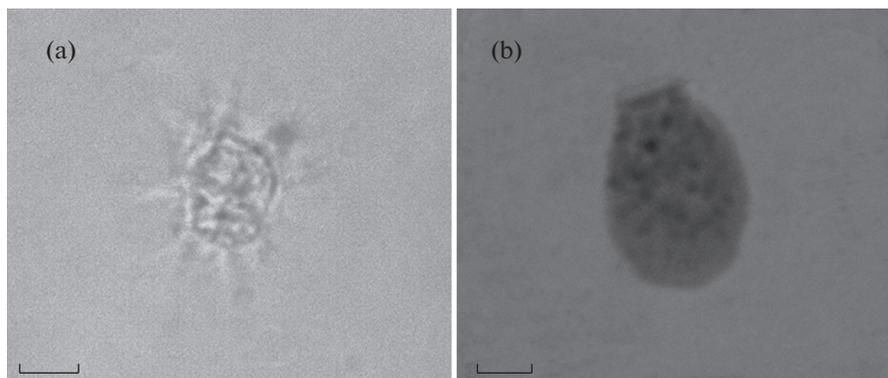


Рис. 4. Микрофотографии прозрачных клеток. (a) – округлившаяся прозрачная клетка с псевдоподиями, (b) – прозрачная клетка, окрашенная по Май-Грюнвальду. Размер масштабной линейки 5 мкм.

шими и прикрепленными гемоцитами. Не исключено, что эти клетки могут быть артефактами, возникшими при изготовлении мазка.

В итоге полученные значения размеров изученных нами гемоцитов соответствуют тем, что освещены в работах ряда исследователей [8, 13, 16, 19, 22, 42, 44], посвященных некоторым высшим ракообразным (креветки, омары, лангусты, крабы, пресноводные раки – *Fenneropenaeus chinensis*, *Paranephrops planifrons*, *Hyas araneus*, *Homarus americanus*, *Panulirus interruptus*, *Loxorhynchus grandis*, *Loxorhynchus grandis*, *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*) и, в частности, австралийскому красноклещ-

невому раку [27, 28, 30, 45], но противоречат результатам Лагуткиной и соавт. [33]. В их работе приведены в 4.6–9.7 раза большие размеры гемоцитов, а самыми крупными элементами гемолимфы были прозрачные клетки – 103.6 мкм, у нас же они одни из самых маленьких – 10.7 мкм. При этом самыми мелкими были гранулоциты 67.1 мкм, которые в наших исследованиях наибольшие с диаметром 14.6 мкм.

Процентное содержание типов гемоцитов. На рис. 5 представлено процентное содержание трех типов гемоцитов. Доминирующим типом в гемолимфе *S. quadricarinatus* являются агранулоциты,

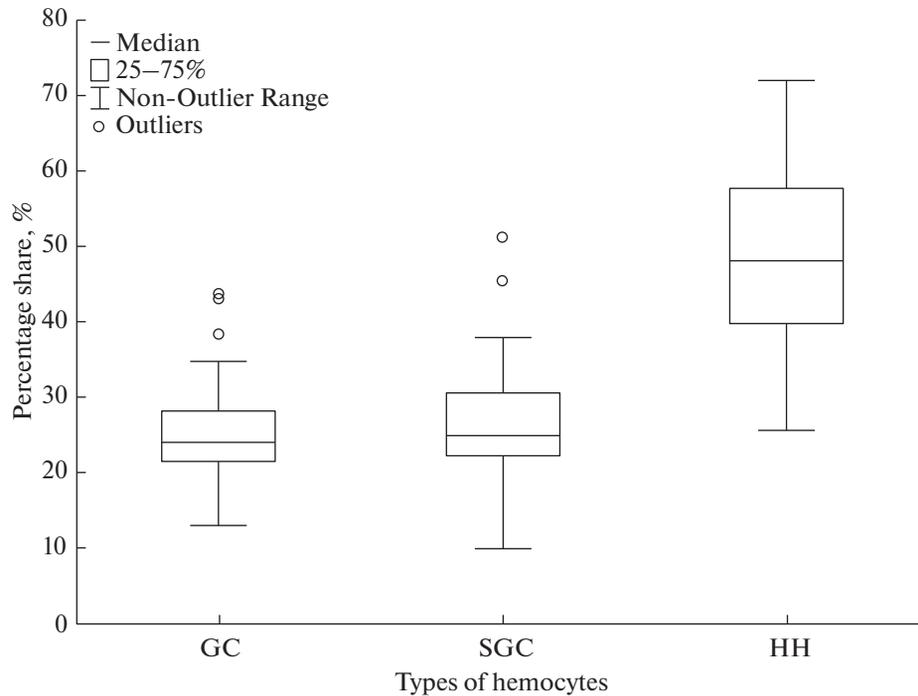


Рис. 5. Процентное содержание трех типов гемоцитов в гемолимфе *C. quadricarinatus*. GC – гранулоциты, SGC – полугранулоциты, HH – гиалиноциты (агранулоциты).

их доля составляет $48.3 \pm 11.4\%$. На долю полугранулоцитов и гранулоцитов приходится $26.3 \pm 7.8\%$ и $25.2 \pm 6.9\%$ соответственно от всех клеточных элементов в гемолимфе. Процентная доля гемоцитов в гемолимфе самок и самцов имела различные значения, так, статистически различалась доля полугранулоцитов ($p < 0.05$) и агранулоцитов ($p < 0.05$) (табл. 2). Выявлены корреляционные связи между долей гранулоцитов и агранулоцитов $r = -0.762$ ($p < 0.01$), между долей агранулоцитов и полугранулоцитов $r = -0.786$ ($p < 0.01$), также между долей гранулоцитов и полугранулоцитов 0.348 ($p < 0.05$).

Полученные данные не соотносятся с некоторыми литературными данными. Например, в работе Wentao и соавт. [34] показано, что доля гранулоцитов составляет примерно 60% от общего числа гемоцитов, а доля агранулоцитов и полугранулоцитов составляет 25 и 15% соответственно. В исследовании Li и соавт. [27] – наоборот, гранулоциты и полугранулоциты занимают доминирующее место

в гемолимфе австралийского красноклешневого рака, а агранулоциты занимают незначительный процент. В то же время полученные нами данные совпадают с результатами нескольких других работ [32, 36].

Как указывалось ранее, прозрачные клетки не были обнаружены в гемолимфе, обработанной антикоагулянтом, поэтому для обнаружения процентной доли этих клеточных структур мы провели дополнительные наблюдения с нативной гемолимфой на десятиях особях (рис. 6). Средняя доля прозрачных клеток составила $18.2 \pm 3.8\%$, при этом снизилась доля агранулоцитов – она составила $38.5 \pm 7.0\%$ по сравнению с приведенными выше измерениями. Исходя из этого можно предположить, что часть прозрачных клеток в обработанной антикоагулянтом гемолимфе может быть воспринята как агранулоциты. Полученные данные сопоставимы с результатами Лагуткиной и соавт. [33], в работе которых доля прозрачных клеток составляет 23%. При этом как наши результаты, так и Лагуткиной [33] отличаются от полученных при исследовании других видов. У речных раков видов *Astacus astacus* и *Pontastacus leptodactylis* доля прозрачных клеток составляет в среднем 6.5–8.8 и 3.3–5.5% соответственно [5, 46], у краба *Hyas araneus* доля прогемоцитов составляет порядка 11.3% и возрастает при создании искусственной гемоцитопении путем отбора гемолимфы [8].

Таблица 2. Гематологические показатели самцов и самок *C. quadricarinatus*

Показатели	Самцы ($n = 25$)	Самки ($n = 25$)
ОЧГ, шт./мкл	2808 ± 970	2709 ± 795
Агранулоциты, %	52.0 ± 10.0	44.5 ± 11.5
Полугранулоциты, %	24.0 ± 4.5	28.6 ± 9.6
Гранулоциты, %	23.8 ± 7.1	26.4 ± 6.5

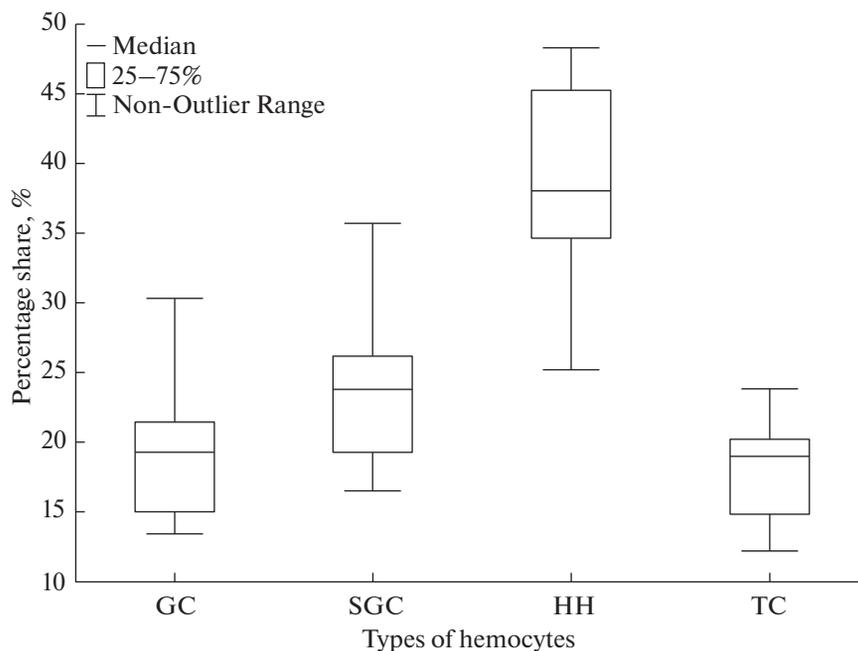


Рис. 6. Процентное содержание четырех типов гемочитов в гемолимфе *C. quadricarinatus*. GC – гранулоциты, SGC – полугранулоциты, HH – гиалиноциты (агранулоциты), TC – прозрачные клетки.

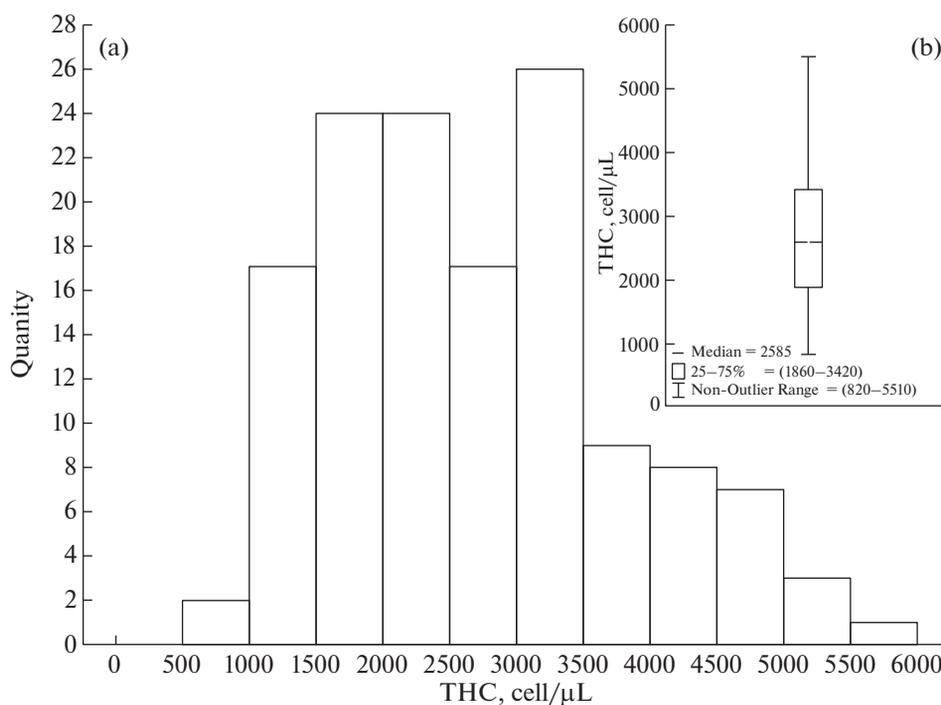


Рис. 7. ОЧГ *C. quadricarinatus*. (a) – распределение ОЧГ, (b) – размах ОЧГ.

Общее число гемочитов колеблется в широком диапазоне от 820 до 5510 шт./мкл, среднее количество клеток составляет 2707 ± 1096 шт./мкл. Наиболее частые значения ОЧГ находятся в интервалах от 1500 до 2500 шт./мкл и 3000–3500 шт./мкл (рис. 7).

Различия в ОЧГ между самками и самцами были статистически не достоверны ($p = 0.82$). Для изучения изменчивости ОЧГ в зависимости от массы был проведен корреляционный анализ Спирмена, а также сравнение пяти размерных групп рис. 8

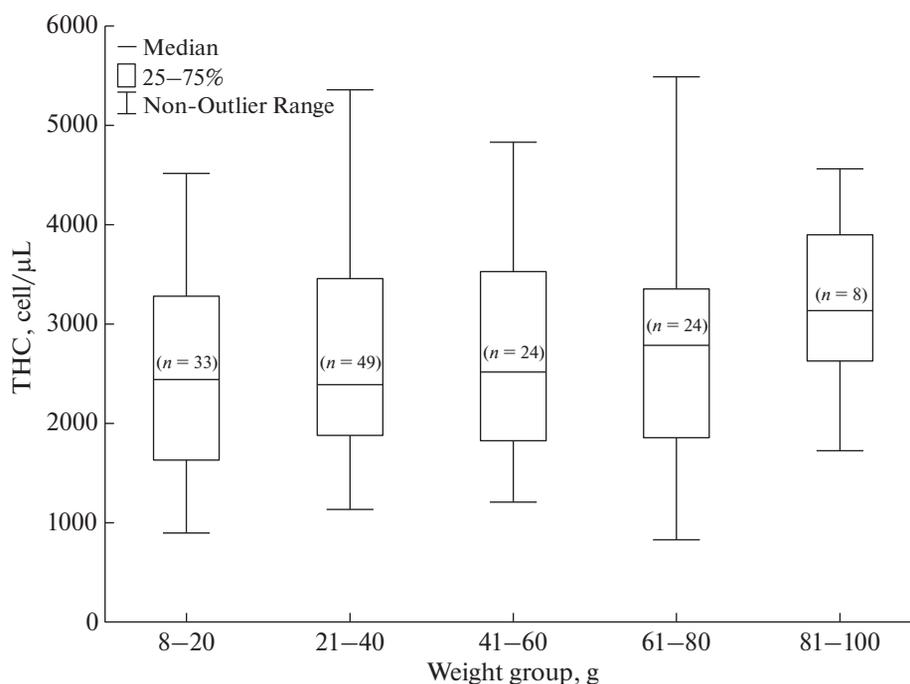


Рис. 8. Показатели ОЧГ у пяти размерных групп *C. quadricarinatus*.

с помощью критерия Краскела–Уоллиса. Достоверно значимых корреляционных связей между массой и ОЧГ не было обнаружено ($p > 0.05$). Сравнение с помощью критерия Краскела–Уоллиса показало, что различия в ОЧГ у пяти размерных групп статистически не достоверны ($p > 0.05$). Однако исходя из рис. 8 с увеличением массы в группах незначительно увеличивается ОЧГ, однако, стоит учитывать тот факт, что число наблюдений в каждой из групп разнится. Различия в уровне ОЧГ между самцами и самками были статистически не достоверны ($p > 0.05$), однако у самцов уровень ОЧГ был незначительно выше (табл. 2).

При сравнении данных уровня ОЧГ ряда других работ [32, 36, 47] с настоящим исследованием, было обнаружено, что он ниже в среднем в 1.4 раза. При этом у Wu и соавт. [37] ОЧГ ниже, чем в нашей работе, в 3.1 раза. Наиболее близкими к полученным нами значениям являются данные, приводящиеся в работе Vone и соавт. [48] – при содержании *C. quadricarinatus* в воде с температурой 27°C, ОЧГ составляет около 2500 шт./мкл, в то время как в нашей работе при содержании рака в воде с температурой 20–28°C среднее количество составляет 2707 шт./мкл. Нужно учитывать особенности и различия в условиях проведения исследований австралийского красноклешневого рака в приведенных работах: емкости содержания – аквариумы или УЗВ, плотности посадки, режим и качество кормления. Также внимания заслуживает тот факт, что для некоторых ракообразных наблюдаются различия в ОЧГ у диких и содержащихся в неволе

животных. У новозеландских пресноводных раков *Paranephrops planifrons* дикого типа уровень ОЧГ превышает в несколько раз этот уровень у особей домашнего типа, при этом дифференцированное количество гемоцитов существенно не меняется, поэтому также стоит учитывать, откуда были взяты раки для исследований [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, дана морфологическая характеристика трех типов гемоцитов *C. quadricarinatus*. Обнаружены и описаны прозрачные клетки, имеющие дискуссионное происхождение и функции. Определены уровень ОЧГ и процентная доля типов гемоцитов. Однако необходимо проведение дополнительных цитохимических, молекулярных и биохимических исследований гемоцитов, так как каждый тип гемоцитов имеет ряд своих функций и особенностей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования лабораторных животных. Ввиду проведения работ с беспозвоночными, этические стандарты, указанные во всемирной декларации прав животных, не были нарушены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией этой работы.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование текста статьи (Д.Н.С.). Обработка данных, написание и редактирование текста статьи (Д.В.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K (2000) Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191 (1–3): 45–52. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00418-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00418-x)
2. Cerenius L, Jiravanichpaisal P, Liu H, Söderhäll I (2010) Crustacean Immunity. In: Söderhäll K (ed) *Invertebrate Immunity*. *Advanc Experiment Med Biol* 708. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_13
3. Александрова ЕН, Ковачева НП (2010) Прижизненное определение физиологического статуса десятиногих ракообразных (Crustacea: Decapoda) по гематологическим показателям. *Усп Физиол Наук* 41 (2): 51–67. [Alexandrova EN, Kovatcheva NP (2010) In life determination of the physiological status of decapod crustaceans (Crustacea: Decapoda) by hematological characteristics. *Prog Physiol Sci* 41 (2): 51–67. (In Russ)].
4. Ковачева НП, Александрова ЕН (2010) Гематологические показатели как индикаторы физиологического состояния декапод: камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* и речных раков родов *Astacus* и *Pontastacus*. М.Изд. ВНИРО. [Kovatcheva NP, Alexandrova EN (2010) Hematological parameters as an indicators of physiological status of the decapods: red king crab *Paralithodes camtschaticus* and freshwater crayfish genus *Astacus* and *Pontastacus*. VNIRO Publ, Moscow. (In Russ)].
5. Аджиев ДД, Пронина ГИ, Иванов АА, Корягина НЮ (2018) Функциональные показатели пойкилотермных гидробионтов из природных и искусственных водных биоценозов. *Сельскохозяйств Биол* 53 (2): 337–347. [Adzhiev DD, Pronina GI, Ivanov AA, Koryagina NYu (2018) Functional indicators of poikilothermic aquatic species from natural and artificial water biocenoses. *Agricult Biol* 53 (2): 337–347. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.2.337rus>
6. Иванов АА, Пронина ГИ, Корягина НЮ, Ревакин АО (2013) Гомеостаз внутренней среды гидробионтов: видовые особенности хладнокровных. *Изв Тимирязев Сельскохозяйств Акад* (3): 75–88. [Ivanov AA, Pronina GI, Koryagina NYu, Revyakin AO (2013) Internal environment homeostasis of hydrobionts: specific peculiarities of cold-blooded animals. *Izvest Timiryazev Agricul Acad* (3): 75–88. (In Russ)].
7. Пронина ГИ, Корягина НЮ (2014) Комплексная прижизненная физиологическая оценка речных раков в аквакультуре. *Теор Прикладн Пробл Агрпроп* (4): 46–48. [Pronina GI, Koryagina NYu (2014) Comprehensive intravital physiological assessment of crayfishes in aquaculture. *Theor Appl Probl Agro-industrial Complex* (4): 46–48. (In Russ)].
8. Roulston C, Smith VJ (2011) Isolation and in vitro characterisation of prohaemocytes from the spider crab, *Hyas araneus* (L.). *Devel Comparat Immunol* 35 (5): 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.12.012>
9. Mix MC, Sparks AK (1980) Hemocyte classification and differential counts in the dungeness crab, *Cancer magister*. *J Invertebr Pathol* 35 (2): 134–143. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(80\)90176-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90176-7)
10. Sternshein DJ, Burton PR (1980) Light and electron microscopic studies of crayfish hemocytes. *J Morphol* 165 (1): 67–83. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051650107>
11. Martin GG, Graves BL (1985) Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J Morphol* 185: 339–348. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051850306>
12. Tsing A, Arcier J-M, Brehélin M (1989) Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J Invertebr Pathol* 53 (1): 64–77. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90075-x](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90075-x)
13. Hose JE, Martin GG, Gerard AS (1990) A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, Cytochemistry, and Function. *Biol Bull* 178 (1): 33–45. <https://doi.org/10.2307/1541535>
14. Jussila J (1997) Physiological responses of *Astacid* and *Parastacid Crayfishes* (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. doc. dissertation. Perth: University of Kuopio.
15. Hijran YY, Hasan HA (2002) Haemocyte Classification and Differential Counts in the *Freshwater Crab, Potamon fluviatilis*. *Tukr J Vet Anim Sci* 26: 403–406.
16. Zhang ZF, Shao M, Kang KH (2006) Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunol* 21: 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.003>
17. Giulianini PG, Bierti M, Lorenzon S, Battistella S, Ferrero EA (2007) Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. *Micron* 38 (1): 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.019>
18. Li C, Shields JD (2007) Primary culture of hemocytes from the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, and their susceptibility to *Panulirus argus Virus 1* (PaV1). *J Invertebr Pathol* 94 (1): 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.011>
19. Taylor S, Landman MJ, Ling N (2009) Flow cytometric characterization of freshwater crayfish hemocytes for the examination of physiological status in wild and captive animals. *J Aquatic Animal Health* 21 (3) 195–203. <https://doi.org/10.1577/h09-003.1>
20. Ding ZZ, Du JJ, Ou JJ, Li WW, Wu TT, Xiu YY, Meng QQ, Ren QQ, Gu WW, Xue HH, Tang JJ, Wang WW (2012) Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibil-

- ity to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris* in vitro. *Aquaculture* 356–357: 371–380.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.042>
21. Du J, Zhu H, Ren Q, Liu P, Chen J, Xiu Y, Yao W, Meng Q, Gu W, Wang W (2012) Flow cytometry studies on the *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes sub-populations and immune responses to novel pathogen spiroplasma MR-1008. *Fish & Shellfish Immunol* 33 (4): 795–800.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.07.006>
 22. Lv SS, Xu JJ, Zhao JJ, Yin NN, Binjie Lu B, Li SS, Chen YY, Xu HH (2014) Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes in vivo. *Fish & Shellfish Immunol* 39 (2): 415–422.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.036>
 23. Battison A, Cawthorn R, Horney B (2003) Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with *Aerococcus viridans* var. *homari* (Gaffkemia). *J Invertebr Pathol* 84 (3): 177–197.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.11.005>
 24. Лагуткина ЛЮ, Пономарев СВ (2008) Новый объект тепловодной аквакультуры – австралийский красноклешневый рак (*Cherax quadricarinatus*). *Вестник АГТУ* (6): 220–223. [Lagutkina LYu, Ponomarev SV 2008. New object of aquaculture – australian redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Vestnik AGTU* (6): 220–223.].
 25. Лагуткина ЛЮ, Кузьмина ЕГ, Таранина АА, Ахмеджанова АБ, Ясинский ВС, Пономарев РА (2020) Фактологическое обеспечение практик повышения эффективности выращивания тропических пресноводных видов. *Вестн Астраханск гос техн универ. Серия: Рыбное хозяйство* (2): 94–105. [Lagutkina LYu, Kuzmina EG, Taranina AA, Ahmedzhanova AB, Yasin-skij VS, Ponomarev RA (2020) Factual support of practices to increase the efficiency of cultivation of tropical freshwater species. *Bull Astrakhan State Techn Univer. Series: Fisheries* (2): 94–105. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-2-94-105>
 26. Лагуткина ЛЮ, Кузьмина ЕГ, Таранина АА, Ахмеджанова АБ, Ясинский ВС, Пономарев РА (2020) Фактологическое обеспечение практик повышения эффективности выращивания тропических пресноводных видов. *Вестн Астрахан Гос Технич Универ Серия: Рыбное хозяйство* (2): 94–105. [Lagutkina LYu, Kuzmina EG, Taranina AA, Ahmedzhanova AB, Yasin-skij VS, Ponomarev RA (2020) Factual support of practices to increase the efficiency of cultivation of tropical freshwater species. *Bull Astrakhan State Techn Univer Series: Fisheries* (2): 94–105. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-2-94-105>
 27. Li F, Zheng Z, Li H, Fu R, Xu L, Yang Fet al (2021) Crayfish hemocytes develop along the granular cell lineage. *Sci Rep* 11 (1): 13099.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92473-9>
 28. Duan H, Jin S, Zhang Y, Li F, Xiang J (2014) Granulocytes of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* can endocytose beads, *E. coli* and WSSV, but in different ways. *Develop & Compar Immunol* 46 (2): 186–193.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.006>
 29. Li F, Chang X, Xu L, Yang F (2018) Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles. *Fish & Shellfish Immunol* 77: 112–119.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.029>
 30. Li F, Xu L, Hui X, Huang W, Yang F (2019) Directed differentiation of granular cells from crayfish hematopoietic tissue cells. *Fish & Shellfish Immunol* 88: 28–35.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.054>
 31. Zhu K, Yang F, Li F (2022) Molecular markers for hemocyte subpopulations in crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Devel & Compar Immunol* 132: 104407.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104407>
 32. Mauro M, Arizza V, Arculeo M, Attanzio A, Pinto P, Chirco P, Badalamenti G, Tesoriere L, Vazzana M (2022) Haemolymphatic Parameters in Two Aquaculture Crustacean Species *Cherax destructor* (Clark, 1836) and *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868). *Animals* 12 (5): 543.
<https://doi.org/10.3390/ani12050543>
 33. Лагуткина ЛЮ, Евграфова ЕМ, Кузьмина ЕГ, Мазлов АМ (2021) Гематологические и биохимические показатели гемолимфы австралийского красноклешневого рака. *Вестн Астраханск гос техн универ. Серия: Рыбное хозяйство* (2): 134–143. [Lagutkina LYu, Evgrafova EM, Kuzmina EG, Mazlov AM (2021) Hematological and biochemical indicators of Australian red-claw crayfish hemolymph. *Bull Astrakhan State Technic Univer. Series: Fishing Industry* (2): 134–143. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24143/2073-5529-2021-2-134-143>
 34. Wentao Z, Wen L, Yunlong Z, Danli W, Zhongxiang M, Getao S (2017) Ultrastructural and immunocytochemical analysis of circulating hemocytes from *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868). *Indian J Anim Res* 51 (1): 129–134.
<https://doi.org/10.18805/ijar.v0i01OF.6823>
 35. Romero X, Turnbull JF, Jiménez R (2000). Ultrastructure and Cytopathology of a Rickettsia-like Organism Causing Systemic Infection in the Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Crustacea: Decapoda), in Ecuador. *J Invertebr Pathol* 76 (2): 95–104.
<https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4952>
 36. Sánchez-Salgado JL, Pereyra MA, Agundis C, Calzadaruiz M, Kantun-Briceño E, Zenteno E (2019) In vivo administration of LPS and β -glucan generates the expression of a serum lectin and its cellular receptor in *Cherax quadricarinatus*. *Fish & Shellfish Immunol* 94: 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.061>
 37. Wu D-L, Liu Z-Q, Huang Y-H, Lv W-W, Chen M-H, Li Y-M, Zhao Y-L (2018) Effects of cold acclimation on the survival, feeding rate, and non-specific immune responses of the freshwater red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquacult Internat* 26 (2): 557–567.
<https://doi.org/10.1007/s10499-018-0236-4>
 38. Paterson BD, Spanogle PT, Davidson GW, Hosking W, Nottingham S, Jussila J, Evans LH (2005) Prediction survival of western rock lobster *Panulirus cygnus*, using discriminant analysis of hemolymph parameters taken immediately following simulated handling treatments. *New Zealand J Marine Freshwat Res* 39 (5): 1129–1143.
<https://doi.org/10.1080/00288330.2005.9517380>

39. Lin X, Söderhäll I (2011) Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood* 117 (24): 6417–6424. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-320614>
40. Sukhachev AN, Dyachkov IS, Romanyuk DS, Kumeiko VV, Sinitsina VF, Korolkova ED, Kharazova AD, Polevshchikov AV (2013) Morphological analysis of hemocytes of ascidian *Halocynthia aurantium*. *Cell Tiss Biol (Tsitologiya)* 55 (12): 901–906.
41. Ghiretti-Magaldi A, Milanesi C, Tognon G (1977) Hemopoiesis in crustacea decapoda: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenas*. *Cell Different* 6 (3–4): 167–186. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(77\)90014-8](https://doi.org/10.1016/0045-6039(77)90014-8)
42. Мартынова МГ, Быстрова ОМ, Парфенов ВН (2008) Синтез нуклеиновых кислот и локализация предсердного натрийуретического пептида в гемоцитах речного рака. *Цитология* 50 (3): 243–248. [Martynova MG, Bystrova OA, Parfenov VN (2008) Synthesis of nucleic acids and localization of atrial natriuretic peptide in the crayfish haemocytes. *Cell Tiss Biol (Tsitologiya)* 50 (3): 243–248. (In Russ)].
43. Van de Braak CBT, Botterblom MHA, Liu W, Taverne N, van der Knaap WPW, Rombout JHWM (2002) The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunol* 12 (3): 253–272. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0369>
44. Иванов АА, Пронина ГИ, Корягина НЮ (2021) Физиология гидробионтов. СПб. Лань. [Ivanov AA, Pronina GI, Koryagina NYu (2021) Physiology of hydrobi-onts. SPB. Lan (In Russ)].
45. Xu X, Duan H, Shi Y, Xie S, Song Z, Jin S, Li F, Xiang J (2018) Development of a primary culture system for haematopoietic tissue cells from *Cherax quadricarinatus* and an exploration of transfection methods. *Develop & Comparat Immunol* 88: 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.07.006>
46. Пронина ГИ, Корягина НЮ (2015) Референсные значения физиолого-иммунологических показателей гидробионтов разных видов. *Вестн Астраханск гос техн универ. Серия: Рыбное хозяйство* 4:103–108. [Pronina GI, Koryagina NYu (2015) Reference values of physiological and immunological parameters of hydrobi-onts of different species. *Bull Astrakhan State Techn Univer. Series: Fisheries* 4: 103–108. (In Russ)].
47. Liu YT, Chang CI, Hseu JR, Liu KF, Tsai JM (2013). Immune responses of prophenoloxidase and cytosolic manganese superoxide dismutase in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* against a virus and bacterium. *Molec Immunol* 56 (1–2): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.03.023>
48. Bone JWP, Renshaw GMC, Furse JM, & Wild CH (2014). Using biochemical markers to assess the effects of imposed temperature stress on freshwater decapod crustaceans: *Cherax quadricarinatus* as a test case. *J Compar Physiol B* 185 (3): 291–301. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0883-3>

Hemocytes of the Australian Red Claw Crayfish (*Cherax quadricarinatus*): Morphology and Hemogram

D. N. Skafar^{a,#} and D. V. Shumeyko^a

^a Department Water bioresources and aquaculture of Kuban State University, Krasnodar, 350040 Russia

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

The aim of this work was to conduct a morphological analysis of hemocytes of the Australian red-clawed crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Hemocytes were studied in native hemolymph treated with anticoagulant and stained with May-Grünwald and Romanowsky stains. Hemolymph was collected with a syringe from the ventral sinus. Microscopy was carried out at 40× or 100× objective magnification. Hemocyte count and the percentage of each of their types were determined in the Goryaev chamber. There were distinguished three main types of hemocytes; in addition, the cells morphologically different from the first three and called transparent cells were identified. Hyalinocytes are oval or spindle-shaped cells, about 26.6 μm long and 9.2 μm wide. As a rule, they lack granules, but sometimes a small number of tiny granules sized less than 0.5 μm can be found. Cells of this type are able to outlive other cells on a slide after isolation. Semigranulocytes are also oval or spindle-shaped cells, 26.7 μm long and 9.3 μm wide, with a moderate number of small-sized granules (<0.5 μm) and sparse medium-sized granules ranging in size from 0.77 to 1.69 μm. Granulocytes are oval-shaped cells, the largest of all types, having a length and width of 28.7 and 11.1 μm, respectively. They contain large (0.8–2.48 μm) numerous granules and show a high refraction, due to which this cell type is well recognizable under a microscope. These cells have a lowest nuclear–cytoplasmic ratio compared to the former two types. Transparent cells are specifically characterized by abundant well-developed pseudopodia. After cell rounding, its diameter averages 10.7 ± 1.11 μm. This cell type begins to show up 10 min after their isolation in the anticoagulant-untreated hemolymph. Hyalinocytes are the dominant type of cells in the hemolymph, their proportion is 48.3 ± 11.4%, while semigranulocytes and granulocytes account for 26.3 ± 7.8 and 25.2 ± 6.9%, respectively. The total number of hemocytes varies in a wide range from 820 to 5510 cell/μL, with the average number of cells being 2707 ± 1096 cell/μL. The proportion of transparent cells averages 18.2 ± 3.8%.

Keywords: Australian red-clawed crayfish, *Cherax quadricarinatus*, hemolymph, hemocytes, hyalinocytes, semi-granulocytes, granulocytes, transparent cells, THC, hemogram

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И ГАНГЛИОЗИДОВ НА ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ СИГНАЛИНГ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

© 2022 г. И. О. Захарова^{1,*}, Л. В. Баюнова¹, К. В. Деркач¹,
И. О. Илясов¹, И. Ю. Морина¹, А. О. Шпаков¹, Н. Ф. Аврова¹

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

*e-mail: zakhar@iephb.ru

Поступила в редакцию 09.08.2022 г.

После доработки 15.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

Инсулиновая сигнальная система в гипоталамических нейронах играет важную роль в центральной регуляции метаболизма глюкозы, пищевого поведения и чувствительности тканей к инсулину. Снижение содержания инсулина в мозге при метаболических расстройствах, в том числе при диабете, является причиной низкой активности ключевых протеинкиназ, регулируемых через инсулиновую систему. Недостаток гормона в мозге может быть компенсирован за счет интраназально вводимого инсулина, который доставляется непосредственно в мозг. Его эффективность может быть повышена посредством совместного использования с веществами, усиливающими действие инсулина в мозге, к числу которых принадлежат сложные гликофинголипиды ганглиозиды. Целью работы было изучить влияние раздельного и совместного интраназального введения инсулина (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ганглиозидов (6 мг/кг/сутки) крысам линии Wistar с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа (СД2) на активность ключевых компонентов инсулинового сигналинга (Akt, GSK-3 β , ERK1/2, p70S6K и AMPK) в гипоталамусе, а также на экспрессию генов (*GLUT2*, *FASN*, *PCK*, *G6PC* и *FBP*), ответственных за метаболизм глюкозы в печени. Впервые установлено, что совместные интраназальные введения инсулина и ганглиозидов крысам с СД2 приводят к восстановлению толерантности к глюкозе, улучшению чувствительности тканей к инсулину, усилению обменных процессов и подавлению глюконеогенеза в гепатоцитах печени. Это происходит во многом благодаря центральному синхронизированному влиянию инсулина и ганглиозидов на функциональную активность ключевых белков инсулинового сигналинга (GSK3 β , p70S6K, ERK1/2, AMPK) в гипоталамусе, а также вследствие восстановления экспрессии BDNF и снижения мРНК воспалительного цитокина IL-1 β в гипоталамических нейронах. Таким образом, совместное интраназальное введение инсулина и ганглиозидов крысам с СД2 в значительной степени восстанавливает у них инсулиновый сигналинг в гипоталамусе и контроль глюконеогенеза в печени, нарушенные в условиях диабетической патологии.

Ключевые слова: инсулин, ганглиозиды, интраназальное введение, гипоталамус, сигнальные пути, сахарный диабет 2-го типа

DOI: 10.31857/S0044452922060122

Островки поджелудочной железы (островки Лангерганса), играют важную роль в метаболизме углеводов, поскольку в ответ на повышение уровня глюкозы в крови в постпрандиальный период секретируют инсулин, что приводит к снижению концентрации глюкозы вследствие инсулин-индуцируемой ее утилизации периферическими тканями и подавления ее синтеза гепатоцитами [1]. В условиях недостатка питательных веществ и умеренно низкого уровня глюкозы в крови в клетках поджелудочной железы активированы пути, подавляющие выделение инсулина и предотвращающие на-

растание гипогликемии. Долгое время патогенез сахарного диабета связывали почти исключительно с нарушением синтеза и секреции инсулина, а также с развитием резистентности к инсулину периферических тканей, что и предопределяло возможные пути лечения этого заболевания [2]. Несмотря на то что ряд исследователей указывали на участие мозга в регуляции метаболизма глюкозы, но до недавнего времени мозг рассматривался как орган, выполняющий в регуляции глюкозного гомеостаза вспомогательную роль. И только в последние годы появилось достаточно доказательств

в пользу исключительной важности взаимодействия между различными отделами мозга и островками поджелудочной железы в регуляции эффективности поглощения глюкозы периферическими органами и тканями [3–5]. Это во многом обусловлено тем, что мозг является одной из ключевых мишеней инсулина, поскольку этот гормон проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер посредством рецептор-опосредованного транспорта и в дальнейшем воздействует на его структуры [6–8]. Определяющую роль в этом процессе играют специализированные клетки танициты, выстилающие дно третьего желудочка [9]. Кроме того, во всех структурах мозга имеются все основные компоненты инсулинового сигналинга, включая инсулиновые рецепторы, белки-субстраты инсулинового рецептора (IRS) и нижележащие эффекторные звенья, включая фосфатидилинозитол-3-киназу, Akt-киназу, протеинфосфотирозинфосфатазу 1В (PTP1B), компоненты каскада митогенактивируемых протеинкиназ. Инсулиновые рецепторы присутствуют во всех отделах мозга, но наиболее высокий уровень их экспрессии выявлен в гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, коре и мозжечке [10–12]. Именно в этих структурах мозга профиль экспрессии генов инсулинового рецептора в наибольшей мере меняется при повышении уровня инсулина в кровотоке [13]. Для мышей, нокаутных по инсулиновому рецептору в мозге, характерны ожирение, дислипидемия, инсулиновая резистентность на фоне высокого содержания инсулина в крови, что свидетельствует о важности инсулиновой сигнальной системы мозга в регуляции обмена веществ [14]. В гипоталамусе наибольшее значение для поддержания гомеостаза глюкозы имеют нейроны аркуатного, вентромедиального и паравентрикулярного ядер, поскольку при инъекциях инсулина или глюкозы в данные области наблюдается одновременное снижение содержания глюкозы в крови и повышение чувствительности гепатоцитов к инсулину [15, 16]. Напротив, подавление экспрессии инсулинового рецептора в гипоталамических нейронах вызывает нарушение толерантности к глюкозе [17].

У людей без признаков гиперинсулинемии и инсулиновой резистентности содержание инсулина в спинномозговой жидкости (СМЖ) положительно коррелирует с уровнем инсулина в крови [18]. Однако при метаболических расстройствах, сопровождающихся ожирением и гиперинсулинемией, отношение уровней инсулина в СМЖ и в крови существенно снижается, причем это определяется выраженностью метаболических нарушений и связано с ослаблением рецептор-опосредованного транспорта гормона из крови в мозг вследствие развития инсулиновой резистентности [19–22]. Показано, что следствием сниженного содержания гормона в гипоталамусе является низкая ак-

тивность эффекторных протеинкиназ, как это продемонстрировано у животных с ожирением, вызванным высокожировой диетой (ВЖД), а также с экспериментальными моделями сахарного диабета 2-го типа (СД2) [23–26]. Недостаток инсулина в мозге, вызывающий нарушения в работе ключевых сигнальных систем, может быть компенсирован за счет интраназальных введений гормона, обеспечивающих его доставку непосредственно в мозг, в том числе к гипоталамическим нейронам, которые имеют высокую плотность инсулиновых рецепторов [27]. Длительные интраназальные введения инсулина (ИВИ) способствуют частичной нормализации метаболических показателей и восстановлению функциональной активности сигнальных систем как в мозге, так и на периферии при сахарном диабете и метаболическом синдроме [28, 29]. Эндогенный синтез глюкозы в печени и, как следствие, ее концентрация в крови, также снижаются после интраназального введения инсулина здоровым людям [30]. Однако этот эффект ослабевает при метаболических расстройствах, в том числе при сильно выраженном ожирении, что связывают с метаболическими и гормональными нарушениями [31]. Определенную роль в этом играет развитие центральной инсулиновой резистентности, ослабляющей эффекты ИВИ на структуры мозга, ответственные на контроль глюконеогенеза, и периферической инсулиновой резистентности, препятствующей влиянию циркулирующего в крови инсулина на продукцию глюкозы гепатоцитами. Перспективным подходом для усиления восстанавливающего эффекта ИВИ на синтез глюкозы гепатоцитами может быть повышение чувствительности мозга и периферических тканей к инсулину с помощью метформина, тиазолидиндионов (более известных как глитазоны), миметиков глюкагоноподобного пептида-1, ингибиторов PTP1B [32, 33]. Однако применение этих препаратов требует системного введения и не гарантирует улучшения действия ИВИ в центральной нервной системе (ЦНС).

Ранее нами было впервые показано, что сложные гликофинголипиды ганглиозиды, выделенные из мозга теленка, способны увеличивать регуляторные эффекты ИВИ при их совместном введении крысам с экспериментальным диабетом [34]. Эндогенные ганглиозиды являются важнейшими функциональными компонентами плазматических мембран нервных клеток у позвоночных и вовлечены в регуляцию процессов роста, дифференцировки, межклеточного взаимодействия, синаптогенеза и нейротрансмиссии [35, 36]. Они обладают нейротрофическими и нейротрофическими свойствами, что позволяет использовать их для лечения нейродегенеративных заболеваний [37]. Ганглиозиды участвуют и в регуляции энергетического обмена, что обусловлено их взаимодей-

ствием с лептиновыми и инсулиновыми рецепторами в гипоталамических нейронах [38]. Поскольку гликосфинголипиды хорошо растворимы в воде и не вызывают раздражения слизистой оболочки носа, то интраназальные введения ганглиозидов (ИВГ) также могут быть использованы для их доставки в мозг, хотя ранее такой способ введения этих соединений не использовался. В этой связи следует отметить, что в случае инсулина его интраназальное введение является наиболее адекватным и легко воспроизводимым способом его доставки в мозг по сравнению с системным или интрацеребровентрикулярным введениями. Внедрение ИВИ и ИВГ, в том числе при совместном их применении, открывает возможности для изучения исключительно центральных эффектов используемых соединений и возможных механизмов их функционального взаимодействия на уровне ЦНС.

Цель наших исследований состояла в изучении отдельного и совместного влияния интраназальных введений инсулина и ганглиозидов крысам линии Wistar с экспериментальным СД2 на активность ключевых компонентов инсулинового сигналинга в гипоталамусе, а также на экспрессию генов, ответственных за метаболизм глюкозы в печени животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка препаратов для интраназальных инъекций. Метод Фолча использовался для экстракции суммарных ганглиозидов из мозга телят по протоколу, подробно описанному нами ранее [39]. Полученный препарат суммарных ганглиозидов дополнительно очищали на колонке Sephadex G-25 “Fine” (“Pharmacia”, Швеция) [40]. Количество ганглиозидов оценивали по продуктам реакции силовых кислот с резорциновым реагентом. Для интраназальных введений инсулин (#15500, “Sigma”, США) растворяли в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5) до концентрации 0.5 МЕ/20 мкл, а ганглиозиды разводили в физиологическом растворе до концентрации 1 мг/10 мкл. Совместное интраназальное введение инсулина и ганглиозидов проводили с интервалом 10 мин.

Экспериментальная модель диабета. Для моделирования СД2 использовали самцов крыс Wistar, возраст которых на начало эксперимента составил 2 мес. СД2 индуцировали с помощью ВЖД, состав которой описан нами ранее [41], и однократной инъекции низкой дозы токсина стрептозотоцина (СТЗ) (20 мг/кг), который вводили в/б в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5) через 11 нед после начала ВЖД. В среднем СД2 развивался у 60–80% животных, вследствие чего на начальном этапе количество животных брали с необходимым запасом. Так, изначально для индукции СД2 были взяты 54 крысы, из которых для дальнейших экспери-

ментов на основании результатов орального глюкозотолерантного теста (оГТТ) были отобраны 36 животных. оГТТ проводили через 4 нед после введения СТЗ, и отбирали животных с нарушенной толерантностью к глюкозе, характеризуя ее как среднетяжелую форму СД2 (уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки не менее 8 мМ). Животные контрольных групп получали стандартный корм и однократную инъекцию 0.1 М натрий-цитратного буфера (рН 4.5) вместо СТЗ. Из пула крыс с подтвержденным развившимся СД2 рандомно формировали 4 диабетические группы по 9 животных в каждой. В течение последующих четырех недель проводили ежедневные интраназальные введения следующих препаратов: Группа 1 (Контроль, группа К) – физиологический раствор (интраназально), Группа 2 (Контроль + ИВГ + ИВИ, группа КГИ) – ганглиозиды (6 мг/кг/сутки, интраназально) и инсулин (0.5 МЕ/крысу/сутки, интраназально), Группа 3 (Диабет, Д) – физиологический раствор (интраназально), Группа 4 (Диабет + ИВИ, ДИ) – инсулин (0.5 МЕ/крысу/сутки, интраназально), Группа 5 (Диабет + ИВГ, ДГ) – ганглиозиды (6 мг/кг/сутки, интраназально), Группа 6 (Диабет + ИВГ + ИВИ, ДГИ) – ганглиозиды (6 мг/кг/сутки, интраназально) и инсулин (0.5 МЕ/крысу/сутки, интраназально). По истечении четырехнедельного лечения крыс наркотизировали с помощью хлоралгидрата (400 мг/кг, “Sigma”, США), проводили декапитацию, оценивали массу абдоминального и эпидидимального жира. Образцы цельного гипоталамуса без разделения на ядра и печени замораживали на сухом льду сразу же после извлечения и хранили в холодильной камере при –80°C для последующей оценки в них содержания исследуемых белков и их фосфорилированных форм методом Вестерн-блоттинга и изучения экспрессии целевых генов методом ПЦР в реальном времени.

Оральный глюкозотолерантный тест. За два дня до окончания лечения посредством ИВИ и ИВГ чувствительность к глюкозе оценивали с помощью оГТТ, для чего крысам перорально через зонд вводили глюкозу (2 г/кг), уровень которой в крови измеряли до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки глюкозой с помощью глюкометра и тест-полосок “One Touch Ultra” (США).

Иммуноферментный анализ. Уровень инсулина в плазме крови крыс оценивали до и через 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки, используя набор “Rat Insulin ELISA kit” (“Mercodia”, Швеция) в соответствии с инструкцией производителя. Объем забираемой из хвостовой вены крови для определения инсулина в каждой точке составил 100 мкл, для определения уровня гормона с помощью ИФА на каждую пробу использовали по 10 мкл полученной плазмы. Расчет индекса инсулиновой резистентности (homeostatic model assess-

ment of insulin resistance, НОМА-IR)) производился по формуле: НОМА-IR = уровень глюкозы натощак (ммМ) × уровень инсулина натощак (нг/мл).

Вестерн-блоттинг. Образцы тканей гомогенизировали в соотношении 1:20 в лизисном буфере, состоящем из 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мМ EGTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% дезоксихолата натрия, 10 мМ пиродифосфата натрия, 15 мМ NaF, 10 мМ глицерофосфата натрия, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF), 0.02% NaN₃ и протеазного ингибиторного коктейля (“Roche”, США). Неразрушенные клетки и крупные клеточные фрагменты осаждали центрифугированием 500 g × 10 мин (4°C). Концентрацию белка в пробах измеряли по модифицированному методу Лоури. Для вертикального электрофореза в камерах “Mini-Protean” (“Bio-Rad”, США) на 9–14% акриламидные гели загружали пробы, содержащие 25–30 мкг белка. В качестве стандарта молекулярного веса использовали окрашенные маркеры “Spectra Multicolour Broad Range Protein Ladder (10–260 kDa)” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкМ, “Amersham”, Великобритания) методом мокрого переноса осуществлялся в минитрансблоттере (“Bio-Rad”, США) в буфере, содержащем 25 мМ Tris, 192 мМ глицин и 20% (v/v) этанола, при постоянном напряжении 100 В. Для блокировки неспецифического связывания мембраны инкубировались 30 мин при комнатной температуре в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 5% обезжиренного молока (“Europek”, Россия), 0.1% Tween 20. Для взаимодействия перенесенных белков с растворами первичных антител мембраны оставляли при +4°C на шейкере MR-1 (“Biosan”, Латвия) на 12–14 ч. Первичные антитела разводили в 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 5% БСА-фракция V (“Amresco”, США), 0.1% Tween 20 в соотношении (1: 1000). Антитела для ph-Akt(Ser⁴⁷³) (#4058), Akt (#9272), ph-AMPKα(Thr¹⁷²) (#2535), AMPKα (#2793), ph-GSK3β(Ser⁹) (#9322), GSK3β (#9315), ph-p70S6K(Thr³⁸⁹) (#9205), p70S6K (#9202), total ERK1/2 (#9102) были приобретены у компании “Cell Signaling Technology” (США), anti-ph-ERK1(pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴)&ERK2(pThr¹⁸⁶/pTyr¹⁸⁷) (#E7028) – у компании “Sigma” (США), SOCS3 (#ab16030) – у компании “Abcam” (Великобритания), РТР1В (#610139) – у компании “BD Transduction Laboratories” (США), GFAP (#NBP1-05197), GAPDH (#NB600-502) – у компании “Novus Biologicals” (США). После 3-х кратной промывки буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, мембраны обрабатывали раствором вторичных антител, приготовленным на 5% обезжиренном молоке в том же буфере, и проводили одночасовую инкубацию при комнатной темпера-

туре. В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи (#7074) или анти-мышинные (#7076) IgG (“Cell Signaling Technology”, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), либо биотинилированные IgG(H+L) (#14708) и (#14709). Сигнал HRP усиливали коммерческим ECL (“Novex”, США) или аналогом ECL, приготовленным в лабораторных условиях (люминол – пара-кумаровая кислота – H₂O₂). Хемилюминесцентное свечение фиксировали на голубой фотопленке “Phenix” (“Research Products”, США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга инкубировали с антителами к внутреннему стандарту GAPDH. Проявленные фотопленки визуализировали на сканере “Canon” (“CanoScan 8800F”, США). Денситометрическая обработка данных проводилась с помощью программы Bio7.

ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК экстрагировали реактивом “RNA Extract” (“Евроген”, Россия). Кодировочную ДНК синтезировали с помощью набора “MMLV RT Kit” того же производителя. Амплификацию проводили в смеси, содержащей 10 нг обратно транскрибированного продукта, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, реакционную смесь набора “qPCRmix-HS SYBR+LowROX” (“Евроген”, Россия) с использованием прибора “500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Экспрессию генов, кодирующих инсулиновый рецептор (InsR), G-6-Pase catalytic subunit 1 (G6pc1), PEPCK1, Fbp1, fatty acid synthase (FASN), Glut2(Slc2a2), Il-1β, Actb и 18S, определяли с помощью следующих праймеров: *InsR* – CTG-GAGAAGTCTCGGTCATT (For) и GGC-CATAGACACGGAAAAGAAG (Rev), *G6pc* – GAAGGCCAAGAGATGGTGTGA (For) и TG-CAGCTCTTGCGGTACATG (Rev), *Pck1* – CCCAGGAAGTGAGGAAGTTTGT (For) и GGAG-CCGTCGCAGATGTG (Rev), *Fbp1* – CCATCATA-ATAGAGCCCGAGAAGA (For) и CTTTCTC-CGAAGCCTCATTAGC (Rev), *FASN* – GCATTC-CACAACCCCAACC (For) и AACGAGTTGATGCCACGAT (Rev), *Glut2* – GTTTTCTGCAGAGCCAAGTCC (For) и GTCCTATGCAGCACCCTGA (Rev), *IL1β* – GACTTCACCATGGAACCCCGT (For) и GGAGACTGCCCATTTCTCGAC (Rev), *Actb* – GC-GAGTACAACCTTCTTGACAG (For) и CTGAC-CCATACCCACCATCAC (Rev), *18S* – CTG-GAGAAGTCTCGGTCATT (For) и GGC-CATAGACACGGAAAAGAAG (Rev). Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения 7500 Software v 2.0.6. и ExpressionSuite Software v1.0.3. Для нормализации данных использовали показатель ΔCt, равный разности среднего геометрического Ct референсных генов (18S и актина В) и значения Ct для исследуемого транскрипта. Для оценки степени экспрессии изучаемых генов проводили сравнение с контрольными

образцами путем вычисления значения $\Delta\Delta\text{St}$, равного разности ΔSt контроля из ΔSt образца.

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимических исследований мозг фиксировали 6 дней в 4%-ном растворе пара-формальдегида в 0.2 М Na^+ -фосфатном буфере (4°C), промывали с помощью 0.02 М фосфатного буфера, содержащего 0.9% NaCl (PBS, pH 7.4), и после 7-дневной криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, растворенной в PBS, замораживали. Из области гипоталамуса получали чередующиеся серии фронтальных срезов (16 мкм) с помощью криостата ("Leika", Германия). Каждый десятый срез монтировали на стекла "SuperFrost/plus" ("Menzel", Германия). Для иммуногистохимических исследований отбирали срезы, включающие вентромедиальное ядро гипоталамуса. Стекла кипятили 5 мин в цитратном буфере (pH 6.0) для демаскировки антигена, промывали в PBS, в целях блокировки эндогенной пероксидазы в течение 30 мин обрабатывали 0.3%-ным раствором перекиси водорода, разведенной в PBS. После промывки в PBS, содержащем 0.1% Triton X-100 (PBST), срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в блокирующем растворе (2% сыворотки быка и 2% сыворотки козы в PBST) для предотвращения неспецифического связывания. Затем срезы инкубировали 12 ч при комнатной температуре с первичными антителами анти-BDNF (#DF6387, "Affinity Biosciences") в разведении 1:100. После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами козы против кролика, конъюгированными с биотином ("VectorLabs", Великобритания), разведенные 1:600 в PBST. Стекла тщательно промывали и наносили комплекс стрептовидин-пероксидаза ("Sigma", США) в разведении 1:700 в PBS. Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина ("Sigma", США) и 0.015%-ного раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали. Изображения получали с помощью микроскопа "Carl Zeiss Axio A1" ("Zeiss", Германия) со встроенной телевизионной камерой "AxioCam 712 color" ("Zeiss", Германия) и программы ZEN 3.4 (Zen pro). С помощью программы Image J (США) измеряли оптическую плотность иммунопозитивных структур и представляли в условных единицах.

Статистическая обработка. Полученные данные анализировали в программе "Prism". Данные представляли как среднее значение \pm SEM. 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 $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Продолжительная ВЖД в совокупности с однократной инъекцией низкой дозы СТЗ (20 мг/кг, в/б) приводила к нарушению метаболических показателей у крыс. Спустя 5 мес после перевода на ВЖД у животных диабетической группы (Д) наблюдали повышенное содержание глюкозы и инсулина в крови натощак, а также после нагрузки глюкозой (табл. 1), что является проявлением нарушенной толерантности к глюкозе и инсулиновой резистентности (ИР). Наиболее распространенный метод оценки резистентности к инсулину, состоящий в расчете индекса ИР, как произведения базальных (натощак) уровней глюкозы и инсулина, показал, что у диабетических животных индекс ИР возрастает до 4.22 ± 0.20 отн.ед. ($p < 0.001$) по сравнению с 2.50 ± 0.19 отн.ед. у контрольных крыс. Гипергликемия, гиперинсулинемия и дислипидемия были ассоциированы с увеличением массы тела и жировой ткани у диабетических крыс. Хотя повышение массы тела в группе Д в сравнении с контролем составило 11%, но различия были статистически значимыми ($p < 0.05$). Различия в массе жировой ткани были выше. В группе Д масса эпидидимального жира была выше на 78% ($p < 0.001$), а абдоминального жира – на 72% ($p < 0.001$) (табл. 1).

Для коррекции метаболических нарушений и восстановления толерантности к глюкозе использовали интраназальные введения инсулина (ИВИ, 0.5 МЕ/крысу/сутки) и суммарных ганглиозидов мозга телят (ИВГ, 6 мг/крысу/сутки). Лечение диабетических крыс с помощью ИВИ и ИВГ проводили в течение 4 нед, начиная его через 4 мес после перевода животных на ВЖД. В результате масса тела у диабетических животных групп ДИ (диабет + ИВИ), ДГ (диабет + ИВГ) и ДГИ (диабет + ИВГ + ИВИ) достоверно не отличалась от крыс контрольной группы (К), но и различия с диабетической группой без лечения также не были статистически значимыми. Инсулин при действии на гипоталамические структуры мозга способен оказывать анорексигенный эффект, тогда как ганглиозиды, модулирующие активность инсулиновых и лептиновых сигнальных путей, могли бы этот эффект усилить. В ходе проведенных исследований было установлено, что только в группе ДГ содержание жира снижалось на 45% по сравнению с нелеченой диабетической группой ($p < 0.05$ по сравнению с группой Д). В наибольшей степени в группе ДГ снижалось содержание эпидидимального жира (на 58%, $p < 0.01$ по сравнению с группой Д), в то время как содержание абдоминального жира только на 33% ($p > 0.05$). Введение ИВИ приводило к достоверному снижению количества эпидидимального жира по сравнению с группой Д ($p < 0.05$). Установлено также, что при совместном

Таблица 1. Влияние интраназальных введений ганглиозидов (6 мг/кг/сутки) и инсулина (0.5 МЕ/крысу/сутки) на метаболические показатели у самцов крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина

Показатель	К, <i>n</i> = 9	КГИ, <i>n</i> = 9	Д, <i>n</i> = 9	ДИ, <i>n</i> = 9	ДГ, <i>n</i> = 9	ДГИ, <i>n</i> = 9
Масса тела, г	385.3 ± 14.8	382.2 ± 12.2	427.4 ± 9.6*	416.8 ± 15.9	400.5 ± 14.3	411.7 ± 8.3
Масса жира, г	11.01 ± 0.63	9.28 ± 1.32	19.31 ± 1.14***	16.31 ± 1.00**	14.29 ± 1.88#	16.69 ± 1.42**
Масса абдоминального жира, г	5.62 ± 0.54	4.44 ± 0.80	9.68 ± 0.72***	8.42 ± 0.58**	7.82 ± 1.14	8.66 ± 0.86**
Масса эпидидимального жира, г	5.39 ± 0.26	4.84 ± 0.54	9.63 ± 0.45***	7.88 ± 0.51** #	6.46 ± 0.83##	8.03 ± 0.65**
Глюкоза натощак, мМ	4.66 ± 0.13	5.43 ± 0.11**	5.59 ± 0.13***	4.92 ± 0.17#	5.42 ± 0.15**	5.12 ± 0.16##
Глюкоза (ГТТ, 120 мин), мМ ^а	6.40 ± 0.28	5.48 ± 0.28*	9.28 ± 0.36***	7.56 ± 0.40**	7.22 ± 0.32##	7.02 ± 0.17###
Инсулин натощак, нг/мл	0.56 ± 0.04	0.54 ± 0.05	0.76 ± 0.04**	0.57 ± 0.04#	0.67 ± 0.11	0.53 ± 0.05#
Инсулин (ГТТ, 120 мин), нг/мл ^а	1.01 ± 0.09	0.82 ± 0.09	2.38 ± 0.20***	1.41 ± 0.21##	1.71 ± 0.18** #	1.48 ± 0.21#
Индекс инсулинорезистентности (Homa-IR), отн.ед.	2.50 ± 0.19	2.92 ± 0.29	4.22 ± 0.20***	2.84 ± 0.28##	3.69 ± 0.70	2.78 ± 0.30##

Примечание. ^а – Уровни глюкозы и инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки при проведении оГТТ. Данные представлены как среднее ± SEM. Различия статистически значимы по сравнению с группой К при: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$. Различия статистически значимы по сравнению с группой Д при: # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.01$; ### – $p < 0.001$.

введении ИВИ и ИВГ эффекты препаратов на адипозность не усиливались (табл. 1). Таким образом, ИВИ и ИВГ восстанавливали обмен липидов, причем в большей степени в эпидидимальных адипоцитах в сравнении с адипоцитами абдоминального жира.

Введение инсулина как отдельно, так и совместно с ганглиозидами позволило значительно снизить ИР, что подтверждается расчетами индекса ИР (НОМА-IR). Благодаря лечению ИВИ и ИВГ как у контрольных крыс (КГИ), так и у диабетических (ДГ и ДГИ) повышалась скорость утилизации

глюкозы, на что указывают рассчитанные значения AUC_{0-120} (интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы (мМ)–время (мин)” для глюкозных кривых в интервале времени от 0 до 120 мин в оГТТ (рис. 1а). Эти данные свидетельствуют о повышении чувствительности тканей к инсулину. Это подтверждается снижением в сравнении с группой Д значений AUC_{0-120} (интегрированная площадь под кривой “концентрация инсулина (нг/мл) – время (мин)” во временном промежутке от 0 до 120 мин после глюкозной нагрузки (рис. 1б).

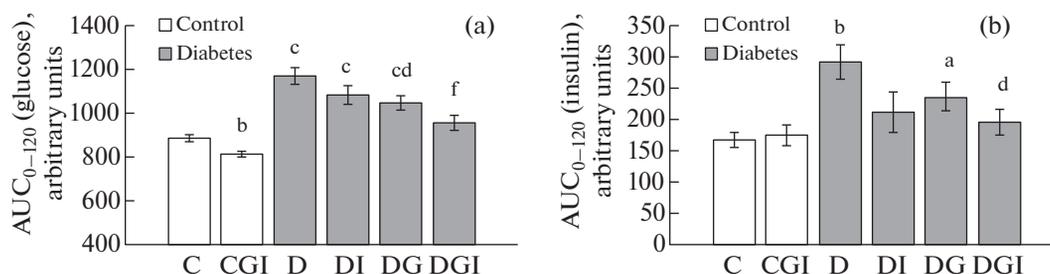


Рис. 1. Оценка влияния ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на чувствительность к глюкозе и инсулину у крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, при проведении орального глюкозотолерантного теста. Обозначения групп на графике: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ).

(а) – AUC_{0-120} , интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы (мМ)–время (мин)” для глюкозных кривых в течение 120 мин после нагрузки глюкозой. Данные представлены как среднее ± SEM ($n = 9$). (б) – AUC_{0-120} , интегрированная площадь под кривой “концентрация инсулина (нг/мл)–время (мин)” для инсулиновых концентрационных кривых в течение 120 мин после нагрузки глюкозой. Данные представлены как среднее ± SEM ($n = 5$). Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: а – $p < 0.05$; б – $p < 0.01$; с – $p < 0.001$. Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) при: d – $p < 0.05$; e – $p < 0.01$; f – $p < 0.001$.

Эффективность инсулинового сигналинга в мозге зависит прежде всего от инсулиновых рецепторов как первичного звена, опосредующего действие гормона. В целях изучения влияния ИВИ и ИВГ на состояние этих рецепторов определяли экспрессию мРНК инсулинового рецептора (*InsR*) в гипоталамусе контрольных и диабетических групп. При отдельных ИВИ и ИВГ количество мРНК *InsR* в группах ДИ и ДГ не отличалось от группы К (рис. 2). После совместных ИВИ и ИВГ уровень экспрессии снижался как в контрольной группе КГИ до 0.77 ± 0.03 отн.ед., так и в группе с СД2 (ДГИ) до 0.67 ± 0.08 отн.ед. по сравнению с 1.00 ± 0.05 в контрольной группе К ($p < 0.01$). Таким образом, чувствительность тканей к инсулину не имеет прямой корреляции с экспрессией мРНК *InsR* в гипоталамусе крыс при совместных интраназальных введениях инсулина и ганглиозидов.

Поскольку длительность активации инсулиновых рецепторов и нижележащих сигнальных путей зависит от негативных регуляторов инсулинового сигналинга, в лизатах гипоталамуса было проведено измерение содержания белков РТР1В и супрессора цитокинового сигналинга SOCS3 для выявления влияния ИВИ и ИВГ на экспрессию этих белков в гипоталамусе крыс с СД2. При СД2 в гипоталамусе крыс количество иммунореактивного белка РТР1В не менялось в сравнении с контролем как у нелеченых животных, так и в условиях их лечения ИВИ и ИВГ (рис. 3а). В отличие от РТР1В экспрессия SOCS3, связанного в большей мере с лептиновой сигнальной системой, у диабетических крыс снижалась до следовых количеств (0.028 ± 0.006 отн.ед. в группе Д против 0.499 ± 0.151 отн.ед. в контроле, $p < 0.01$). При лечении ИВИ содержание SOCS3 возрастало, но различия с группой Д не были значимыми (рис. 3б). В то же время лечение ИВГ и комбинацией ИВГ+ИВИ содержание SOCS3 достигало контрольных значений и значимо отличалось от такового в группе Д ($p < 0.001$). Следует отметить, выявленные изменения в экспрессии белка SOCS3 в гипоталамусе леченых ИВГ диабетических крыс могут быть компенсаторными, направленными на усиление инсулиновой сигнальной системы путем повышения активности лептиновой системы.

Для изучения влияния ИВИ и ИВГ на активность эффекторных протеинкиназ, связанных с инсулиновым рецептором, в гипоталамусе крыс с СД2 с помощью Вестерн-блоттинга определяли уровень фосфорилирования серин/треониновой протеинкиназы Akt. В активированной инсулином форме Akt-киназа фосфорилирована по остаткам Ser⁴⁷³ (основной сайт фосфорилирования) и(или) Thr³⁰⁸. У животных с СД2 после введений ИВИ и ИВГ не было выявлено значимых различий в значениях фосфо-Akt(Ser⁴⁷³)/tAkt как по отношению к

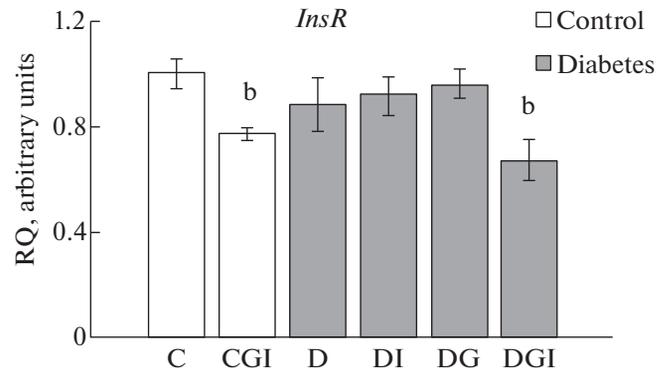


Рис. 2. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на экспрессию гена инсулинового рецептора (*InsR*) в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Обозначения групп на графике: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). Уровень экспрессии гена *InsR* нормировали по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. Данные представлены как среднее \pm SEM ($n = 7$). Различия статистически значимы: b – $p < 0.01$ по сравнению с контролем (С).

контрольной (К), так и к диабетической (Д) группам (рис. 4а).

Используемый для анализа лизат ткани представляет сложную смесь, состоящую из лизатов как нейронов, так и глиальных клеток. Инсулиновые рецепторы и функционально связанные с ними протеинкиназы локализованы также в астроцитах, которые, подобно нейронам, могут участвовать в центральной регуляции гомеостаза глюкозы. Основной маркерный белок астроцитов GFAP позволяет оценить их количество в общем лизате. На фоне СД2 в гипоталамусе экспрессия белка GFAP снижалась на 50% ($p < 0.05$), тогда как при лечении ИВИ и ИВГ она восстанавливалась до контрольных значений (рис. 4б). Таким образом, нейронно-глиальные взаимодействия также меняются при СД2 и могут стать причиной нарушений центральной регуляции метаболизма глюкозы.

Akt-киназа фосфорилирует множество мишеней в клетке, среди которых киназа гликогенсинтазы-3 β (GSK3 β). В отличие от печени, где GSK3 β прежде всего влияет на депонирование глюкозы в виде гликогена, в мозге она участвует во множестве процессов. GSK3 β является эффекторной протеинкиназой в патогенезе неврологических и психических нарушений, поскольку одной из ее мишеней является белок Тау, который она гиперфосфорилирует, вызывая накопление нейрофибрилярных клубков и усиливая, тем самым, продукцию провоспалительных цитокинов [42, 43]. Однако при СД2 в гипоталамусе нами не было

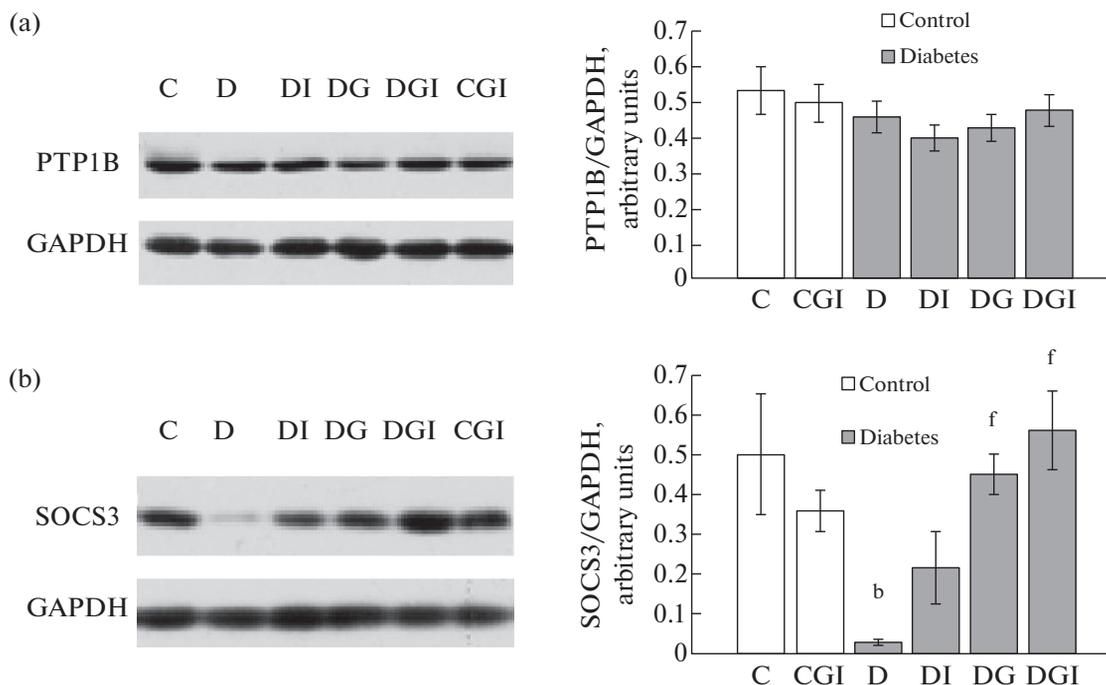


Рис. 3. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на содержание белка PTP1B и SOCS3 в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). (а) – изменение экспрессии PTP1B, (б) – изменение экспрессии SOCS3. Данные представлены как среднее \pm SEM ($n = 7$). Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: b – $p < 0.01$. Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (D) при: f – $p < 0.001$.

выявлено различий в количестве неактивной формы фермента – фосфо-GSK3 β (Ser⁹) между группами К и Д (рис. 4с). Значительно менялся уровень фосфорилирования по Ser⁹ лишь при введении ИВГ. При совместном введении ИВГ и ИВИ контрольным крысам количество фосфо-GSK3 β (Ser⁹) увеличивалось в 2 раза по сравнению с интактным контролем ($p < 0.05$). В диабетических группах ДГ и ДГИ оно повышалось в среднем на 60% по сравнению с группой Д ($p < 0.05$). Интраназальное введение инсулина (ИВИ) диабетическим крысам существенно не влияло на фосфорилирование GSK3 β по Ser⁹ (рис. 4с).

Протеинкиназа p70S6K в комплексе с mTOR рассматривается в качестве интегрирующего звена, реагирующего на изменения содержания как гормональных факторов, так и глюкозы. Как было установлено, p70S6K, локализованная в проопиомеланокортин-экспрессирующих нейронах гипоталамуса, оказывает влияние на синтез глюкозы в печени, метаболизм липидов на периферии, модулирует возбудимость нейронов [44]. Анализ лизатов гипоталамуса в группе Д показал, что уровень фосфорилирования p70S6K по Thr³⁸⁹ увеличивает-

ся в 2.3 раза по сравнению с контролем ($p < 0.01$) (рис. 5а). Сходные изменения отмечали при совместных введениях инсулина и ганглиозидов контрольным (КГИ) и диабетическим крысам (ДГИ) ($p < 0.01$). В группах ДИ и ДГ при отдельном введении препаратов отношение ph-p70S6K(Thr³⁸⁹)/p70S6K снижалось по сравнению с группой Д ($p < 0.05$). Для групп ДИ и ДГ содержание фосфорилированной формы p70S6K не отличалось от контроля. Таким образом, СД2 влияет на активность p70S6K в гипоталамусе, причем ИВИ и ИВГ оказывают на этот фермент модулирующее воздействие.

Протеинкиназа ERK1/2, регулируемая внеклеточными сигналами, активируется инсулином и другими ростовыми факторами, что важно в периоды ремиссии при диабете [45]. В группе Д не было выявлено различий в степени фосфорилирования этого фермента в сравнении с контролем (рис. 5б). В то же время при введении ИВГ и комбинации ИВГ + ИВИ количество фосфорилированной формы ERK1/2 увеличивалось в среднем на 40%, хотя различия с группой Д не были значимыми. Активность АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), основного энергетического сенсора клетки, увеличивается при фосфорилировании

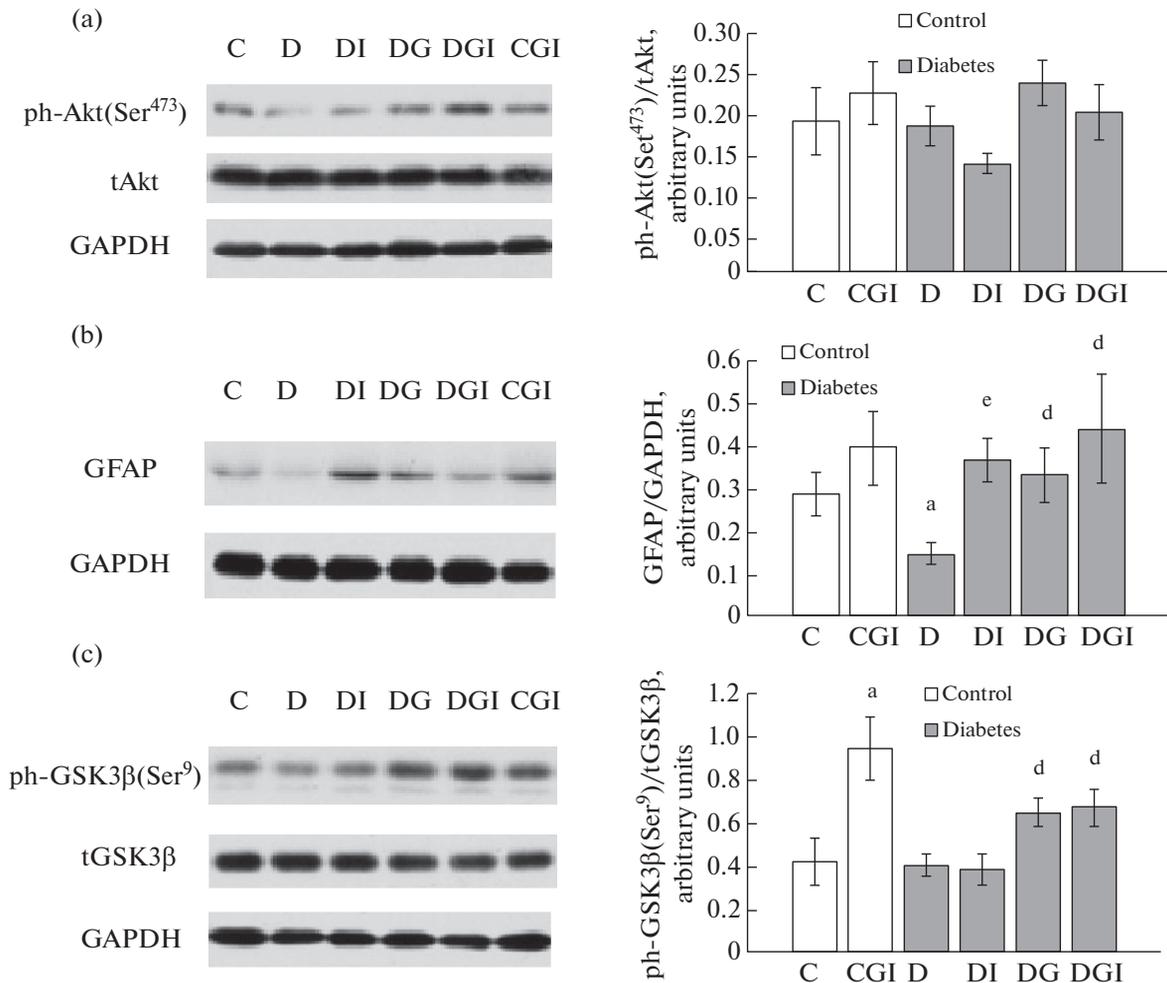


Рис. 4. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на уровень фосфорилирования протеинкиназ Akt, GSK3 β и экспрессию GFAP в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (C) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). (a) – фосфорилирование Akt-киназы по Ser⁴⁷³, (b) – экспрессия GFAP, (c) – фосфорилирование киназы GSK3 β по Ser⁹. Данные представлены как среднее \pm SEM ($n = 7$). Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: a – $p < 0.05$. Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) при: d – $p < 0.05$; e – $p < 0.01$.

α -субъединицы по остатку Thr¹⁷². Показано, что в гипоталамусе крыс группы Д содержание фосфорной формы этого фермента было повышено (1.486 ± 0.120 в сравнении с контролем (1.083 ± 0.065 усл.ед.) ($p < 0.05$) (рис. 5с). Хотя уровень фосфорилирования Thr¹⁷² снижился при всех типах лечения, но значимыми различия были только после лечения ИВИ (рис. 5с).

Изменения активности ключевых протеинкиназ и экспрессии белков, связанных с инсулиновой сигнальной системой в гипоталамусе, взаимосвязаны с регуляцией метаболизма глюкозы на периферии, прежде всего в печени. Для изучения центрального влияния ИВИ и ИВГ на процессы обмена

на глюкозы в печени определяли экспрессию основного транспортера глюкозы *Glut2*, а также генов глюконеогенеза (*Pck1*, *G6pc*, *Fbp1*) и липогенеза (*Fasn*).

Хотя основной локализованный в печени транспортер глюкозы *Glut2* не является инсулин-зависимым, но при совместном введении ИВИ и ИВГ экспрессия гена *Glut2* в группе КГИ достоверно повышалась по сравнению с группой К и в группе ДГИ по сравнению с группой Д ($p < 0.05$) (рис. 6а). Это может способствовать повышению эффективности утилизации глюкозы гепатоцитами печени.

В печени синтезируется 90% всей глюкозы, поступающей в кровоток. Нарушение центральной

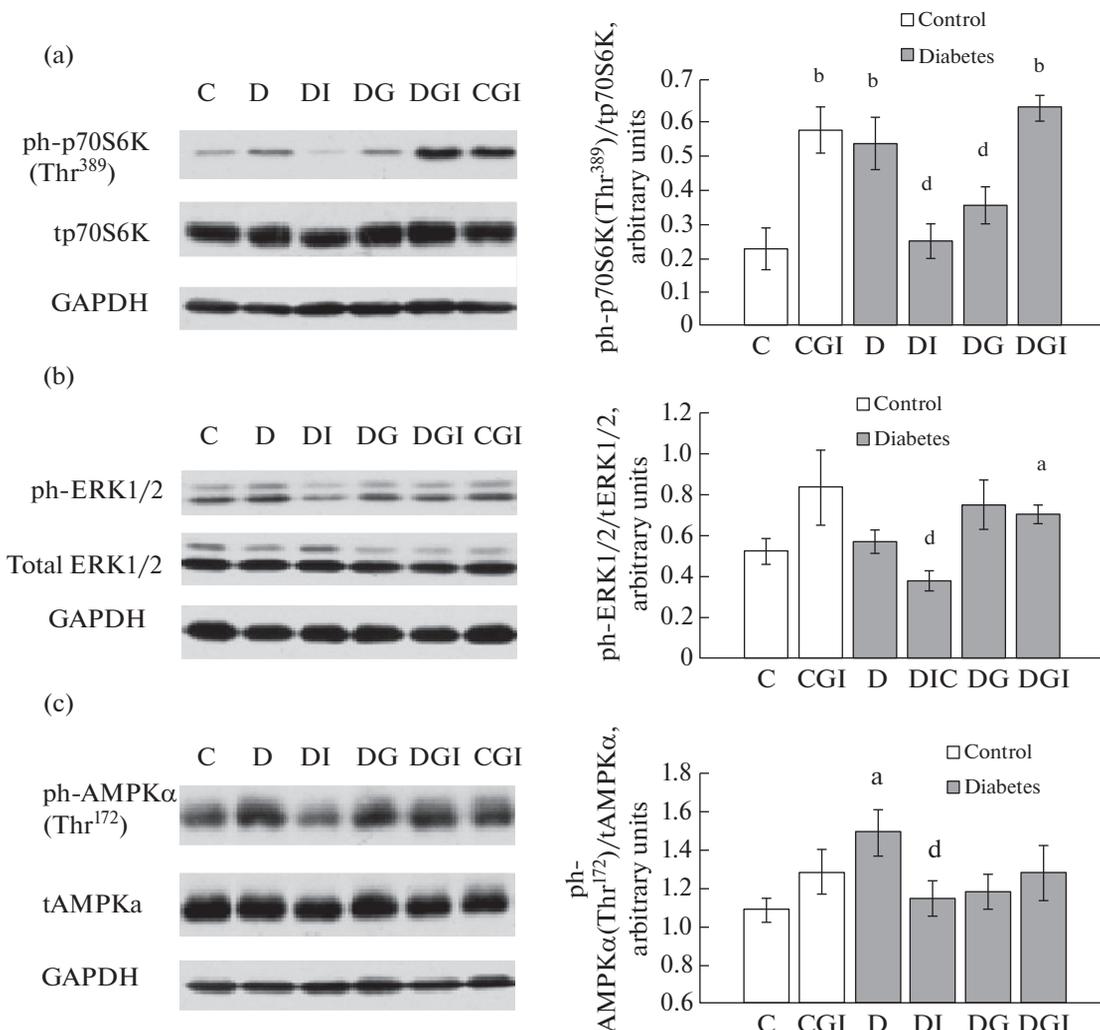


Рис. 5. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на уровень фосфорилирования протеинкиназ p70S6K, ERK1/2 и AMPK в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ). (а) – фосфорилирование p70S6K-киназы по Thr³⁸⁹, (б) – фосфорилирование ERK1/2 киназы по Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ и Thr¹⁸⁶/Tyr¹⁸⁷, (с) – фосфорилирование киназы AMPK по Thr¹⁷². Данные представлены как среднее \pm SEM ($n = 7$). Различия значимы по сравнению с группой К при: а – $p < 0.05$; б – $p < 0.01$. Различия значимы по сравнению с группой Д при: d – $p < 0.05$.

регуляция глюконеогенеза является одной из первопричин гипергликемии при СД2. Для оценки влияния ИВИ и ИВГ на глюконеогенез в печени оценивали уровень мРНК для ключевых ферментов глюконеогенеза: фосфоенолпируваткарбоксикиназы PEPCK (ген *PEPCK*), глюкозо-6-фосфатазы (*G6PC*) и фруктозо-бис-фосфатазы (*FBP*). Для PEPCK, катализирующего превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват, одну из начальных стадий синтеза глюкозы *de novo* из лактата и пирувата, не наблюдалось увеличения экспрессии в группе Д по сравнению с контролем. Тем не менее

монотерапия ИВГ и совместное использование ИВИ и ИВГ способствовали снижению содержания мРНК *PEPCK* по сравнению с группой Д с 0.87 ± 0.08 отн.ед. до 0.61 ± 0.05 отн.ед. в группе ДГ ($p < 0.05$) и 0.57 ± 0.04 отн.ед. в группе ДГИ ($p < 0.01$) (рис. 6b). ИВИ и ИВГ также подавляли экспрессию *PEPCK* в группе КГИ ($p < 0.05$). В случае фермента FBP, катализирующего отщепление фосфогруппы от фруктозо-1,6-бисфосфата, уровень мРНК гена *FBP* не менялся ни в одной из изученных групп. Для гена *G6PC*, кодирующего конечный фермент в цепи глюконеогенеза, содержание

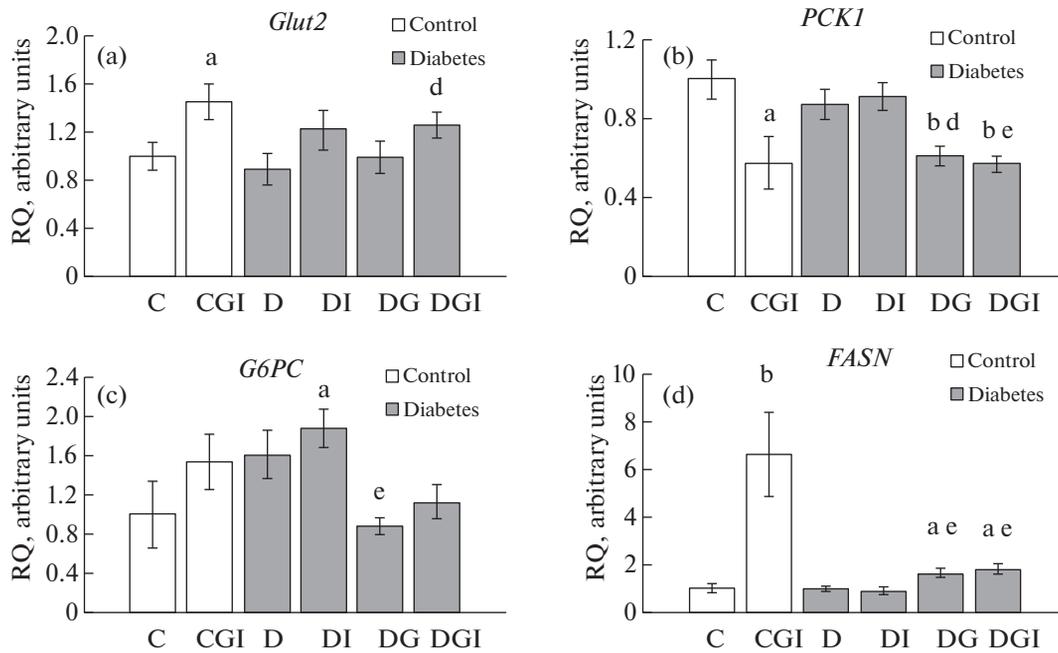


Рис. 6. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на экспрессию генов метаболизма глюкозы в печени крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ).

(а) – экспрессия гена транспортера глюкозы *Glut2*. (б) – экспрессия гена фосфоенолпируваткарбоксикиназы (*Pck1*). (с) – экспрессия гена субъединицы 1 глюкозо-6-фосфатазы (*G6pc*). (д) – экспрессия гена синтазы жирных кислот (*FASN*). Уровень экспрессии генов нормирован по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. Данные представлены как среднее \pm SEM ($n = 9$). Различия значимы по сравнению с группой К при: а – $p < 0.05$; б – $p < 0.01$. Различия значимы по сравнению с группой Д при: д – $p < 0.05$; е – $p < 0.01$.

мРНК уменьшалось у диабетических крыс после введения ИВГ и ИВИ+ИВГ, хотя по сравнению с группой Д различия были значимы только для группы ДГ (рис. 6с).

Депонирование глюкозы осуществляется за счет интенсивного синтеза гликогена и жирных кислот. В печени крыс группы КГИ отмечали значительный рост экспрессии синтазы жирных кислот *FASN*, что указывает на доминирование процесса липогенеза (рис. 6д). Следует отметить, что центральное влияние ганглиозидов по сравнению с инсулином является преобладающим, так как эффект, хоть и в меньшей мере, сохранялся при СД2 в группах ДГ и ДГИ (рис. 6д).

Толерантность к глюкозе нарушается также вследствие усиления воспалительных процессов в ЦНС. В гипоталамусе крыс с СД2 наблюдалось двукратное увеличение экспрессии мРНК провоспалительного цитокина *IL1 β* ($p < 0.05$), тогда как ганглиозиды при раздельном введении, а также в комплексе с инсулином полностью предотвращали его накопление (рис. 7а).

Совместное введение ИВГ и ИВИ значимо ($p < 0.05$) снижало базальный уровень мРНК *IL1 β*

в гипоталамусе здоровых животных группы КГИ, что свидетельствует о возможности использования такой комбинации в качестве противовоспалительных препаратов при нейродегенеративных заболеваниях. Параллельно с воспалением снижался защитный потенциал ЦНС. С помощью иммуногистохимии было установлено, что в вентромедиальном ядре гипоталамуса оптическая плотность иммунопозитивных на важнейший трофический фактор BDNF структур при СД2 уменьшается в 2 раза – с 0.96 ± 0.17 в контроле (К) до 0.47 ± 0.06 при СД2 (Д) ($p < 0.05$) (рис. 7б, 7с). ИВИ и ИВГ, подавляя воспалительные процессы в ЦНС при СД2, способствовали восстановлению количества BDNF до его уровня в контрольной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наряду с инсулиновой системой мозга другие сигнальные системы, в том числе лептиновая, меланокортиновая, дофаминовая, серотониновая, играют ключевую роль в регуляции метаболизма глюкозы, пищевого поведения и энергетического обмена. Даже незначительный дисбаланс в их работе может стать причиной, приводящей к разви-

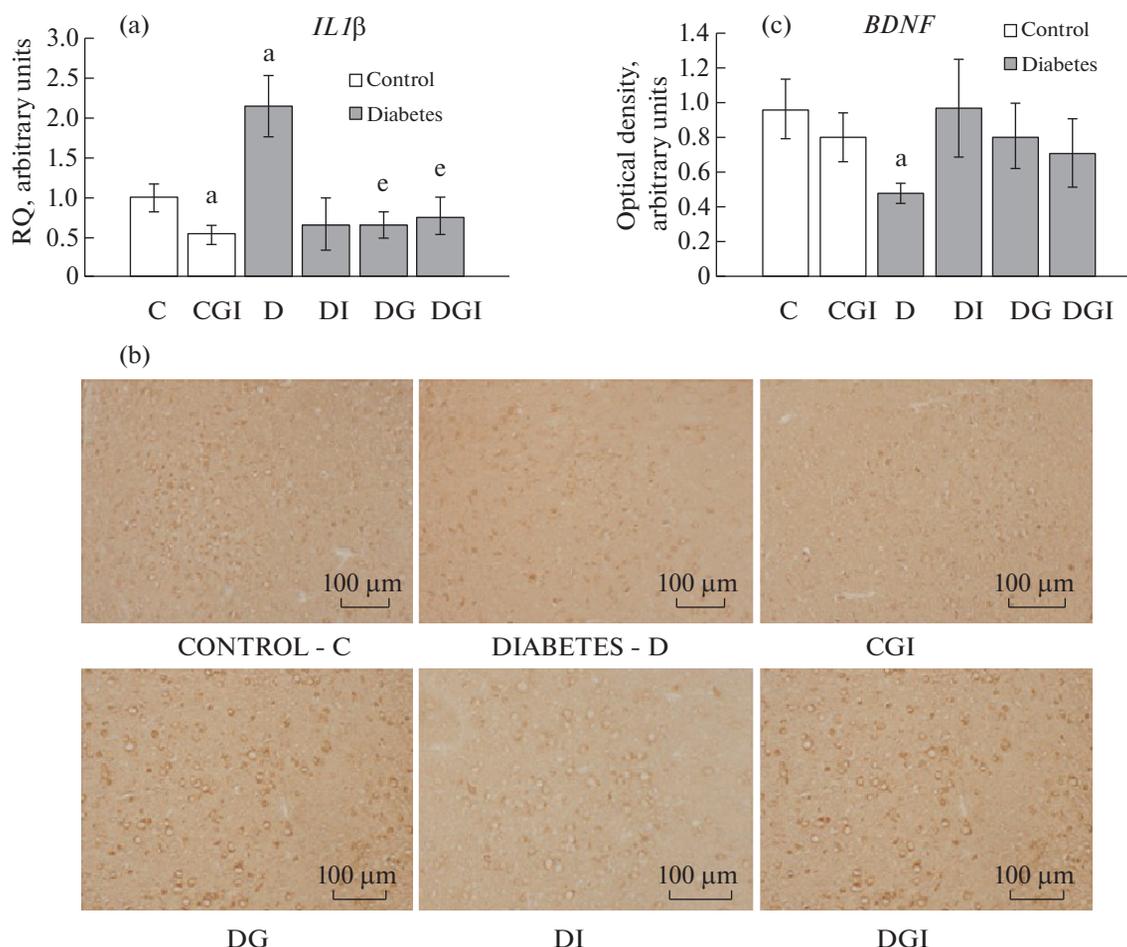


Рис. 7. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при отдельном и совместном введении на экспрессию цитокина IL1 β и BDNF в гипоталамусе крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина.

Обозначения групп на рисунке: группа 1 (С) – контроль (К), группа 2 (CGI) – контроль + ИВГ + ИВИ (КГИ), группа 3 (D) – диабет (Д), группа 4 (DI) – диабет + ИВИ (ДИ), группа 5 (DG) – диабет + ИВГ (ДГ), группа 6 (DGI) – диабет + ИВГ + ИВИ (ДГИ).

(а) – экспрессия гена IL1 β в гипоталамусе, определяемая по количеству мРНК с помощью ПЦР-РВ. Уровень экспрессии гена IL1 β нормирован по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. Данные представлены как среднее \pm SEM ($n = 7$). (б) – экспрессия BDNF, выявляемая по иммуногистохимической реакции со специфическим антителом. (с) – количественная оценка экспрессии нейротрофического фактора BDNF. Различия значимы по сравнению с группой К при: а – $p < 0.05$. Различия значимы по сравнению с группой Д при: е – $p < 0.01$.

тию ожирения, метаболического синдрома и СД2 [22, 46–49]. Благодаря выявлению этого дисбаланса на ранних стадиях и его своевременной коррекции возможно предотвратить нарушения метаболизма в нервной, сердечно-сосудистой и других системах организма.

Лептин и активируемая им сигнальная система в мозге участвуют как в регуляции гомеостаза глюкозы, так и повышают чувствительность нейронов и периферических тканей к инсулину [50–52]. Введение лептина интрацеребровентрикулярно или непосредственно в гипоталамическую область приводит к нормализации уровня глюкозы в крови

животных с различными формами диабета [52–55], и это ассоциировано с активацией автономной нервной системы, иннервирующей печень [56]. Инсулин и лептин, как было показано, оказывают свое действие через одни и те же сигнальные пути в гипоталамических нейронах [47, 57, 58]. Развитие ИР в мозге связывают с увеличением экспрессии и активности фосфатазы РТР1В [59, 60]. Однако в настоящем исследовании нами не было выявлено значимых изменений в содержании РТР1В в гипоталамусе при СД2 (рис. 3а). Это может быть обусловлено снижением уровня инсулина в гипоталамусе и других отделах мозга, как показано нами ра-

нее в условиях ИР [22, 61]. Косвенно в пользу этого свидетельствует довольно неожиданное и сильно выраженное снижение в гипоталамусе диабетических крыс экспрессии белка SOCS3, негативного регулятора лептинового сигналинга (рис. 3б). Такое снижение может способствовать усилению лептиновой, а опосредованно и инсулиновой сигнальных систем в условиях дефицита инсулина и лептина в ЦНС. Эти результаты позволяют понять, почему при совместном использовании лептина и инсулина для нормализации уровня глюкозы у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, доза инсулина может быть значительно снижена по сравнению с пациентами, не получающими лептин [62].

Активность как лептиновой, так и инсулиновой сигнальных систем в нейронах гипоталамуса нередко модулируется одними и теми же факторами, к числу которых принадлежат и гликофинголипиды ганглиозиды. Они осуществляют свое действие через мембранные микродомены и липидные рафты, в которых локализованы рецепторы инсулина и лептина [38, 63, 64]. На основании этого мы предположили, что совместное интраназальное введение ганглиозидов и инсулина может способствовать улучшению инсулинового сигналинга при СД2, а также, с учетом взаимосвязи инсулиновых и лептиновых путей, повысить чувствительность гипоталамических нейронов к лептину.

Имеются многочисленные свидетельства, включая наши исследования, что ганглиозиды оказывают выраженное нейропротекторное действие на структуры мозга, что показано как на моделях *in vitro*, так и *in vivo* [36, 65–70]. Если *in vitro* ганглиозиды активны в широком диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ, то до настоящего времени *in vivo* животным вводят от 30 до 100 мг/кг/сутки внутримышечно, интраперитонеально или в виде подкожных инъекций, а также 5 мг/кг/сутки – интрацеребровентрикулярно [36]. Тем не менее, как было установлено, общее количество экзогенных ганглиозидов, проникающих в мозг, не превышает 1% и может достигать от 0.3 до 1 мг, что соответствует микромолярным концентрациям. Защитные свойства ганглиозидов, особенно *in vivo*, обусловлены их воздействием не только на нейроны, но и на клетки микроглии, что приводит к подавлению воспалительных процессов [71]. В пользу этого свидетельствует результат ИВГ, нормализующих повышенное при СД2 содержание мРНК для провоспалительного интерлейкина IL-1 β в гипоталамусе (рис. 7а). Тем самым, апробированный нами интраназальный способ введения ганглиозидов показал свою эффективность при СД2, что обусловлено способностью ганглиозидов при такой разновидности доставки легко достигать различных структур мозга. На это указывают и результаты недавно проведенного исследования, авторы кото-

рого показали, что ежедневные интраназальные введения ганглиозидов GM1 мышам, нокаутным по GM2-синтазе, у которых отсутствует эндогенный GM1, в количестве 0.5 и 5 мг/кг/сутки приводят к его накоплению в коре, среднем мозге, обонятельных луковицах, субвентрикулярной зоне, гиппокампе и мозжечке, хотя и не достигают уровня экспрессии, характерного для нормальных животных [72]. Способность ганглиозидов эффективно проникать в мозг при интраназальном способе введения обуславливает и обнаруженный ранее положительный эффект ИВГ (6 мг/кг/сутки) на когнитивный дефицит у крыс с неонатальной моделью СД2 [34]. Увеличение дозы ганглиозидов до 6 мг/кг связано с тем, что мы применяли суммарный препарат, а не фракцию GM1, как описано в работе [72]. Следует отметить, что наблюдаемая нами нормализация метаболических показателей у крыс с СД2 при их лечении ИВИ и ИВГ, как отдельно, так и совместно (табл. 2), является следствием восстановления центральной регуляции метаболизма глюкозы путем подавления нейровоспаления, а также в результате улучшения чувствительности тканей к инсулину. Используя в качестве критерия уровень экспрессии SOCS3 в гипоталамусе, можно предположить, что при лечении ИВИ и ИВГ инсулиновый сигналинг восстанавливается, что делает излишним снижение содержания SOCS3 для компенсации нарушений инсулиновой и лептиновой сигнальных систем.

Для выявления возможных мишеней действия инсулина и ганглиозидов в гипоталамусе мы оценивали экспрессию инсулинового рецептора (*InsR*) по уровню мРНК и связывали ее с метаболическими показателями. Сопоставляя результаты оГТТ и измерения экспрессии *InsR*, можно прийти к заключению, что нарушение метаболических показателей не коррелирует с экспрессией *InsR* в гипоталамусе, что вызвано, как можно полагать, отсутствием взаимосвязи между уровнем инсулина в мозге и в крови при СД2 и дефицитом инсулина и лептина в ЦНС, как следствие нарушения его рецептор-опосредованного транспорта через гематоэнцефалический барьер. Так, содержание мРНК *InsR* достоверно снижалось по сравнению с группой К при совместных введениях инсулина и ганглиозидов диабетическим (ДГИ) и контрольным животным (КГИ), что может быть вызвано гиперактивацией инсулинового рецептора интраназально вводимым гормоном. Кроме того, необходимо принимать во внимание тот факт, что инсулиновый рецептор является сложной динамичной макромолекулой, которая после связывания с агонистом и последующей активации за счет эндоцитоза перемещается в ранние эндосомы [73, 74]. Следовательно, после совместного воздействия ИВГ и

ИВИ значительно больше рецепторов может возвращаться в плазматическую мембрану, а не претерпевать деградацию в поздних эндосомах, что и снижает необходимость в высоком содержании мРНК *InsR*.

Активируемый через инсулиновый и лептиновый рецепторы фосфатидилинозитол-3-киназа/Akt-киназа-сигнальный путь в гипоталамических нейронах является важнейшим эффекторным звеном, ответственным как за метаболизм глюкозы, так и за регуляцию пищевого поведения [75]. При СД2 и метаболических расстройствах в гипоталамусе наблюдается снижение активности Akt-киназы, ассоциированное с уменьшением уровня фосфорилирования по одному из ключевых сайтов фермента [23–26]. Отсутствие значимых изменений фосфорилирования Akt-киназы в наших экспериментах может быть обусловлено продолжительностью эксперимента. Моделирование метаболических расстройств *in vitro* показало, что при воздействии пальмитата в культуре нейронов гипоталамуса уровень фосфорилирования Akt-киназы на начальном этапе увеличивается и только на поздних этапах снижается [76], что в опытах *in vivo* возможно происходит в сроки более 5 мес после перевода животных на ВЖД. Наряду с этим наблюдаемый нами уровень фосфорформы Akt-киназы является усредненным совокупным показателем по нейрональным и глиальным клеткам. Инсулиновый сигналинг также активен в астроцитах и рассматривается как корегулятор сенсорной системы гипоталамуса, контролирующей уровень глюкозы и ее системный метаболизм [77]. Учитывая, что экспрессия маркерного белка астроцитов GFAP снижается при СД2 (рис. 4b), можно ожидать, что СД2 влияет на нейронально-глиальные взаимодействия и, как следствие, на активность Akt-киназы в различных популяциях клеток. Изучение характера этих изменений при СД2 по отдельности в гипоталамических нейронах и в глиальных клетках требует более детальных исследований. Благодаря применению ИВГ, как отдельно, так и совместно с инсулином, в гипоталамусе повышается уровень ингибирующего фосфорилирования GSK3 β по Ser⁹ (рис. 4c), что может иметь большое практическое значение. К числу субстратов GSK3 β в мозге принадлежат инсулиновый рецептор, IRS, tau-белок, при фосфорилировании которых нарушается инсулиновый сигналинг и метаболизм β -амилоидного пептида [78, 79]. Таким образом, интраназальное введение ганглиозидов могут оказывать эффективными не только при болезни Паркинсона [72], но и при болезни Альцгеймера. Следует отметить, что ИВГ оказывают помимо локального влияния на активность GSK3 β и системное действие, поскольку аналогичный эффект наблюдается на периферии в ткани

печени, что было показано нами ранее [80]. Изменение уровня фосфорилирования GSK3 β по Ser⁹ в гипоталамусе и печени может использоваться в дальнейшем для апробации различных доз ганглиозидов.

Комплекс mTOR(the mammalian target of rapamycin)/p70S6K в гипоталамических нейронах интегрирует сигнальные пути, активируемые как гормонами (инсулином, лептином), так и нутриентами, среди которых глюкоза и аминокислоты [44, 81–83]. Для p70S6K характерны высокая концентрация в ЦНС и участие в процессах биогенеза рибосом, контроле транскрипции генов и размера клеток, а также в регуляции инсулинового сигналинга [84, 85]. Несмотря на то что данные о роли p70S6K в развитии метаболических патологий противоречивы, общепризнанным является факт влияния p70S6K на метаболизм глюкозы, пищевое поведение и энергетический обмен [44, 82, 83, 86]. В наших экспериментах наибольший уровень фосфорилирования p70S6K по Thr³⁸⁹ наблюдался при одновременном введении ИВИ и ИВГ контрольным и диабетическим животным (КГИ и ДГИ), а также в гипоталамусе диабетических крыс без лечения (Д) (рис. 5a). Поскольку на фоне персистентной активации p70S6K в отдельных районах гипоталамуса при трансфекции каталитически активной формы фермента у животных наблюдаются снижение массы тела и повышение чувствительности тканей к инсулину [83], то совместное введение ИВИ и ИВГ, по-видимому, обеспечивает максимальную эффективность в передаче сигнала на периферию для контроля метаболизма, тогда как у крыс группы Д такая взаимосвязь отсутствует. Комплекс mTOR/p70S6K способен фосфорилировать IRS по остаткам Ser, подавляя инсулиновый сигналинг по механизму отрицательной обратной связи [87]. Способность ИВИ и ИВГ предотвращать ингибирующее фосфорилирование IRS-белков по остаткам Ser в гипоталамусе при СД2, требует дальнейших исследований.

Активацию киназы, регулируемой внеклеточными сигналами, ERK1/2 при совместных ИВИ и ИВГ диабетическим животным (рис. 5b) также можно рассматривать как позитивный эффект, поскольку каскад митогенактивируемых протеинкиназ, включающий ERK1/2, играет важную роль в процессе ремиссии при метаболических расстройствах и вовлечен в нормализацию глюкозного гомеостаза [45].

Несмотря на выраженную гипергликемию на периферии, в гипоталамусе при СД2 наблюдается состояние энергетического дефицита, что и является причиной активации энергетического сенсора АМПК (рис. 5c). Гипогликемия в мозге развивается при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, называемую также диабетом

3-го типа [79, 88]. Возникновение центральной гипогликемии связывают с изменением экспрессии транспортеров глюкозы GLUT-1 и GLUT-3, внутриклеточными метаболическими дисфункциями, нарушениями метаболизма тиамина, модификацией церебральных сенсоров, таких как глюкокиназа. Проведенные нами иммуногистохимические исследования показали снижение экспрессии GLUT-3 в вентромедиальном ядре гипоталамуса у крыс с СД2, причем совместное введение ИВИ и ИВГ ее восстанавливало (данные не представлены). Поскольку основная часть глюкозы поступает в мозг через астроциты и транспортер GLUT-1, то нельзя исключить, что ИВИ и ИВГ способствуют восстановлению взаимодействий между нейронами и глией, что косвенно подтверждают наши данные по экспрессии маркерного белка глиальных клеток GFAP (рис. 4b).

Нарушение центральной регуляции метаболизма глюкозы является одной из причин повышения ее уровня натощак при СД2 [1, 4, 5, 89]. Гипергликемия возникает не только вследствие сниженной скорости поглощения глюкозы тканями, но и в результате усиления глюконеогенеза в печени [90]. В то же время изучение экспрессии ключевых генов глюконеогенеза (*PCSK*, *G6PC* и *FBP*) в печени крыс с СД2 не выявило значимых их изменений по сравнению с контрольными животными (рис. 6b,c). Однако лечение ИВГ+ИВИ снижало экспрессию *PERPCK* (ген *PCSK*) как у контрольных (КГИ), так и у диабетических крыс (ДГИ). Фермент *PERPCK* катализирует одну из начальных стадий глюконеогенеза, поэтому изменение экспрессии его гена может в большей мере влиять на скорость синтеза глюкозы по сравнению с другими изученными генами глюконеогенеза (*G6PC*, *FBP*). Вариации в экспрессии гена *G6PC* могут приводить к более сложному паттерну изменений продукции глюкозы, поскольку кодируемая им глюкоза-6-фосфатаза не только участвует в синтезе глюкозы *de novo*, но и определяет ее локализацию [90]. Так как глюкоза удерживается в клетке только в фосфорилированном состоянии, то активность глюкоза-6-фосфатазы и экспрессия ее гена *G6PC* должны рассматриваться в совокупности с активностью киназ, катализирующих фосфорилирование глюкозы, например, глюкокиназы. Тем не менее наблюдаемое нами снижение экспрессии гена *G6PC* в печени диабетических животных как при лечении ИВГ, так и при совместном лечении ИВГ и ИВИ свидетельствует о том, что подавляется не только глюконеогенез, но и вероятность перехода глюкозы из фосфорформы в свободную, нефосфорилированную форму и ее дальнейшая диффузия из клетки. Благодаря лечению ИВГ+ИВИ увеличивается содержание мРНК основного транспортера глюкозы в печени *GLUT2*

и синтазы жирных кислот *FASN* (рис. 6a,d). Таким образом, совместное использование инсулина и ганглиозидов через посредство ЦНС усиливает обменные процессы глюкозы в печени.

Инсулин и ганглиозиды способны восстанавливать содержание важнейшего ростового и трофического фактора BDNF в гипоталамусе, сниженную при СД2 (рис. 7b,c). BDNF, как известно, за счет усиления локального белкового синтеза оказывает влияние на синаптическую пластичность [91]. Это может лежать в основе мощного нейропротекторного эффекта ИВГ, ИВИ и их комбинации, и хорошо согласуется с данными о восстановлении этими препаратами когнитивных функций, нарушенных при неонатальной модели СД2 у крыс [34].

Подводя итоги, следует отметить, что совместные интраназальные введения инсулина и ганглиозидов крысам с СД2 позволяют добиться восстановления толерантности к глюкозе, улучшения чувствительности тканей к инсулину, а также усиления обменных процессов и подавления глюконеогенеза в печени, влияя на экспрессию ключевых генов глюконеогенеза в гепатоцитах. Это происходит во многом благодаря центральному синхронизированному влиянию инсулина и ганглиозидов на функциональную активность ключевых белков инсулинового сигналинга (*GSK3 β* , *p70S6K*, *ERK1/2*, *AMPK*) в гипоталамусе, а также восстановлению экспрессии BDNF в гипоталамических нейронах.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ ИЭФБ РАН (№ 075-0152-22-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Petersen MC, Shulman GI* (2018) Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98: 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

2. *Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S* (2014) Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 383: 1068–1083. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
3. *Schwartz MW, Seeley RJ, Tschöp MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, D'Alessio D* (2013) Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature* 503: 59–66. <https://doi.org/10.1038/nature12709>
4. *Alonge KM, D'Alessio DA, Schwartz MW* (2021) Brain control of blood glucose levels: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia* 64: 5–14. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05293-3>
5. *Myers MG Jr, Affinati AH, Richardson N, Schwartz MW* (2021) Central nervous system regulation of organismal energy and glucose homeostasis. *Nat Metab* 3: 737–750. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00408-5>
6. *Banks WA, Jaspán JB, Kastin AJ* (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18: 1257–1262. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(97\)00198-8](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(97)00198-8)
7. *Banks WA* (2004) The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 490: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.040>
8. *Rhea EM, Banks WA* (2021) A historical perspective on the interactions of insulin at the blood-brain barrier. *J Neuroendocrinol* 33: e12929. <https://doi.org/10.1111/jne.12929>
9. *Kumar MP, Cremer AL, Klemm P, Steuernagel L, Sundaram S, Jais A, Hausen AC, Tao J, Secher A, Pedersen TÅ, Schwaninger M, Wunderlich FT, Lowell BB, Backes H, Brüning JC* (2021) Insulin signalling in tanycytes gates hypothalamic insulin uptake and regulation of AgRP neuron activity. *Nat Metab* 3: 1662–1679. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00499-0>
10. *Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, McKinley MJ, Figdor R, Allen AM, Mendelsohn FA* (1987) Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121: 1562–1570. <https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1562>
11. *Unger JW, Betz M* (1998) Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: a review on morphological findings and functional implications. *Histol Histopathol* 13: 1215–1224. <https://doi.org/10.14670/HH-13.1215>
12. *Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB* (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 855–872. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00040-3](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00040-3)
13. *Cai W, Zhang X, Batista TM, García-Martín R, Softic S, Wang G, Ramirez AK, Konishi M, O'Neill BT, Kim JH, Kim JK, Kahn CR* (2021) Peripheral Insulin Regulates a Broad Network of Gene Expression in Hypothalamus, Hippocampus, and Nucleus Accumbens. *Diabetes* 70: 1857–1873. <https://doi.org/10.2337/db20-1119>
14. *Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR* (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122–2125. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2122>
15. *Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L* (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376–1382. <https://doi.org/10.1038/nm1202-798>
16. *Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Rossetti L* (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309: 943–947. <https://doi.org/10.1126/science.1112085>
17. *Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, Cho YR, Chuang JC, Xu Y, Choi M, Lauzon D, Lee CE, Coppari R, Richardson JA, Zigman JM, Chua S, Scherer PE, Lowell BB, Brüning JC, Elmquist JK* (2010) Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab* 11: 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>
18. *Wallum BJ, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D* (1987) Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 190–194. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-190>
19. *Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Schwartz MW* (2000) Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49: 1525–1533. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1525>
20. *Kern W, Benedict C, Schultes B, Plohr F, Moser A, Born J, Fehm HL, Hallschmid M* (2006) Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia* 49: 2790–2792. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0409-y>
21. *Heni M, Schöpfer P, Peter A, Sartorius T, Fritsche A, Synofzik M, Häring HU, Maetzel W, Hennige AM* (2014) Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetol* 51: 679–681. <https://doi.org/10.1007/s00592-013-0546-y>
22. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. *Neurochem Res* 43: 821–837. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
23. *Papazoglou I, Berthou F, Vicaire N, Rouch C, Markaki EM, Bailbe D, Portha B, Taouis M, Gerozissis K* (2012) Hypothalamic serotonin-insulin signaling cross-talk and alterations in a type 2 diabetic model. *Mol Cell Endocrinol* 350: 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.007>
24. *Yang Y, Ma D, Wang Y, Jiang T, Hu S, Zhang M, Yu X, Gong CX* (2013) Intranasal insulin ameliorates tau hyperphosphorylation in a rat model of type 2 diabetes. *J Alzheimers Dis* 33: 329–338. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121294>

25. *Derkach KV, Perminova AA, Buzanakov DM, Shpakov AO* (2019) Intranasal Administration of Proinsulin C-Peptide Enhances the Stimulating Effect of Insulin on Insulin System Activity in the Hypothalamus of Diabetic Rats. *Bull Exp Biol Med* 167: 351–355. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04525-w>
26. *He Y, Zhang C, Luo Y, Chen J, Yang M, Li L, Gu HF, Yang G, Zhang X* (2021) Hypothalamic BMP9 suppresses glucose production by central PI3K/Akt/mTOR pathway. *J Endocrinol* 248: 221–235. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0591>
27. *Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL* (2002) Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5: 514–516. <https://doi.org/10.1038/nn849>
28. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47: 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
29. *Derkach KV, Bondareva VM, Perminova AA, Shpakov AO* (2019) C-peptide and insulin during combined intranasal administration improve the metabolic parameters and activity of the adenylate cyclase system in the hypothalamus, myocardium, and epididymal fat of rats with type 2 diabetes. *Cell Tissue Biol* 13: 228–236. <https://doi.org/10.1134/S1990519X19030039>
30. *Dash S, Xiao C, Morgantini C, Koulajian K, Lewis GF* (2015) Intranasal insulin suppresses endogenous glucose production in humans compared with placebo in the presence of similar venous insulin concentrations. *Diabetes* 64: 766–774. <https://doi.org/10.2337/db14-0685>
31. *Xiao C, Dash S, Stahel P, Lewis GF* (2018) Effects of intranasal insulin on endogenous glucose production in insulin-resistant men. *Diabetes Obes Metab* 20: 1751–1754. <https://doi.org/10.1111/dom.13289>
32. *Mastrototaro L, Roden M* (2021) Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism* 125: 154892. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154892>
33. *Yaribeygi H, Sathyapalan T, Jamialahmadi T, Sahebkar A* (2021) Natural Insulin Sensitizers for the Management of Diabetes Mellitus: A Review of Possible Molecular Mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1328: 401–410. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73234-9_26
34. *Sukhov IB, Lebedeva MF, Zakharova IO, Derkach KV, Bayunova LV, Zorina II, Avrova NF, Shpakov AO* (2020) Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* 168: 317–320. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04699-8>
35. *Schnaar RL* (2016) Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol* 428:3325–3336. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.020>
36. *Sipione S, Monyor J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V* (2020) Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci* 14: 572965. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>
37. *Magistretti PJ, Geisler FH, Schneider JS, Li PA, Fiumelli H, Sipione S* (2019) Gangliosides: Treatment Avenues in Neurodegenerative Disease. *Front Neurol* 10: 859. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00859>
38. *Inamori KI, Inokuchi JI* (2020) Roles of Gangliosides in Hypothalamic Control of Energy Balance: New Insights. *Int J Mol Sci* 21: 5349. <https://doi.org/10.3390/ijms21155349>
39. *Zakharova IO, Avrova NF* (2001) The effect of cold stress on ganglioside fatty acid composition and ganglioside-bound sialic acid content of rat brain subcellular fractions. *J Therm Biol* 26: 215–222. [https://doi.org/10.1016/s0306-4565\(00\)00045-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4565(00)00045-0)
40. *Vanier MT, Holm M, Ohman R, Svennerholm L* (1971) Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *J Neurochem* 18: 81–592. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb11988.x>
41. *Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Effect of Long-Term Intranasal Serotonin Treatment on Metabolic Parameters and Hormonal Signaling in Rats with High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol* 2015: 245459. <https://doi.org/10.1155/2015/245459>
42. *Lovestone S, Davis DR, Webster MT, Kaech S, Brion JP, Matus A, Anderton BH* (1999) Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry* 45: 995–1003. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00183-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00183-8)
43. *Noori T, Dehpour AR, Sureda A, Fakhri S, Sobarzo-Sanchez E, Farzaei MH, Küpeli Akkol E, Khodarahmi Z, Hosseini SZ, Alavi SD, Shirooie S* (2020) The role of glycogen synthase kinase 3 beta in multiple sclerosis. *Biomed Pharmacother* 132: 110874. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110874>
44. *Smith MA, Katsouri L, Irvine EE, Hankir MK, Pedroni SM, Voshol PJ, Gordon MW, Choudhury AI, Woods A, Vidal-Puig A, Carling D, Withers DJ* (2015) Ribosomal S6K1 in POMC and AgRP Neurons Regulates Glucose Homeostasis but Not Feeding Behavior in Mice. *Cell Rep* 11: 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.029>
45. *Brown JM, Bentsen MA, Rausch DM, Phan BA, Wieck D, Wasanwala H, Matsen ME, Acharya N, Richardson NE, Zhao X, Zhai P, Secher A, Morton GJ, Pers TH, Schwartz MW, Scarlett JM* (2021) Role of hypothalamic MAPK/ERK signaling and central action of FGF1 in diabetes remission. *iScience* 24: 102944. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102944>
46. *Shimizu H, Inoue K, Mori M* (2007) The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol* 193: 1–9. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0144>
47. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1: FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>

48. Agrawal R, Reno CM, Sharma S, Christensen C, Huang Y, Fisher SJ (2021) Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 321: E156–E163. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2020>
49. Tavares G, Marques D, Barra C, Rosendo-Silva D, Costa A, Rodrigues T, Gasparini P, Melo BF, Sacramento JF, Seica R, Conde SV, Matafome P (2021) Dopamine D2 receptor agonist, bromocriptine, remodels adipose tissue dopaminergic signalling and upregulates catabolic pathways, improving metabolic profile in type 2 diabetes. *Mol Metab* 51: 101241. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101241>
50. Morton GJ, Schwartz MW (2011) Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* 91: 389–411. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2010>
51. Coppari R, Bjorbaek C (2012) Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 11: 692–708. <https://doi.org/10.1038/nrd3757>
52. Fujikawa T (2021) Central regulation of glucose metabolism in an insulin-dependent and -independent manner. *J Neuroendocrinol* 33: e12941. <https://doi.org/10.1111/jne.12941>
53. German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh-I S, Sarruf DA, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ Jr, Schwartz MW, Morton GJ (2011) Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 152: 394–404. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0890>
54. Li X, Wu X, Camacho R, Schwartz GJ, LeRoith D (2011) Intracerebroventricular leptin infusion improves glucose homeostasis in lean type 2 diabetic MKR mice via hepatic vagal and non-vagal mechanisms. *PLoS One* 6: e17058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017058>
55. Fan S, Xu Y, Lu Y, Jiang Z, Li H, Morrill JC, Cai J, Wu Q, Xu Y, Xue M, Arenkiel BR, Huang C, Tong Q (2021) A neural basis for brain leptin action on reducing type 1 diabetic hyperglycemia. *Nat Commun* 12: 2662. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22940-4>
56. Tanida M, Yamamoto N, Morgan DA, Kurata Y, Shibamoto T, Rahmouni K (2015) Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 35: 474–484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-14.2015>
57. Varela L, Horvath TL (2012) Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 13: 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
58. Huang Y, He Z, Gao Y, Lieu L, Yao T, Sun J, Liu T, Javadi C, Box M, Afrin S, Guo H, Williams KW (2018) Phosphoinositide 3-Kinase Is Integral for the Acute Activity of Leptin and Insulin in Male Arcuate NPY/AgRP Neurons. *J Endocr Soc* 2: 518–532. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00061>
59. Zhang ZY, Dodd GT, Tiganis T (2015) Protein Tyrosine Phosphatases in Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling. *Trends Pharmacol Sci* 36: 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.003>
60. Ono H (2019) Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 20: 1317. <https://doi.org/10.3390/ijms20061317>
61. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14: e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
62. Vasandani C, Clark GO, Adams-Huet B, Quittner C, Garg A (2017) Efficacy and Safety of Metreleptin Therapy in Patients With Type 1 Diabetes: A Pilot Study. *Diabetes Care* 40: 694–697. <https://doi.org/10.2337/dc16-1553>
63. Simons K, Gerl MJ (2010) Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977>
64. Komura N, Suzuki KG, Ando H, Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol* 12: 402–410. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2059>
65. Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmashuk EV, Tyurina YY, Gonchar VS (1998) Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23: 945–952. <https://doi.org/10.1023/a:1021076220411>
66. Sokolova TV, Zakharova IO, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2007) Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochem Res* 32: 1302–1313. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9304-2>
67. Schneider JS, Gollomp SM, Sendek S, Colcher A, Cambi F, Du W (2013) A randomized, controlled, delayed start trial of GM1 ganglioside in treated Parkinson's disease patients. *J Neurol Sci* 324: 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.10.024>
68. Zakharova IO, Sokolova TV, Vlasova YA, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2014) GM1 ganglioside activates ERK1/2 and Akt downstream of Trk tyrosine kinase and protects PC12 cells against hydrogen peroxide toxicity. *Neurochem Res* 39: 2262–2275. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1428-6>
69. Fazzari M, Lunghi G, Chiricozzi E, Mauri L, Sonnino S (2022) Gangliosides and the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Long Italian Tradition. *Biomedicines* 10: 363. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020363>

70. Wang X, Li B, Yu X, Zhou Y, Gao Y (2022) The Neuroprotective Effect of GM-1 Ganglioside on the Amyloid- β -Induced Oxidative Stress in PC-12 Cells Mediated by Nrf-2/ARE Signaling Pathway. *Neurochem Res* 47: 2405–2415.
<https://doi.org/10.1007/s11064-022-03635-8>
71. Galleguillos D, Wang Q, Steinberg N, Zaidi A, Shrivastava G, Dhami K, Daskhan GC, Schmidt EN, Dworsky-Fried Z, Giuliani F, Churchward M, Power C, Todd K, Taylor A, Macauley MS, Sipione S (2022) Anti-inflammatory role of GM1 and other gangliosides on microglia. *J Neuroinflammation* 19: 9.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02374-x>
72. Itokazu Y, Fuchigami T, Morgan JC, Yu RK (2021) Intranasal infusion of GD3 and GM1 gangliosides downregulates alpha-synuclein and controls tyrosine hydroxylase gene in a PD model mouse. *Mol Ther* 29: 3059–3071.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.06.005>
73. Knutson VP (1991) Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 5: 2130–2138.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.5.8.2022311>
74. Chen Y, Huang L, Qi X, Chen C (2019) Insulin Receptor Trafficking: Consequences for Insulin Sensitivity and Diabetes. *Int J Mol Sci* 20: 5007.
<https://doi.org/10.3390/ijms20205007>
75. Al-Qassab H, Smith MA, Irvine EE, Guillermet-Guibert J, Claret M, Choudhury AI, Selman C, Piipari K, Clements M, Lingard S, Chandarana K, Bell JD, Barsh GS, Smith AJ, Batterham RL, Ashford ML, Vanhaesebroeck B, Withers DJ (2009) Dominant role of the p110beta isoform of PI3K over p110alpha in energy homeostasis regulation by POMC and AgRP neurons. *Cell Metab* 10: 343–354.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.008>
76. Benzler M, Benzler J, Stoehr S, Hempp C, Rizwan MZ, Heyward P, Tups A (2019) “Insulin-like” effects of palmitate compromise insulin signalling in hypothalamic neurons. *J Comp Physiol B* 189: 413–424.
<https://doi.org/d10.1007/s00360-019-01220-0>
77. García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi CX, Le Thuc O, Szigei-Buck K, Cai W, Meyer CW, Pfluger PT, Fernandez AM, Luquet S, Woods SC, Torres-Alemán I, Kahn CR, Götz M, Horvath TL, Tschöp MH (2016) Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166: 867–880.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028>
78. Avila J, Wandosell F, Hernández F (2010) Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer’s disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurother* 10: 703–710.
<https://doi.org/10.1586/ern.10.40>
79. Blázquez E, Hurtado-Carneiro V, LeBaut-Ayuso Y, Velázquez E, García-García L, Gómez-Oliver F, Ruiz-Albusac JM, Avila J, Pozo MÁ (2022) Significance of Brain Glucose Hypometabolism, Altered Insulin Signal Transduction, and Insulin Resistance in Several Neurological Diseases. *Front Endocrinol* 13: 873301.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873301>
80. Zakharova IO, Bayunova LV, Derkach KV, Ilyasov IO, Shpakov AO, Avrova NF (2022) Effects of intranasally administered insulin and gangliosides on metabolic parameters and activity of the hepatic insulin system in rats with type 2 Diabetes Mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 58: 380–394.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022020077>
81. Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K (2006) Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25: 6361–632.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209882>
82. Ono H, Pocaí A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, Schwartz GJ, Rossetti L (2008) Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 118: 2959–2968.
<https://doi.org/10.1172/JCI34277>
83. Blouet C, Ono H, Schwartz GJ (2008) Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab* 8: 459–467.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.004>
84. Asaki C, Usuda N, Nakazawa A, Kametani K, Suzuki T (2003) Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. *Brain Res* 972: 168–176.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02523-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02523-x)
85. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 441: 1–21.
<https://doi.org/10.1042/BJ20110892>
86. Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ (2008) The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 28: 7202–7208.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1389-08.2008>
87. Um SH, D’Alessio D, Thomas G (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 3: 393–402.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.003>
88. Tolomeo D, Micotti E, Serra SC, Chappell M, Snellman A, Forloni G (2018) Chemical exchange saturation transfer MRI shows low cerebral 2-deoxy-D-glucose uptake in a model of Alzheimer’s Disease. *Sci Rep* 8: 9576.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27839-7>
89. Ruud J, Steculorum SM, Brüning JC (2017) Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nat Commun* 8: 15259.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15259>
90. Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P (2018) Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1411: 21–35.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
91. Leal G, Comprido D, Duarte CB (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 (Pt C): 639–656.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>

Effects of Intranasally Administered Insulin and Gangliosides on Hypothalamic Signaling and Expression of Hepatic Gluconeogenesis Genes in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

I. O. Zakharova^{a,#}, L. V. Bayunova^a, K. V. Derkach^a, I. O. Ilyasov^a,
I. Yu. Morina^a, A. O. Shpakov^a and , and N. F. Avrova^a

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

[#]*e-mail: zakhar@iephb.ru*

The insulin signaling system in hypothalamic neurons plays an important role in the central regulation of glucose metabolism, feeding behavior, and tissue sensitivity to insulin. A decrease in the brain insulin level in metabolic disorders, including diabetes, is the cause of low activities of the key protein kinases regulated through the insulin signaling system. Insulin deficiency in the brain can be compensated by intranasal insulin administration, which allows a direct hormone delivery to the brain. The efficacy of this method can be increased by insulin co-administration with substances enhancing its effects in the brain, such as complex glycosphingolipids and gangliosides. This work was aimed to study the effects of individual versus cooperative intranasal administration of insulin (0.5 IU/rat/day) and gangliosides (6 mg/kg/day) to Wistar rats with experimental type 2 diabetes mellitus (DM2) on the activity of key components of insulin signaling in the hypothalamus (Akt, GSK-3 β , ERK1/2, p70S6K, AMPK), as well as on the expression of genes responsible for glucose metabolism in the liver (*GLUT2*, *FASN*, *PCK*, *G6PC*, *FBP*). It was found that intranasal co-administration of insulin and gangliosides to rats with DM2 restores glucose tolerance, improves tissue insulin sensitivity, enhances metabolic processes, and inhibits gluconeogenesis in hepatocytes. This occurs largely due to the central synchronized effect of insulin and gangliosides on the functional activity of key insulin signaling proteins in the hypothalamus (GSK3 β , p70S6K, ERK1/2, AMPK), as well as BDNF expression recovery and a decrease in mRNA levels of the proinflammatory cytokine IL-1 β in hypothalamic neurons. Thus, intranasal co-administration of insulin and gangliosides to rats with DM2 restores to a large extent hypothalamic insulin signaling and the control of hepatic gluconeogenesis, impaired under conditions of diabetic pathology.

Keywords: insulin, gangliosides, intranasal administration, hypothalamus, signaling pathways, type 2 diabetes mellitus

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОЧЕК И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И МОЧИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ O,O-ДИЭТИЛ-O-(4-НИТРОФЕНИЛ)ФОСФАТОМ

© 2022 г. М. О. Соколова^{1,2,*}, В. Е. Соболев¹, Н. В. Гончаров¹

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

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: sokolova.rita@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Пестициды на основе фосфорорганических соединений (ФОС) широко используются в сельском хозяйстве по всему миру, что сопряжено с риском острых и хронических отравлений человека. В целом токсическое воздействие ФОС на организм млекопитающих достаточно хорошо изучено, однако многие детали этиологии срочных и отдаленных последствий интоксикации требуют дополнительного внимания. Цель исследования – оценка биохимических показателей крови и мочи крыс, наряду с патоморфологическими и ультраструктурными изменениями почек, в динамике после острого отравления экспериментальных животных O,O-диэтил-O-(4-нитрофенил)фосфатом (этил-параоксон, ДНФФ).

Исследование выполнено на белых аутбредных крысах-самцах *Rattus norvegicus*, массой 200–250 г. ДНФФ в дозе ЛД₅₀ животным экспериментальных групп вводили однократно. Образцы сыворотки крови и мочи для биохимического анализа и тканей почек для морфологического исследования отбирали через сутки, 3 и 7 сут после отравления. Оценивали суточный диурез и удельный вес мочи, в сыворотке крови и в моче – содержание билирубина, общего белка, глюкозы, рН, креатинина, альбумина, D-3-гидроксипутирата и мочевины. Описывали патоморфологические изменения в тканях почек.

В сыворотке крови крыс при воздействии ДНФФ наблюдаются снижение альбумина, повышение концентрации мочевины, глюкозы и D-3-гидроксипутирата. Отмечено снижение объема суточного диуреза и рН мочи, при одновременном увеличении ее удельного веса. Выявлены повреждение эпителиальных клеток проксимальных извитых канальцев почек через сутки и увеличение толщины гломерулярных базальных мембран через 7 суток после воздействия.

Однократное введение сублетальных доз ДНФФ оказывает нефротоксический эффект, проявляющийся в изменении соответствующих биохимических показателей крови, мочи и морфологических показателей тканей почек. Наиболее выраженные изменения биохимических показателей зарегистрированы через сутки после воздействия ДНФФ и свидетельствуют о снижении выделительной способности почек и развитии метаболического кетоацидоза. Утолщение гломерулярных базальных мембран через 7 суток после воздействия указывает на предпосылки к формированию отставленной патологии.

Ключевые слова: органофосфаты, крысы, биохимия, нефротоксичность, гломерулярная базальная мембрана, электронная микроскопия, извитые канальцы, нефропатия

DOI: 10.31857/S0044452922060110

Пестициды на основе фосфорорганических соединений (ФОС) являются высокотоксичными соединениями, которые на протяжении десятилетий широко используются в сельском хозяйстве по всему миру. Так, в США ежегодное количество хлорпирифоса, используемое при выращивании кукурузы, сои и других культур, в последние годы составляет около 4 тыс. тонн [1]. Помимо хлорпирифоса, в странах третьего мира

широко используют малатион и паратион [2]. В организме млекопитающих под действием монооксигеназы печени тионы преобразуются в оксоны, и параоксон является наиболее токсичным из них. Воздействие ФОС присутствует в этиологии множества нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, респираторных, желудочно-кишечных, эндокринных, диабетических заболеваний и заболеваний почек [3–7]. Основным механизмом их

токсического действия на отравленный организм является угнетение активности фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в нейромышечных и нейрональных холинэргических синапсах [8]. Для острого отравления различными ФОС были описаны гистологические и ультраструктурные изменения тканей почек, выражающиеся в дегенерации почечных гломерул, кровоизлияниях в капсуле Шумлянского–Боумана, растяжении просветов почечных канальцев, гидропических изменениях в эпителиальных клетках канальцев и множественных кровоизлияниях в интерстиции почки [9, 10]. На ранних сроках после острого отравления в тканях почек выявляется дезорганизация, проявляющаяся в нарушении целостности эпителиальных клеток и растяжении просвета канальцев [10, 11]. Однако механизмы, опосредующие повреждение функциональных структур почки и напрямую влияющие на сохранность их функции, до конца не выяснены. Одними из факторов токсического повреждения тканей являются изменение редокс-баланса и возникновение оксидативного стресса, связанного с истощением глутатиона и усилением перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12, 13]. Роль оксидативного стресса в патофизиологии отравления ФОС активно обсуждается, но степень вклада активных форм кислорода (АФК) в токсическую роль ФОС в настоящее время не определена [13, 14]. ФОС и состояние холинэргического криза обуславливают гиперактивацию ряда сигнальных путей и, как следствие, развитие оксидативного стресса через производство АФК, индукцию ПОЛ, окисление белков и нуклеиновых кислот, в конечном счете – перерождение или гибель клеток [3, 13].

Необходимо отметить, что ФОС обладают уникальным профилем токсичности [2, 15]. Так, например, поступление дихлорфоса в организм не приводит к развитию выраженного оксидативного стресса [15]. Оценка динамики биохимических показателей крови и мочи при остром отравлении ФОС способна прояснить механизмы интоксикации. Исследование уровней активности холинэстеразы, амилазы, липазы и креатинфосфокиназы плазмы крови при остром воздействии позволило получить новые данные о степени тяжести повреждения, имеющие диагностическую ценность в случаях острого отравления человека [16]. Так как параоксон и его аналоги являются естественными метаболитами некоторых ФОС, используемых в настоящее время, то вполне резонно будет оценить изменение биохимических показателей крови и мочи в ответ на его острое воздействие в модели на животных [17]. Ранее мы описали три модели острого отравления крыс, с учетом высокого уровня карбоксилэстеразной активности в плазме крови грызунов [11, 18–20]. В этих работах, несмотря на их безусловный масштаб и принципиальную новизну по целому ряду критериев, были опреде-

ленные недостатки, один из которых – отсутствие комплексного исследования в одном эксперименте динамики биохимических показателей мочи и плазмы или сыворотки крови у одних и тех же животных в сочетании с исследованием морфологического субстрата наблюдаемых функциональных изменений. Цель настоящей работы состояла в дальнейшем изучении механизмов поражения почек при острой интоксикации органофосфатами на примере ДНФФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах *Rattus norvegicus*, массой 200–250 г ($n = 42$). Протокол исследования соответствует Директиве ЕС 2010/63/EU по проведению экспериментов на лабораторных животных и был одобрен Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова Российской академии наук (этическое разрешение № 13-к-а от 15 февраля 2018 г.).

Животные были разделены на 2 группы, одна из которых служила интактным контролем, тогда как крысам второй группы вводили подкожно (п/к) ДНФФ в дозе ЛД₅₀. Животным контрольной группы вводили 1 мл 0.9%-ного раствора NaCl.

Пробы мочи и крови (пункция хвостовой вены) получали через сутки, 3 и 7 сут после воздействия. Исследования проводили на анализаторе мочи Combilyzer 13 (Human GmbH, Германия) и биохимическом анализаторе Sapphire (Hirose Electronic System Co., Япония) согласно инструкции производителя. Определяли суточный диурез, удельный вес мочи, уровень билирубина, общего белка, глюкозы, pH, креатинина, альбумина, D-3-гидроксибутирата и мочевой кислоты. В сыворотке крови определяли содержание амилазы, лактата, мочевой кислоты, общего билирубина, креатинина, триглицеридов, мочевины, общего белка, глюкозы, альбумина и D-3-гидроксибутирата.

Образцы почек для гистологического и ультрамикроскопического исследования брали у животных, погибших в течение 1-го часа, и после декапитации, через сутки, 3 и 7 сут после острого воздействия. Материал фиксировали в 10%-ном забуференном формалине и 2.5%-ном глutarовом альдегиде. Для гистологического исследования образцы почек обезжировали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин. Полученные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для ультрамикроскопического исследования материал дополнительно фиксировали 2%-ным раствором OsO₄, последовательно обезжировали в спиртах и ацетоне восходящей концентрации, заливали в смолу Araldite (EMS, США). Двойное контрастирование ультратонких срезов осуществляли раствором цитрата свинца и 1%-ным

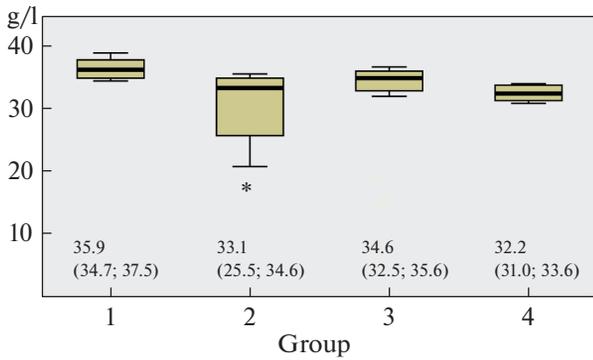


Рис. 1. Уровень содержания альбумина в сыворотке крови животных контрольной (1) и экспериментальной группы через сутки (2), 3 сут (3) и 7 сут (4) после воздействия ДНФФ. На рисунке представлены значения Me (Q1, Q3) для каждой группы. * $p \leq 0.05$.

водным раствором уранилацетата. Исследование проводили на световом микроскопе Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия) и электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия).

Морфометрию проводили в базовой программе для получения, обработки и анализа изображений AxioVision, версия 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия). На полученных препаратах измеряли толщину гломерулярных базальных мембран.

Полученные данные анализировали в программах Microsoft Office Excel 2007 и SPSS Statistics 17.0. Статистическую значимость различий между группами определяли с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса. Данные представлены в виде медиан.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отличий в уровнях билирубина, общего белка и альбумина в моче между контрольной и экспериментальной группами не выявлено. Содержание амилазы, лактата, мочевой кислоты, общего билирубина, креатинина, триглицеридов, мочевины, общего белка, глюкозы и D-3-гидроксибутирата в сыворотке крови также не имело различий между группами. Отмечено снижение уровня альбумина в сыворотке крови через сутки после отравления ($p = 0.018$), однако уже через 3 сут его уровень восстанавливался до контрольных значений (рис. 1).

Значимых отличий в клиренсе креатинина на разных сроках после отравления не выявлено, отмечена лишь тенденция ($0.05 < p < 0.1$) к снижению клиренса через сутки и к увеличению до контрольных значений через 3 сут после воздействия ДНФФ.

В экспериментальной группе животных выявлено снижение суточного диуреза в первые сутки интоксикации ($p = 0.05$) (рис. 2а), при этом относительная плотность мочи увеличивается ($p = 0.001$), а показатели изменяются в кислую сторону через сутки и в щелочную через 3 сут ($p = 0.001$) (рис. 2б,с). Уровень мочевой кислоты в моче увеличивается через сутки и 3 сут по сравнению со значениями контрольной группы ($p = 0.013$) (рис. 2д), а уровень D-3-гидроксибутирата увеличен через сутки ($p = 0.004$) (рис. 2е); также был отмечен рост уровня глюкозы в моче животных через сутки после острого воздействия ($p = 0.007$) (рис. 2ф).

В тканях почек животных, погибших в течение 1-го часа после введения ДНФФ, выявлены изме-

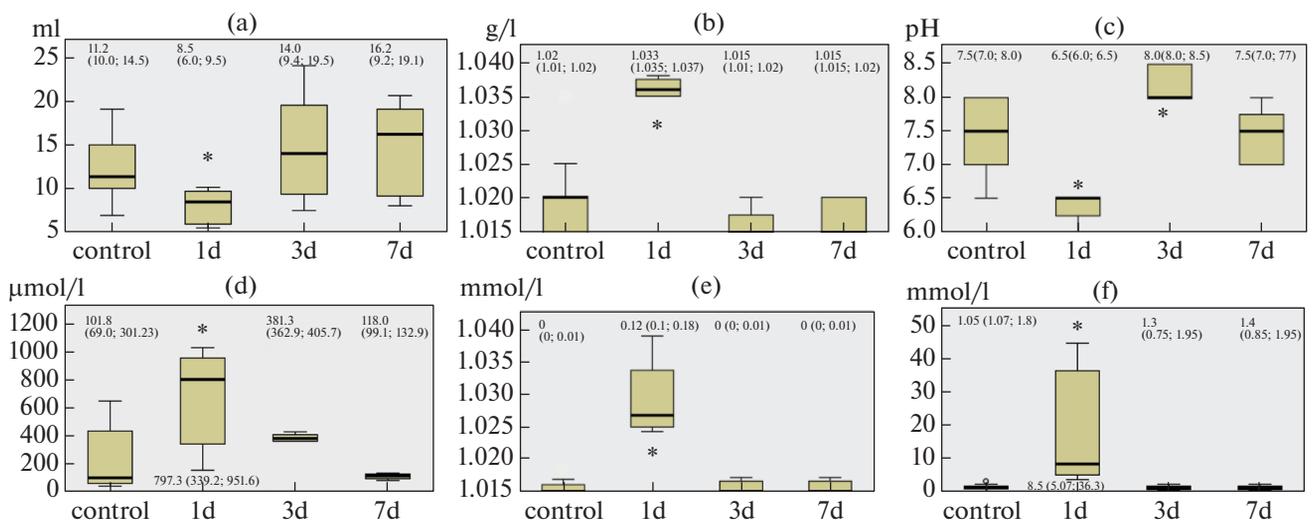


Рис. 2. Биохимические показатели мочи в контрольной группе и через сутки (1d), 3-е сут (3d) и 7 сут (7d) после острого воздействия ДНФФ. (а) Суточный диурез. (б) Относительная плотность мочи. (с) рН. (д) Уровень мочевой кислоты. (е) Уровень D-3-гидроксибутирата. (ф) Уровень содержания глюкозы. На рисунке представлены значения Me (Q1, Q3) для каждой группы. * $p \leq 0.05$.

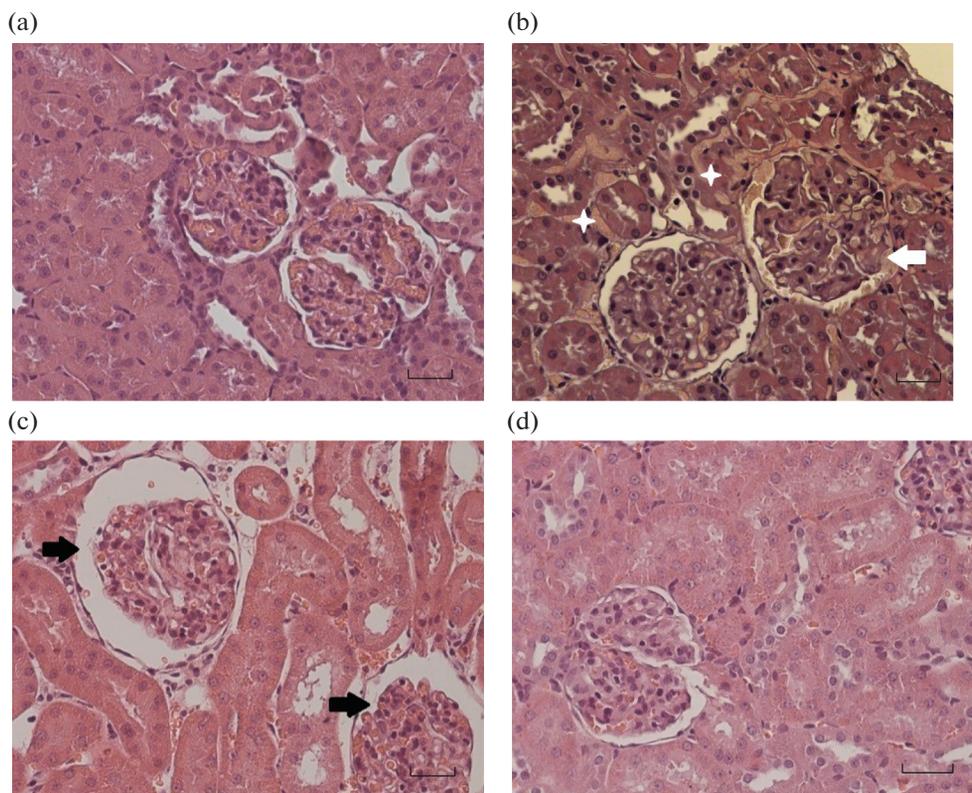


Рис. 3. Морфологические изменения в почках крыс контрольной группы (а), погибших в течение часа (b), через сутки (с) и 7 сут (d) после введения ДНФФ в дозе ЛД50. Кровоизлияния в интерстиций показаны звездами, кровоизлияния в капсулу клубочка (белая стрелка), растяжение капсулы Шумлянско-Боумена (черная стрелка). Окрашивание гематоксилином и эозином, масштабный отрезок = 50 мкм.

нения микроциркуляции, выражающиеся в появлении стазов в капиллярах интерстиция, клубочковых капиллярах и кровоизлияниях в капсулы клубочков (рис. 3b). Кровоизлияния в капсулу свидетельствуют о нарушении целостности фильтрационного барьера почек, что предположительно связано с разрывами гломерулярных базальных мембран. В структуре почечного тельца животных через сутки после отравления выявлены растяжение капсулы Шумлянско-Боумена и увеличение площади мочевого пространства при острой токсической нагрузке (рис. 3c). На ультраструктурном уровне выявлены очаговые нарушения люминальных поверхностей мембран эпителиальных клеток проксимальных извитых канальцев и обтурация просветов канальца десквамированными эпителиальными клетками. Через 7 сут после острого воздействия ДНФФ состояние паренхимы почек крыс соответствовало контролю (рис. 3d).

При ультраструктурном исследовании почек животных через 7 сут после отравления отмечали потерю четкого деления гломерулярных базальных мембран обработанных на lamina rara externa, lamina densa и lamina rara interna. Было выявлено статистически значимое увеличение толщи-

ны гломерулярных базальных мембран ($p = 0.05$) (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эпителиальные клетки, выстилающие проксимальные канальцы, играют важную роль в извлечении ионов и белков, проходящих сквозь гломерулярный фильтрационный барьер [21]. Протеинурии, как одного из основных критериев, свидетельствующих о нарушении функции почек, у животных, переживших острую интоксикацию ДНФФ, выявлено не было. Следовательно, нарушение целостности апикальной поверхности эпителиальных клеток, выявленное на ранних сроках, не оказывает влияние на апикальный эндоцитоз белков. Вероятно, мультилигандные рецепторы мегалин и кубилин, обеспечивающие реабсорбцию белков и располагающиеся между микроворсинками эпителиальных клеток проксимального извитого канальца, экспрессированы в достаточном количестве клеток для обеспечения нормального уровня реабсорбции [21, 22]. Это соответствует результатам других исследований, где, в случае применения низких доз ФОС, в первые сутки после отравления гистопатологических изменений в тка-

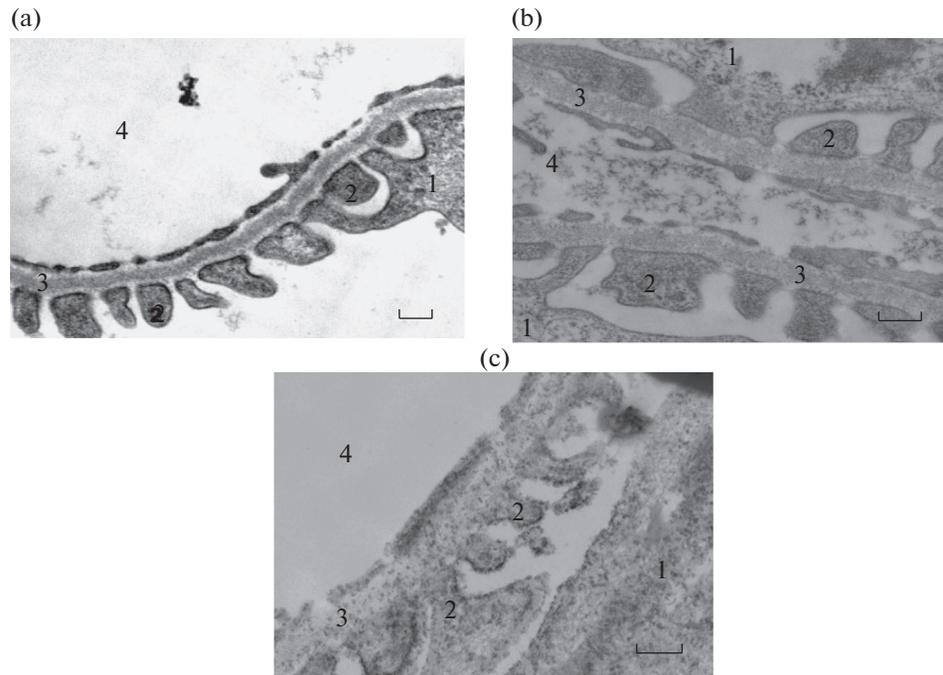


Рис. 4. Гломерулярные базальные мембраны фильтрационного барьера почек в контрольной группе (а), через сутки (б) и 7 сут (с) после введения ДНФФ в дозе ЛД50. 1 – тело подоцита, 2 – ножковые отростки подоцитов, 3 – гломерулярная базальная мембрана, 4 – просвет клубочкового капилляра. Трансмиссионная электронная микроскопия, масштабный отрезок = 200 nm.

нях почек животных не наблюдалось, хотя через 3 нед хронического воздействия они оказывались ярко выраженными и включали кровотечение, десквамацию эпителия канальцев, инфильтрацию воспалительными клетками и некроз [23]. Нормальный уровень реабсорбции белка в проксимальных канальцах косвенно указывает на целостность гломерулярных мембран фильтрационного барьера почек в ранние сроки у выживших животных после отравления сублетальными дозами ДНФФ и сохранность достаточного количества канальцев для его поддержания.

Выявленное снижение уровня альбумина в сыворотке крови через сутки после острого воздействия без увеличения его экскреции с мочой может свидетельствовать о нарушении гемато-тканевых барьеров и вероятном выходе альбумина в паренхиму головного и спинного мозга [24–26]. Следов выведения необратимо связанных комплексов альбумин-ФОС в фильтрационном барьере почек или моче в нашем исследовании обнаружено не было ни через сутки, ни через 7 суток после воздействия ДНФФ. Электронно-плотные комплексы в структуре гломерулярных мембран также не обнаружены. Однако наличие следов белка в толще гломерулярных мембран в исследованиях токсического действия ФОС на ткань почек показано для квиналфоса [27].

Согласно литературным данным, ключевыми факторами, способствующими повреждению проксимальных канальцев, являются гипергликемия, протеинурия, гипоксия и воспаление [28]. Нарушения микроциркуляции, выявленные в тканях почек крыс, погибших в течение часа после воздействия ДНФФ, указывают на формирование для клеток почек выживших животных гипоксических условий. Согласно современным представлениям вышеуказанные факторы оказывают свое воздействие через изменения сигналинга TGF-beta

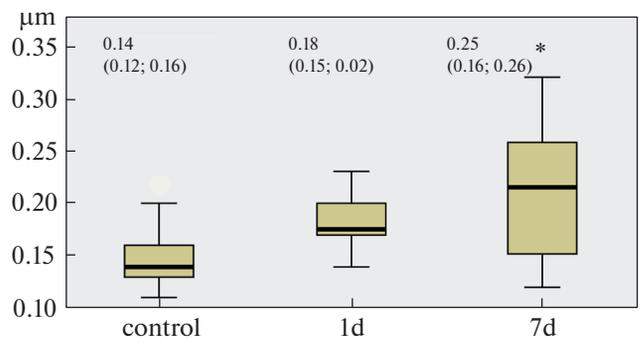


Рис. 5. Толщина гломерулярных базальных мембран фильтрационного барьера почек крыс через сутки (1d) и 7 сут (7d) после введения ДНФФ в дозе ЛД50. На рисунке представлены значения Me (Q1, Q3) для каждой группы. * $p \leq 0.05$.

и баланса медиаторов ренин-ангиотензиновой системы, дисрегуляцию полиолового и гексозаминового пути, активности протеинкиназы С, а также через образование конечных продуктов гликирования [28].

Согласно клиническим наблюдениям у пострадавших от воздействия ФОС наблюдается транзиторная глюкозурия при эугликемии [29]. В нашем исследовании у животных, переживших острую интоксикацию, наблюдалась аналогичная ситуация, высокий уровень содержания глюкозы в моче сочетался с отсутствием изменений уровня глюкозы в крови через сутки и 3 сут после воздействия. Как известно, апикальные мембраны эпителиальных клеток извитых канальцев несут на себе рецепторы к инсулину и транспортеры глюкозы [30, 31]. Потеря микроворсинок апикальной части клеток проксимальных канальцев приводит к утрате Независимых SGLT-переносчиков глюкозы, что нарушает активный транспорт глюкозы в клетку из просвета канальца [32]. Снижение количества рецепторов инсулина в проксимальных канальцах, которое имеет место при инсулинорезистентном состоянии, также способствует развитию гипергликемии за счет усиления глюконеогенеза [31]. Изменения клеточных функций, происходящие в ответ на воздействие различных эндогенных факторов, в том числе и отравления ФОС, вызывающие потерю инсулиновых рецепторов и SGLT-переносчиков глюкозы в поврежденных проксимальных канальцах, могут способствовать развитию диабетоподобной нефропатии [30]. Это подтверждается полученными данными, свидетельствующими о возникновении метаболического кетоацидоза через сутки после отравления: смещение pH мочи в кислую сторону, рост уровня мочевой кислоты и D-3-гидроксипутирата. D-3-гидроксипутират является наиболее распространенным кетоном, обеспечивающим индикацию кетоацидоза. Имеются данные о случаях интоксикации человека ФОС, проявляющихся как диабетический кетоацидоз [33–35]. В моделях на животных эти соединения влияют на пути метаболизма глюкозы, что в конечном итоге приводит к гипергликемии [34].

Рост уровня экскреции мочевой кислоты в моче обработанных животных в нашем исследовании согласуется с данными о последствиях повышенной активности ксантиноксидазы и повышенного уровня оксидативного стресса при отравлении [14, 36]. Мочевая кислота – конечный продукт метаболизма эндогенных и поступающих с пищей пуриновых соединений у человека, образующийся из ксантина под действием ксантиноксидазы. Выведение мочевой кислоты в просвет канальца происходит при помощи мочекислового или уратного переносчика 1 (URAT1), также экспрессированного на люминальной клеточной мембране и в цито-

плазме клеток проксимальных канальцев [37]. Частичная утрата эпителия проксимальных канальцев способна вызвать рост экскреции мочевой кислоты с мочой.

Патогистологические изменения в тканях почек при воздействии ДНФФ в дозе ЛД₅₀ наиболее ярко проявляются через сутки, восстановление происходит в течение недели. Увеличение толщины гломерулярных базальных мембран, выявленное через 7 сут у обработанных животных не сочеталось с протеинурией и гематурией. Различий между контрольной и экспериментальной группами крыс по уровню сывороточной амилазы, которая, согласно данным некоторых исследований, имеет наибольшую диагностическую точность при оценке тяжести воздействия ФОС у человека [16], в нашем эксперименте не обнаружено.

В целом исследование показало, что однократное введение сублетальной дозы ДНФФ оказывает токсическое воздействие на крыс, отражающееся в ряде изменений биохимических показателей крови, мочи и морфологических показателей тканей почек. Согласно полученным данным, максимальные изменения биохимических показателей крови и мочи регистрируются через сутки после острого воздействия, выражаются в развитии метаболического кетоацидоза и снижении выделительной способности почек, что свидетельствует о формировании у крыс преморбидного состояния с последующей неполной его нормализацией. Результаты исследования позволяют предположить риск развития диабетической нефропатии в результате острой интоксикации ФОС.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования (В.Е.С., Н.В.Г.), сбор и обработка данных, статистический анализ, написание текста (М.О.С., В.Е.С.), редактирование манускрипта (В.Е.С., Н.В.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Solomon KR, Williams WM, Mackay D, Purdy J, Giddings JM, Giesy JP* (2014) Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 231: 13–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_2

2. *Leonel Javeres MN, Raza S, Judith N, Anwar F, Habib R, Batool S, Nurulain SM* (2020) Mixture of organophosphates chronic exposure and pancreatic dysregulations in two different population samples. *Front Public Health* 8: 534902.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.534902>
3. *Farkhondeh T, Mehrpour O, Buhrmann C, Pourbagher-Shahri AM, Shakibaei M, Samarghandian S* (2020) Organophosphorus compounds and mapk signaling pathways. *Int J Mol Sci* 21: 42–58.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124258>
4. *Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV* (2017) Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the state. *Oxidat Med Cel Longev* 2017: 9759735.
<https://doi.org/10.1155/2017/9759735>
5. *Sobolev VE, Jenkins RO, Goncharov NV* (2017) Sulfated glycosaminoglycans in bladder tissue and urine of rats after acute exposure to paraoxon and cyclophosphamide. *Exp Toxicol Pathol* 69 (6): 339–347.
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.02.007>
6. *Ubaid Ur Rahman H, Asghar W, Nazir W, Sandhu MA, Ahmed A, Khalid N* (2021) A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci Total Environ* 755 (Pt 2): 142649.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>
7. *Tsai YH, Lein PJ* (2021) Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. *Curr Opin Toxicol* 26: 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.04.002>
8. *Прозоровский ВБ, Скопичев ВГ* (2004) Дистантное действие в патогенезе отравлений фосфорорганическими соединениями. *Обзоры по клин фармакол и лек терапии* 3: 56–67. [*Prozorovskij VB, Skopichev VG* (2004) Distant action in the pathogenesis of poisoning with organospore compounds. *Obzory po klin farmakol i lek terapii* 3: 56–67. (In Russ)].
9. *Cavari Y, Landau D, Leibson T, Lazar I* (2013) Organophosphate poisoning-induced acute renal failure. *Pediatric Emergency Care* 29: 646–647.
<https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31828e9e45>
10. *Kaya Y, Bas O, Hanci H, Cankaya S, Nalbant I, Odaci E, Uydu HA, Aslan A* (2018) Acute renal involvement in organophosphate poisoning: histological and immunochemical investigations. *Ren Fail* 40: 410–415.
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2018.1489289>
11. *Sobolev VE, Korf EA, Goncharov NV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 5. morphofunctional alterations in kidneys. *J Evol Biochem Physiol* 55 (4): 302–312.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019040069>
12. *Salehi M, Jafari M, Asgari A, Salimian M, Abbasnezhad M* (2016) Strain-related differences on response of liver and kidney antioxidant defense system in two rat strains following diazinon exposure. *Zahedan J Res Med Sci* 18: 5988.
<https://doi.org/10.17795/zjrms-5988>
13. *Chung YL, Hou YC, Wang IK, Lu KC, Yen TH* (2021) Organophosphate pesticides and new-onset diabetes mellitus: From molecular mechanisms to a possible therapeutic perspective. *World J Diabetes* 12 (11): 1818–1831. PMID:
<https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i11.181834888010>
14. *Rambabu L, Megson IL, Eddleston M* (2020) Does oxidative stress contribute to toxicity in acute organophosphorus poisoning? - a systematic review of the evidence. *Clin Toxicol (Phila)* 58:437–452.
<https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1693589>
15. *Nurulain SM, Ojha S, Tekes K, Shafiullan M, Kalasz H, Adem A* (2015) Efficacy of N-acetylcysteine, glutathione, and ascorbic acid in acute toxicity of paraoxon to wistar rats: survival study. *Oxidat Med Cell Longev* 2015: 329306.
<https://doi.org/10.1155/2015/329306>
16. *Sumathi ME, Kumar SH, Shashidhar KN, Takkala N* (2014) Prognostic significance of various biochemical parameters in acute organophosphorus poisoning. *Toxicol Int* 21: 167–171.
<https://doi.org/10.4103/0971-6580.139800>
17. *Паликов ВА, Терехов СС, Паликова ЮА, Хохлова ОН, Казаков ВА, Дьяченко ИА, Пантелеев СВ, Мокрушина ЮА, Кнорре ВД, Шамборант ОГ, Смирнов ИВ, Габиров АГ* (2018) Мышиная модель для оценки субхронической токсичности фосфорорганических пестицидов. *ACTA NATURAE* 10: 125–128. [*Palikov VA, Terekhov SS, Palikova YUA, Hohlova ON, Kazakov VA, Dyachenko IA, Pantelev SV, Mokrushina YuA, Knorre VD, Shamborant OG, Smirnov IV, Gabibov AG* (2018) Mouse Model for evaluation of subchronic toxicity of organophosphate pesticides. *ACTA NATURAE* 10: 125–128. (In Russ)].
18. *Goncharov NV, Terpilowski MA, Shmurak VI, Belinskaya DA, Avdonin PV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 1. biochemical aspects. *J Evol Biochem Physiol* 55 (2): 112–123.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019020042>
19. *Kuznetsov SV, Goncharov NV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 3. Cardiorespiratory indices. *J Evol Biochem Physiol* 55 (3): 239–243.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019030104>
20. *Sobolev VE, Shmurak VI, Goncharov NV* (2019) The rat (*Rattus norvegicus*) as a model object for acute organophosphate poisoning. 4. m1-cholinoreceptors and esterase activity in brain homogenates. *J Evol Biochem Physiol* 55 (3): 244–248.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019030116>
21. *Eshbach ML, Weisz OA* (2017) Receptor-mediated endocytosis in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol* 79: 425–448.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034234>
22. *Christensen EI, Birn H, Storm T, Wever K, Nielsen R* (2012) Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Int Union Physiol Sci. Am Physiol Soc* 4: 223–236.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2012>

23. *Massoud A, Allah MS, Dahran NA, Nasr NE, El-Fkharany I, Ahmed MS, Alsharif KF, Elmahallawy EK, Derbalah A* (2022) Toxicological effects of malathion at low dose on wister male rats with respect to biochemical and histopathological alterations. *Front Environ Sci* 10: 860359. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.860359>
24. *Колесниченко ИП, Долго-Сабурова ИС, Сомова ТВ* (1992) Изменения биохимического состава цереброспинальной жидкости при остром отравлении карбофосом. *Журн невропатол психиатр им СС Корсакова* 92 (2): 95–99. [*Kolesnichenko IP, Dolgo-Saburova IS, Somova TV* (1992) Changes in the biochemical composition of cerebrospinal fluid in acute carbophos poisoning. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 92 (2): 95–99. (In Russ)]
25. *Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV* (2021) Serum albumin in health and disease: esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. *Int J Mol Sci* 22 (19): 10318. <https://doi.org/10.3390/ijms221910318>
26. *Belinskaia DA, Voronina PA, Goncharov NV* (2021) Integrative role of albumin: evolutionary, biochemical and pathophysiological aspects. *J Evol Biochem Physiol* 57 (6): 1419–1448. <https://doi.org/10.1134/S002209302106020X>
27. *Eid RA* (2017) Apoptosis of rat renal cells by organophosphate pesticide, quinalphos: ultrastructural study. *Saudi J kidney Diseases Transplantation: an Offic Publicat Saudi Center for Organ Transplant* 28: 725–736.
28. *Slyne J, Slattery C, McMorrow T, Ryan MP* (2015) New developments concerning the proximal tubule in diabetic nephropathy: in vitro models and mechanisms. *Nephrol Dial Transplant* 30: 60–67. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv264>
29. *Chung YL, Hou YC, Wang IK, Lu KC, Yen TH* (2021) Organophosphate pesticides and new-onset diabetes mellitus: From molecular mechanisms to a possible therapeutic perspective. *World J Diabetes* 12 (11): 1818–1831. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i11.1818>
30. *Lee YJ, Lee YJ, Han HJ* (2007) Regulatory mechanisms of Na⁺/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 72: S27–S35. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002383>
31. *Tiwari S, Sing RS, Li L, Tsukerman S, Godbole M, Pandey G, Ecelbarger CM* (2013) Deletion of the insulin receptor in the proximal tubule promotes hyperglycemia. *J Am Soc Nephrol* 24: 1209–1214. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012060628>
32. *Mather A, Pollock C* (2011) Glucose handling by the kidney. *Kidney Int* 79 (Suppl 120): S1–S6. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.509>
33. *Akyildiz BN, Kondolot M, Kurtoglu S, Akin L* (2009) Organophosphate intoxication presenting as diabetic ketoacidosis. *Ann Trop Paediatr* 29: 155–158. <https://doi.org/10.1179/146532809X440789>
34. *Swaminathan K, Sundaram M, Prakash P, Subbiah S* (2013) Diabetic ketoacidosis: an uncommon manifestation of pesticide poisoning. *Diabetes Care* 36: e4. <https://doi.org/10.2337/dc12-1251>
35. *Badrane N, Askour M, Berechid K, Abidi K, Dendane T, Zeggwagh AA* (2014) Severe oral and intravenous insecticide mixture poisoning with diabetic ketoacidosis: a case report. *BMC Res Notes* 7: 485. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-485>
36. *Молчанова ОБ, Бритов АН, Платонова ЕВ* (2020) Значение повышенного уровня мочевой кислоты в развитии и профилактике хронических неинфекционных заболеваний. *Профилактикт мед* 23: 102–108. [*Molchanova OV, Britov AN, Platonova EV* (2020) Importance of elevated uric acid levels in the development and prevention of chronic non-communicable diseases. *Profilakt Med* 23: 102–108. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/profmed202023021102>
37. *Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H* (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417: 447–452. <https://doi.org/10.1038/nature742>

Ultrastructural Changes in the Kidneys and Biochemical Parameters of Blood and Urine in Rats during Acute Intoxication with *O,O*-Diethyl-*O*-(4-Nitrophenyl)phosphate

M. O. Sokolova^{a,b,#}, V. E. Sobolev^a and , and N. V. Goncharov^a

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

^b *S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: sokolova.rita@gmail.com*

Pesticides based on organophosphorus compounds (OPs) are widely used in agriculture worldwide, which is fraught with acute and chronic human poisoning. In general, toxic effects of OPs on the mammals are well studied, but many details of the etiology of immediate and long-term consequences of poisoning require additional attention. The aim of this study was to assess the dynamics of biochemical blood and urine parameters along with pathomorphological and ultrastructural changes in the kidneys after acute poisoning of experimental rats with *O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrophenyl)phosphate (ethyl-paraoxon, DNPP). The study was carried out on white outbred male rats *Rattus norvegicus* weighing 200–250 g. DNPP was administered to experimental groups animals at a lethal dose 50 (LD50, single injection). Blood serum and urine samples for biochemical analysis and kidney

tissue samples for morphological investigation were taken on days 1, 3 and 7 after poisoning. Daily diuresis and urine specific gravity, as well as serum and urine levels of bilirubin, total protein, glucose, pH, creatinine, albumin, D-3-hydroxybutyrate and uric acid, were assessed. Pathomorphological changes in kidney tissue were described. After DNPP exposure, there were observed a decrease in albumin and an increase in uric acid, glucose and D-3-hydroxybutyrate levels, as well as a decrease in the volume of daily diuresis and urine pH, paralleled by an increase in urine specific gravity. Morphological analysis of kidney tissue revealed a damage to epithelial cells of the proximal convoluted tubules and an increase in the thickness of glomerular basement membranes, respectively, 24 h and 7 days after DNPP exposure. A single sublethal dose of DNPP had a nephrotoxic effect, as manifested in changes in biochemical blood and urine parameters, as well as morphological parameters of kidney tissue. The most pronounced changes in biochemical parameters were recorded one day after DNPP exposure, indicative of a decrease in the excretory capacity of the kidneys and the development of metabolic ketoacidosis. The thickening of glomerular basal membranes in 7 days after exposure suggests the prerequisites for the formation of delayed pathology.

Keywords: organophosphates, rats, biochemistry, nephrotoxicity, glomerular basal membrane, electron microscopy, convoluted tubules, nephropathy

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННЫЕ ПАТТЕРНЫ МЕЖМЫШЕЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ ЛОКОМОЦИЯХ, ВЫЗВАННЫХ ЧРЕСКОЖНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ СПИННОГО МОЗГА

© 2022 г. С. А. Моисеев

Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, Великие Луки, Россия

e-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

В работе рассматривается пространственно-временная структура мышечных синергий при произвольных локомоциях, выполняемых в условиях горизонтальной вывески нижних конечностей, и при шагоподобных движениях, модулируемых чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга человека. Синергии извлекали разложением матриц с помощью метода главных компонент (РСА). Выявлено меньшее количество синергий при локомоциях, инициируемых чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга. Установлено, что временная структура извлекаемых мышечных синергий при локомоциях в условиях электрической стимуляции спинного мозга имеет явно выраженные пики активности и высокую воспроизводимость паттернов активации. В ряде случаев они реализуются в разные временные периоды локомоторного цикла при их многократной реализации. Мышечные нагрузки в структуре выявленных синергетических модулей существенно различаются, однако векторы синергий оказываются в высокой степени схожими в разных экспериментальных условиях. Различия в параметрах пространственно-временной структуры мышечных синергий произвольных локомоций и модулируемых чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга, вероятно, связаны с реорганизацией ритмогенерирующей части нейрональной сети, осуществляющей управление структурой локомоторного цикла.

Ключевые слова: мышечные синергии, электрическая стимуляция спинного мозга, локомоции, межмышечное взаимодействие, управление движением

DOI: 10.31857/S0044452922060080

В последнее десятилетие был достигнут существенный прогресс в исследованиях синергетических эффектов при управлении движением, однако остается большое количество нерешенных вопросов, начиная от методических аспектов их извлечения и заканчивая концептуальными вопросами о природе изучаемых синергетических феноменов. Одной из наиболее значимых для понимания природы выявляемых синергетических эффектов является область взаимодействия разных уровней ЦНС в генерации и модуляции синергий. В процессе локомоторной активности такое взаимодействие может быть достигнуто путем введения в систему управления реципрокной и коактивационной команд. Представления об этих командах в ЦНС, как об основных режимах взаимодействия пулов мотонейронов, иннервирующих пары мышц в системе агонист-антагонист, известно довольно давно, а в последнее время понятие таких команд было введено для описания контроля произволь-

ными многосуставными движениями [1, 2]. Эти данные развивают представление об иерархически организованном управлении автоматизированными движениями посредством центральных генераторов паттернов, инициируемых простой командой вышележащих центров [3, 4].

Ранее нами было показано, что применение чрескожной электрической стимуляции спинного мозга (ЧЭССМ), вероятно, воздействуя на моторные проявления таких команд, меняет реципрокные синергетические взаимоотношения мышц нижних конечностей в структуре синергетических модулей [5]. Однако синергетические эффекты были рассмотрены в условиях произвольно выполняемых движений при ходьбе по тредбану, что накладывает определенные ограничения на работу синергетических центров в структуре спинальных нейрональных сетей, регулирующих локомоторную активность. Помимо биомеханических ограничений имеют место и другие факторы, влияю-

щие на работу синергетических центров, такие как афферентация от опорных зон стопы, центральные команды, определяющие произвольный компонент локомоторных движений и ряд других факторов, в результате чего параметры моторного выхода оказываются довольно вариативны даже при их внутрииндивидуальном рассмотрении. В ряде работ предлагаются способы ее минимизации, однако они, преимущественно, связаны с вычислительными аспектами извлечения синергий [6]. Все это затрудняет получение прямых доказательств синергетического контроля мышечной активности со стороны центральной нервной системы.

С помощью стимуляции структур спинного и головного мозга животных разными раздражителями удавалось получить пространственно-временные профили мышечных активаций, характерные для синергии и схожие по структуре с реальными движениями [7, 8]. Несмотря на это природа наблюдаемых синергетических эффектов во многом остается неясной. Применение стимуляционных методов воздействия на структуры ЦНС в условиях, минимизирующих влияние названных выше факторов на работу синергетических центров, может дать более точную информацию о том, как параметры двигательной задачи кодируются в структуре мышечных синергий. В связи с этим целью работы явилось изучение синергетических эффектов межмышечного взаимодействия при произвольных локомоциях, вызываемых ЧЭССМ в условиях горизонтальной вывески нижних конечностей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 8 испытуемых мужского пола в возрасте от 21 до 35 лет. Исследования проведены на базе Научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта в лаборатории физиологии нервной и мышечной систем. Все исследования проведены с соблюдением требований и принципов биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г., и одобрены локальным биоэтическим комитетом. Каждый участник представил добровольное письменное информированное согласие на участие в исследованиях. Испытуемые располагались в горизонтальной вывеске нижних конечностей для минимизации гравитационного воздействия и облегчения возникающих в результате электростимуляционного воздействия на структуры спинного мозга шагоподобных движений [9, 10]. Протокол исследований предполагал выполнение произвольных шагательных движений в горизонтальной вывеске нижних конечностей и в условиях, минимизирующих произвольный компонент. В последнем случае испытуемым давали инструкцию не двигаться произвольно, не препят-

ствовать и не концентрироваться на движениях нижних конечностей в случае их возникновения. Контроль отсутствия произвольного компонента в структуре вызванных локомоций осуществлялся, исходя из оценки амплитуды движений в суставах, электромиографической активности скелетных мышц и координации между нижними конечностями (рис. 1). Во всех экспериментальных условиях анализировали не менее 8 полных циклов шага. Граничные моменты полного цикла шага определяли по крайним положениям плюсневой антропометрической точки правой ноги в сагиттальной плоскости.

Регистрировали электромиограммы (ЭМГ) билатеральных мышц нижних конечностей: передней большеберцовой (ТА), медиальной головки икроножной (GM), латеральной широкой (VL), двуглавой бедра (BF), прямой бедра (RF). ЭМГ регистрировали при помощи беспроводного 16-канального биомонитора ME6000 (Финляндия) с частотой дискретизации 2000 Гц. Для отведения ЭМГ применяли кожные одноразовые самоклеющиеся электроды с токопроводящим гелем и активной площадью контакта 2.5 см², 36 × 45 мм (Swaromed, Австрия). Электроды накладывались биполярно, при этом активный располагался в области проекции двигательной точки исследуемой мышцы, а референтный прикреплялся по ходу ее волокон с межэлектродным расстоянием 2 см, предусматривался дополнительный электрод заземления на каждом канале. Все зарегистрированные ЭМГ фильтровали с помощью оригинального программного обеспечения. Принцип работы фильтра состоит в поиске паттерна, характерного для артефакта стимуляции, и замены фрагмента ЭМГ, содержащего наводку, на динамическое среднее. Далее ЭМГ фильтровались полосовым фильтром с полосой пропускания 30–450 Гц, силой подавления 60 дБ с нулевой задержкой, затем усреднялись в интервалах 0.002 с и повторно применяли фильтр низких частот 15 Гц, используя программное обеспечение MegaWin. Все ЭМГ нормировались к пиковой амплитуде каждой мышцы в определенном экспериментальном условии.

ЧЭССМ осуществлялась посредством стимулятора Биокин ЭС-5 (ООО “Косима”, Россия). Катод помещали между позвонками T11 и T12, два анода – симметрично над гребнями подвздошных костей, частота стимуляции составляла 30 Гц. Интенсивность стимуляции подбирали индивидуально, увеличивая ток до величины, инициирующей двигательную реакцию, но не вызывающей болезненных ощущений – в диапазоне 30–90 мА. Основываясь на предыдущих результатах, показывающих, что произвольные шагательные движения могут быть вызваны у здоровых людей с помощью ЧЭССМ частотой 30 Гц, применяемой между позвонками T11 и T12, мы использовали те же параметры стимуляции [4]. Синхронно осуществляли

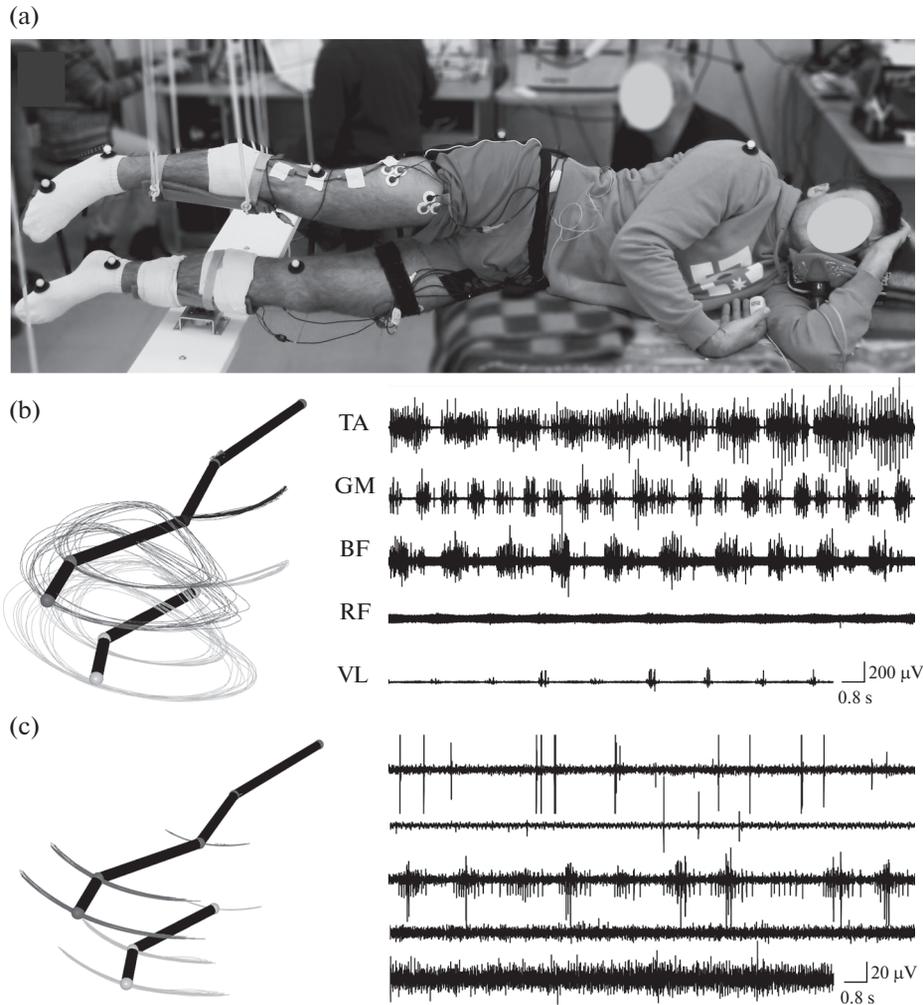


Рис. 1. Расположение испытуемого в горизонтальной вывеске нижних конечностей (а), траектории перемещения антропометрических точек и образцы электромиограммы мышц нижних конечностей при произвольной ходьбе (б) и в условиях чрескожной электрической стимуляции спинного мозга (с).

видео захват движений основных антропометрических точек сегментов тела обеих нижних конечностей: плюсневой, нижеберцовой, верхнеберцовой, вертельной с частотой дискретизации 500 Гц. Применяли систему 3D-видеоанализа Qualisys (Швеция), включающей 8 высокоскоростных камер Qqus.

Зарегистрированные интерференционные ЭМГ, координаты антропометрических точек в системе 3D экспортировали в Statistica (StatSoft, Inc., version 10) и формировали матрицу исходных данных (X), размерностью ($I \times J$), где I — число точек (измерений в момент времени — 500 для каждого экспериментального условия, шага, испытуемого), а J — число независимых переменных (вариационных рядов ЭМГ — 8). Помимо вариационных рядов ЭМГ в матрице создавали дополнительные переменные, позволяющие идентифицировать периоды шагательного цикла и принадлежность данных

к определенному испытуемому и шагу [11, 12]. Все вариационные ряды были интерполированы относительно единой точки отсчета и стандартизированы к единице стандартного отклонения.

Из матриц извлекали компоненты (синергии) с помощью метода главных компонент (PCA). Рассматривали компоненты, имеющие собственные значения (eigenvalues) больше единицы и учитывающие не менее 10% общей дисперсии. Анализировали следующие параметры: количество извлекаемых компонент (синергий), процент общей дисперсии, учитываемый каждым фактором в общем наборе данных (VAF), матрицы нагрузок (loadings) и матрицы счетов (scores). Исходная матрица X разлагалась на произведение двух матриц: $X = T \times P + E$, где T — матрица счетов, P — матрица нагрузок, E — матрица остатков. Матрица нагрузок несет информацию о взаимосвязи или независимости переменных относительно новых, формальных перемен-

ных, полученных в процессе разложения матриц – “векторы синергии”.

При сравнении “векторов синергий” в качестве сравниваемых вариационных рядов данных выступали значения нагрузок мышц в установленном порядке в разных экспериментальных условиях, в этом случае для сравнения вариационных рядов применяли анализ косинусного сходства ($\cos \theta$), где 1 – полное подобие, 0 – отсутствие подобия. Матрица нагрузок также включает весовые коэффициенты каждой мышцы, дающие информацию о степени вовлечения их в синергию, чем выше коэффициент, тем больше связь с новой компонентой. Рассчитывали внутрииндивидуальные средние значения весовых коэффициентов каждой мышцы для каждого извлеченного компонента при многократных реализациях полного цикла шага. Для оценки достоверности различий при сравнении среднегрупповых весовых коэффициентов применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc анализом по критерию Newman–Keuls. Статистически значимыми различиями считали значения критерия $p < 0.05$.

Матрица счетов определяет временную организацию выявленных синергий и представляет собой проекции исходных данных на подпространство главных компонент – “коэффициенты активации” синергий. Коэффициенты активации представляют собой динамический процесс, отражающий изменение активности синергий во времени. Коэффициенты активации синергий сравнивали при помощи анализа максимальных значений кросскорреляционных функций (r) с учетом смещения относительно нуля, где 1 – полное соответствие, 0 – отсутствие взаимосвязи. К вариационным рядам, содержащим коэффициенты активации синергий, перед расчетом кросскорреляционных функций применяли простое экспоненциальное сглаживание ($\alpha = 0.01$).

Математико-статистическая обработка данных выполнена в Statistica 10.0 и включала расчет среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (SE), стандартного отклонения (SD), коэффициентов вариативности (CV). Разложение матриц осуществляли в среде Statistica, используя стандартный модуль “Advanced/Multivariate – PCA”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В среднем по группе испытуемых при произвольных локомоциях было установлено 4.4 ± 0.2 компонента – синергии, с долей объясняемой дисперсии $78.0 \pm 1.4\%$. При воздействии чрескожной электрической стимуляции спинного мозга количество синергий достоверно снижалось на 22.7% и достигало 3.4 ± 0.2 .

При рассмотрении пространственной структуры мышечных синергий произвольных и вызванных ЧЭССМ локомоций были установлены следующие закономерности. Наибольшие нагрузки первой синергии при произвольных движениях приходились на следующие мышцы: переднюю большеберцовую, прямую бедра правой ноги, а также на икроножную и двуглавую бедра левой нижней конечности (рис. 2). В условиях ЧЭССМ наряду с этими мышцами имели высокие коэффициенты икроножная правая и прямая мышца бедра левой ноги. Обнаружена тенденция, заключающаяся в снижении роли латеральной широкой мышцы правой стороны и икроножной левой в первой синергии при стимуляции. При этом существенно возрастала роль икроножной правой мышцы, двуглавой и прямой мышцы бедра левой нижней конечности ($p < 0.05$). Анализ сходства векторов первой синергии показал их высокое соответствие в обоих экспериментальных условиях, где коэффициент оказывался не менее 0.85.

Во второй синергии при произвольной ходьбе наибольшие нагрузки были выявлены в икроножной мышце правой ноги, а при стимуляции – в латеральной широкой левой мышце нижней конечности. Векторы второй синергии демонстрировали также высокую степень сходства – 0.75 (рис. 2). При ЧЭССМ отмечено снижение вовлечения во вторую синергию икроножной правой и прямой мышцы бедра левой ноги, а также возрастание роли латеральной широкой ($p < 0.05$). В третьей выявленной синергии нагрузки были невысокими и не превышали 0.5, однако векторы синергии демонстрировали высокое сходство. В четвертой синергии отмечено существенное возрастание роли двуглавой мышцы бедра правой нижней конечности при стимуляции (рис. 2).

Установлено, что коэффициенты активации первой синергии при произвольных локомоциях в условиях вывески нижних конечностей имели выраженный пик активности в первой четверти локомоторного цикла (рис. 3). Внутрииндивидуальные паттерны временной активации синергии демонстрировали высокое сходство – 0.79 ± 0.03 , а CV не превышали 9.17% . Профили активации первой синергии при вызванных ЧЭССМ шагоподобных движениях оказались менее схожими, коэффициенты кросскорреляционных функций не превышали в среднем 0.33 ± 0.01 , однако оказывались низковариативными ($CV - 9.93\%$). Анализ соответствия временных профилей произвольных локомоторных движений и вызываемых ЧЭССМ показал среднее их соответствие – 0.41 ± 0.07 , а вариативность оценивалась как средняя, CV составляли в среднем 49.91% .

Временная структура второй мышечной синергии при произвольной ходьбе в горизонтальной

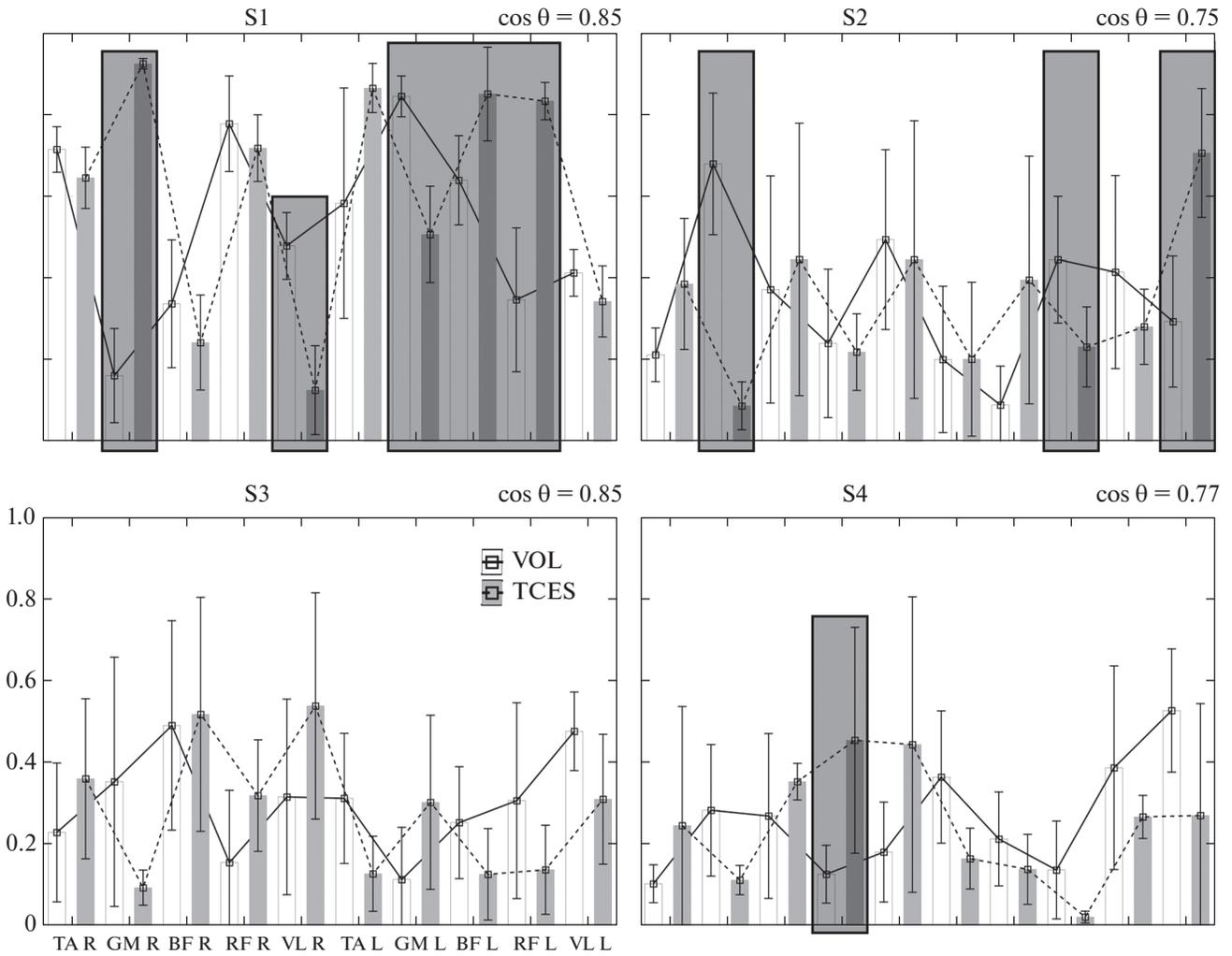


Рис. 2. Мышечные нагрузки и векторы синергий (сплошная и пунктирная линии) при произвольной ходьбе в условиях горизонтальной вывески нижних конечностей и при локомоциях, вызванных чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга. По оси абсцисс – скелетные мышцы, по оси ординат – коэффициенты. VOL – произвольная ходьба, TCES – ходьба, вызванная стимуляцией. Заливкой выделены достоверные различия мышечных нагрузок при $p < 0.05$. S1, 2, 3, 4 – номер синергии.

вывеске нижних конечностей отличалась средней воспроизводимостью циклов шага и низкой их вариативностью. Схожая структура и внутрииндивидуальная вариативность была отмечена и при непроизвольных локомоциях. Так, коэффициенты кросскорреляционных функций составляли 0.48 ± 0.06 , а коэффициенты вариативности не превышали 23.81%. При сравнении структуры второй синергии, полученной в разных экспериментальных условиях, были отмечены среднее их соответствие и средняя вариативность паттернов временной активации (рис. 3). Следует отметить, что во время произвольной ходьбы при внутрииндивидуальном рассмотрении отмечались пики активности синергии в разные периоды цикла шага, а при вызванных локомоциях, преимущественно, наблюдался один

выраженный пик, приходящийся на третью четверть движения.

При произвольной ходьбе третья мышечная синергия характеризовалась одним пиком активности, однако внутрииндивидуальные профили структуры циклов шага были существенно смещены во времени, на что указывают средние значения кросскорреляционных функций со смещением относительно нуля – 0.50 ± 0.03 и низкие коэффициенты вариативности, не превышающие в среднем по группе 16.51%. При локомоциях, инициируемых ЧЭССМ, наблюдалась схожая картина, но практически без смещения профилей активации (рис. 3). Отмечалось низкое сходство коэффициентов активации при произвольных и вызванных локомоциях – 0.28 ± 0.02 , CV – 17.45%.

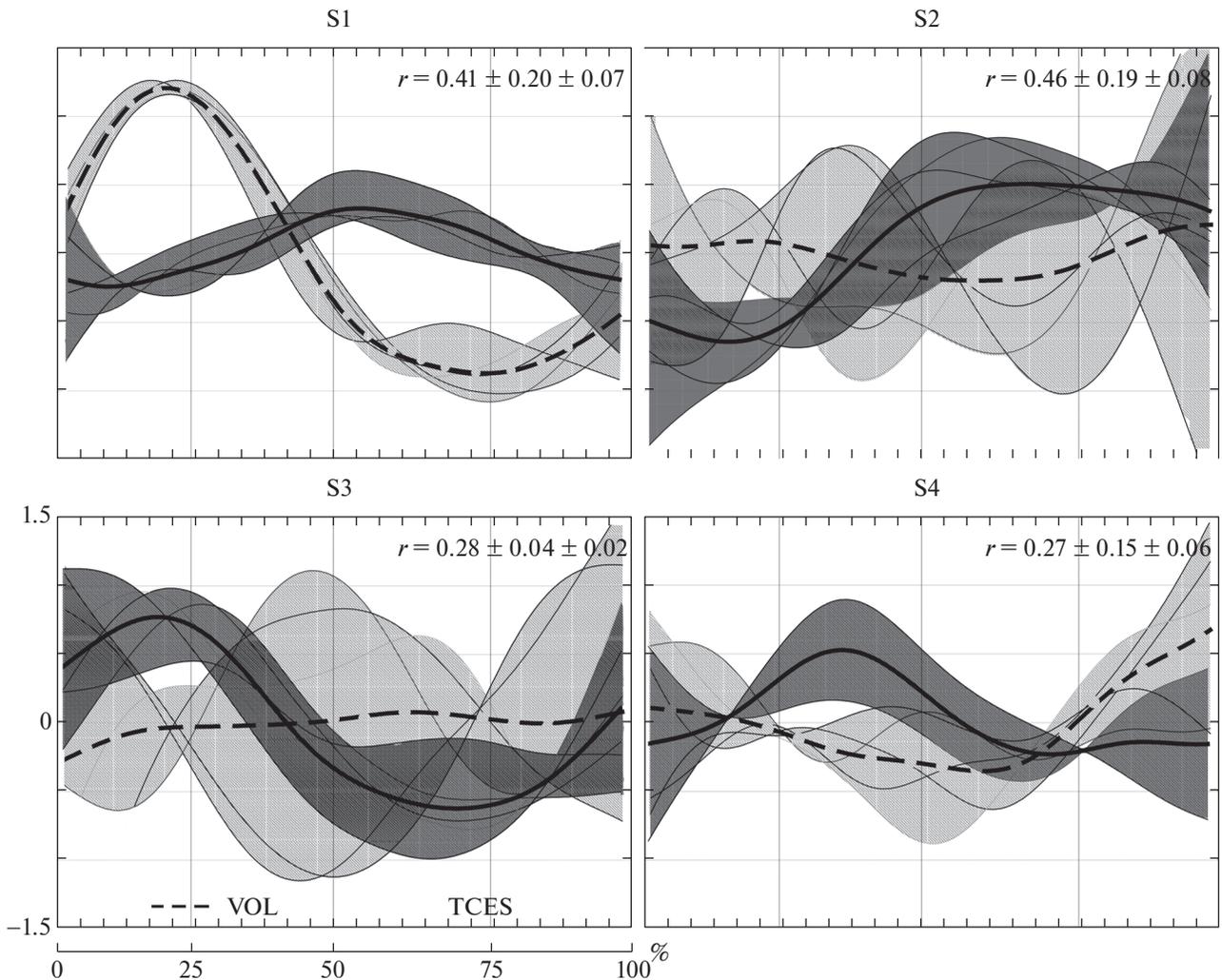


Рис. 3. Коэффициенты активации мышечных синергий при произвольной ходьбе в условиях горизонтальной вывески нижних конечностей и при локомоциях, вызванных чрескожной электрической стимуляцией спинного мозга. По оси абсцисс – прогресс цикла шага, по оси ординат – у.е. VOL – произвольная ходьба, TCES – ходьба, вызванная стимуляцией. Заливкой показаны крайние внутрииндивидуальные профили коэффициентов активации. Значения r представлены в виде $M \pm SD \pm SE$. S1, 2, 3, 4 – номер синергии.

Профили временной структуры четвертой установленной синергии демонстрировали возрастание активности к окончанию цикла шага, а при движениях, вызываемых ЧЭССМ, пик активности синергии приходился на вторую четверть цикла шага. Следует отметить низкую воспроизводимость структуры циклов при внутрииндивидуальном рассмотрении, коэффициенты кросскорреляционных функций в обоих рассматриваемых условиях локомоций оценивались как низкие – 0.29 ± 0.05 и 0.21 ± 0.01 соответственно. Сравнительный анализ временной структуры вызванных и произвольных локомоций показал также низкое ее сходство – 0.27 ± 0.06 , а CV достигали 54.86%, что оценивается как средняя вариативность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе количества извлекаемых компонент (мышечных синергий) и доли дисперсии, описываемой каждым из них, мы наблюдали меньшие значения обоих параметров при локомоциях, инициируемых ЧЭССМ. В целом такие результаты ожидаемы, поскольку даже биомеханическая структура цикла шага при локомоциях, вызываемых искусственно, несколько отличается от произвольных и сами условия их выполнения не типичны для ходьбы в вертикальном положении. Поэтому логично было бы ожидать, что и механизм управления локомоциями в таких условиях будет иметь некоторые особенности. Первое, на что хотелось бы обратить внимание – это снижение качества реконструкции исходных данных с применением PCA в условиях стимуляционного воздей-

ствия на спинной мозг. В обычных условиях синергетические взаимоотношения мышечных групп нижних конечностей регулируются спинальными генераторами паттернов, посредством реципрокных и коактивационных команд, а моторным выходом являются низковариативные стереотипные кинематические паттерны и характеристики мышечной активности [1, 2, 9]. Методами факторизации данных в таких условиях удастся учесть большую часть наблюдаемой дисперсии в параметрах мышечной активности, это было показано во многих исследованиях, где VAF как критерий эффективности извлечения синергий достигает 80% и более [6, 13, 14].

Электрическая стимуляция, воздействуя на спинальные нейрональные сети, вносит изменения в их организацию (частотный код синергий), что проявляется в снижении эффективности извлечения синергий. Причем эти изменения не являются сбивающим фактором в работе спинальных нейрональных структур, а являются средством целенаправленного на них воздействия. В пользу этого утверждения свидетельствуют наши результаты, демонстрирующие четкие очертания основных пиков активности синергий и высокую воспроизводимость временной структуры извлекаемых мышечных синергий при локомоциях, вызываемых ЧЭССМ. При произвольных локомоциях такое наблюдается только в первой синергии. Таким образом, искусственно вызванные локомоции в условиях горизонтальной вывески нижних конечностей имеют так называемые базовые (фундаментальные) профили временной активации, которые можно наблюдать при вертикальной ходьбе в обычных условиях, а произвольные шагательные движения в таких условиях чаще отличаются высокой вариативностью.

Концепция двигательного синергизма предполагает снижение вычислительной нагрузки на структуры нервной системы посредством объединения элементов системы в модули с меньшей размерностью. Исходя из этого, можно утверждать, что чем больше количество модулей, тем выше сложность управляющей системы. При ходьбе в обычных условиях регистрируют от четырех до пяти мышечных синергий. Это наблюдается при анализе активности мышц одной конечности или мышц одной стороны тела при беге, ходьбе, педалировании на велоэргометре [13, 15]. Вполне вероятно, что структура мышечных синергий при локомоторных движениях, так или иначе, может включать большинство поверхностных мышц нижних конечностей, однако участие каждой из них в структуре синергетических модулей в разных условиях реализации локомоций может различаться. Нами было показано, что при сравнении локомоций, вызываемых ЧЭССМ, и произвольных, существенно различаются мышечные нагрузки в структуре первой синергии, а именно, при вызванных

движениях возрастает роль GM правой, BF и RB левой ноги, снижается VL правой и GM левой. При этом векторы синергий оказываются в высокой степени схожими в разных условиях. Это свидетельствует о том, что пространственная структура естественных и вызванных локомоций имеет единый механизм управления, вероятно, реализуемый нейрональными сетями, локализованными на уровне T11 – T12 позвонков. Кроме того, формирование четкого очертания основных пиков активности во временной структуре мышечных синергий при движениях, вызываемых ЧЭССМ, свидетельствует в пользу этого утверждения.

Различия в компонентном составе мышечных синергий отмечаются даже при многократном повторении стереотипных движений, как дискретных, так и циклических. В этой связи вполне ожидаемо, что мышечные нагрузки в структуре извлекаемых нами синергий при произвольных и вызванных движениях оказались различными. Кроме того, “шагоподобная локомоторная активность” может быть представлена разными паттернами, в различной степени схожими по биомеханической структуре с реальными движениями [16]. Важными установленными факторами в нашем исследовании явилось высокое соответствие векторов синергий и низкая вариативность с четким очертанием основных пиков активности коэффициентов активации синергий при вызванных локомоциях. Такие результаты могут быть связаны со следующими положениями. Одна из теорий, описывающая сложное взаимодействие управляющих сигналов в ЦНС при локомоциях, предполагает наличие в структуре спинальных локомоторных генераторов двух независимых нейрональных сетей, осуществляющих управление ритмической активностью мышц сгибателей и разгибателей, включающих ритмогенерирующую часть и сеть, формирующую локомоторные паттерны [17–19]. Проводя аналогию с положениями концепции пространственно-временной архитектуры синергизма, коэффициенты активации мышечных синергий являются эквивалентом ритмогенерирующей части нейронной сети, управляющей локомоциями, а векторы синергий и мышечные нагрузки, определяющие соотношение активации мышечных групп, будут являться аналогией сети формирования паттернов. Таким образом, электрическая стимуляция спинного мозга на уровне T11–T12 позвонков, по меньшей мере, воздействует на ритмогенерирующую часть нейронной сети, что проявляется в формировании основных (фундаментальных) локомоторных временных паттернов.

Наблюдаемая нами вариативность временной структуры синергий при произвольной ходьбе в горизонтальной вывеске в ряде случаев связана со смещением коэффициентов активации, выявляемым при помощи кросскорреляционного анализа. Такие синергии обозначаются как “синергии, из-

меняющиеся во времени”, т.е. синергетические паттерны реализуются в разные временные периоды локомоторного цикла при их многократной реализации [14, 20, 21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, временная структура извлекаемых мышечных синергий при локомоциях в условиях электрической стимуляции спинного мозга имеет явно выраженные пики активности и высокую воспроизводимость паттернов активации. В ряде случаев они реализуются в разные временные периоды локомоторного цикла при их многократной реализации. Мышечные нагрузки в структуре выявленных синергетических модулей существенно различаются, однако векторы синергий оказываются в высокой степени схожими в разных экспериментальных условиях. Различия в параметрах пространственно-временной структуры мышечных синергий произвольных локомоций и модулируемых ЧЭССМ, могут быть связаны с реорганизацией ритмогенерирующей части нейрональной сети, осуществляющей управление ритмической активностью мышц сгибателей и разгибателей в структуре полного цикла шага.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотрудникам Научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта А.М. Пухову, В.В. Маркевич, С.М. Иванову за помощь в организации исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено в рамках плановой работы ФГБОУ ВО Великолукская государственная академия физической культуры и спорта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

С.А.М. — планирование, организация и участие в проведении экспериментов, регистрация и анализ полученных данных, обработка данных, подготовка текста рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Feldman AG, Levin MF, Garofolini A, Piscitelli D, Zhang L* (2021) Central pattern generator and human locomotion

in the context of referent control of motor actions. *Clin Neurophysiol* 132 (11): 2870–2889.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2021.08.016>

2. *Madarshahian S, Latash ML* (2022) Reciprocal and co-activation commands at the level of individual motor units in an extrinsic finger flexor-extensor muscle pair. *Exp Brain Res* 240 (1): 321–340.
<https://doi.org/10.1007/s00221-021-06255-w>
3. *Аришавский ЮИ, Делягина ТГ, Орловский ГН* (2015) Центральные генераторы: механизм работы и их роль в управлении автоматизированными движениями. *Журн высш нерв деят им ИП Павлова* 65 (2): 156–187. [*Arshavsky YI, Deliagina TG, Orlovsky GN* (2015) Central Pattern Generators: Mechanisms of the Activity and Their Role in the Control of “Automatic” Movements. *IP Pavlov J Higher Nerv Activit* 65 (2): 156–187. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0044467715020033>
4. *Gorodnichev RM, Pivovarova EA, Puhov A, Moiseev SA, Gerasimenko YP, Savochin AA, Moshonkina TR, Chsherbakova NA, Kilimnik VA, Selionov VA, Kozlovskaya IB, Edgerton VR* (2012) Transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord: a noninvasive tool for the activation of stepping pattern generators in humans. *Human Physiol* 38 (2): 158–167.
5. *Moiseev SA, Gorodnichev RM* (2017) Motor synergies structure variability in different intensity locomotions. *Human Physiol* 48 (4): 22–33.
<https://doi.org/10.31857/S0131164622040087>
6. *Turpin N, Uriac S, Dalleau G* (2021) How to improve the muscle synergy analysis methodology? *Eur J Appl Physiol* 121 (4): 1009–1025.
<https://doi.org/10.1007/s00421-021-04604-9>
7. *Overduin S, d’Avella A, Carmena J, Bizzi E* (2014) Muscle synergies evoked by microstimulation are preferentially encoded during behavior. *Front Comput Neurosci* 8: 20.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2014.00020>
8. *Cheung VC, d’Avella A, Bizzi E* (2009) Adjustments of motor pattern for load compensation via modulated activations of muscle synergies during natural behaviors. *J Neurophysiol* 101 (3): 1235–1257.
<https://doi.org/10.1152/jn.01387.2007>
9. *Гурфинкель ВС, Левик ЮС, Козенников ОВ, Селионов ВА* (1998) Существует ли генератор шагательных движений у человека? *Физиология человека* 24 (3): 42–50. [*Gurfinkel VS, Levik US, Kozennikov OV, Selionov VA* (1998) Is there a locomotor circuitry in humans? *Fiziol chelov* 24 (3): 42–50. (In Russ)].
10. *Minyaeva AV, Moiseev SA, Pukhov AM, Savokhin AA, Gerasimenko YP, Moshonkina TR* (2017) Response of external inspiration to the movements induced by transcutaneous spinal cord stimulation. *Human Physiol* 43 (5): 43–51.
<https://doi.org/10.7868/S0131164617050113>
11. *Moiseev SA, Ivanov SM, Gorodnichev RM* (2022) The Motor Synergies’ Organization Features at Different Levels of Motor Control during High Coordinated Human’s Movement. *J Evol Biochem Phys* 58: 610–622.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022020272>
12. *Moiseev S, Pukhov A, Mikhailova E* (2022) Methodological and computational aspects of extracting extensive muscle synergies in moderate-intensity locomotions.

- J Evol Biochem Phys 58: 88–97.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022010094>
13. *Ivanenko Y, Poppele R, Lacquaniti F* (2006) Motor control programs and walking. *Neuroscientist* 12 (4): 339–348.
<https://doi.org/10.1177/1073858406287987>
 14. *Hogan N, Sternad D* (2013) Dynamic primitives in the control of locomotion. *Front Comput Neurosci* 7: 71.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00071>
 15. *De Marchis C, Schmid M, Bibbo D* (2013) Inter-individual variability of forces and modular muscle coordination in cycling: a study on untrained subjects. *Hum Mov Sci* 32 (6): 1480–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.humov.2013.07.018>
 16. *Шанкова ЕЮ* (2004) Локализация и свойства спинальных генераторов локомоций (СЛГ), выявленные электростимуляцией спинного мозга у человека. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 90 (8): 420–432. [*Shapkova EY* (2004) Localization and properties of spinal locomotion generators (SLG) revealed by electrical stimulation of the spinal cord in humans. *Russ J Physiol* 90 (8): 420–432. (In Russ)].
 17. *Rybak I, Shevtsova N, Lafreniere-Roula M* (2006) Modeling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from deletions during fictive locomotion. *J Physiol* 577 (2): 617–639.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118703>
 18. *Churchland M, Cunningham J, Kaufman M* (2012) Neural population dynamics during reaching. *Nature* 487 (7405): 51–56.
<https://doi.org/10.1038/nature11129>
 19. *Hogan N, Sternad D* (2007) On rhythmic and discrete movements: reflections, definitions and implications for motor control. *Exp Brain Res* 181 (1): 13–30.
<https://doi.org/10.1007/s00221-007-0899-y>
 20. *Sternad D, Marino H, Charles S, Duarte M, Dipietro L, Hogan N* (2013) Transitions between discrete and rhythmic primitives in a unimanual task. *Front Comput Neurosci* 7: 90.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00090>
 21. *Overduin SA, d'Avella A, Roh J, Carmena JM, Bizzi E* (2015) Representation of Muscle Synergies in the Primate Brain. *J Neurosci* 35 (37): 12615–12624.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4302-14.2015>

Spatio-Temporal Patterns of Intermuscular Interaction during Locomotion Induced by Spinal Cord Percutaneous Electrical Stimulation

S. A. Moiseev

Velikiye Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikiye Luki, Russia

e-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru

The paper considers the spatiotemporal muscle synergies' structure during voluntary locomotions in conditions of lower extremities horizontal support, and when step-like movements modulated by transcutaneous electrical spinal cord stimulation (TESCS). The synergies were extracted by matrix decomposition using the principal component method (PCA). Fewer synergies were found in locomotion initiated by percutaneous electrical stimulation of the spinal cord. It has been established that the temporal structure of extracted muscle synergies during locomotion under spinal cord electrical stimulation has evident peaks of activity and high reproducibility of activation patterns. In some cases, they are implemented in different time periods of the locomotive cycle while their repeated performing. The muscle loads in the identified synergetic modules' structure are significantly differing, however, the synergy vectors turn out to be highly similar in different experimental conditions. The muscle synergies' spatiotemporal structure differences during voluntary and induced locomotions are probably related to the reorganization of the rhythmogenerating part of the spinal neuronal network that controls the structure of the locomotor cycle.

Keywords: muscle synergies, spinal cord electrical stimulation, locomotion, intermuscular interaction, motion control

АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ ТОНКОКЛЮВОЙ И ТОЛСТОКЛЮВОЙ КАЙРЫ: ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ И ГЕЛЬМИНТНОЙ ИНВАЗИИ

© 2022 г. М. М. Куклина^{1,*}, В. В. Куклин¹

¹ Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Россия

*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 21.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

Установлено, что в июне 2018 г. в период размножения спектр питания тонкоклювых кайр (*Uria aalge*) и толстоклювых кайр (*Uria lomvia*), гнездящихся на Гавриловских островах Баренцева моря, состоял из мелких рыб (мойва (*Mallotus villotus*), сайда (*Pollachius virens*) и молодь трески (*Gadus morhua*)) и ракообразных. В дистальном отделе тонкого кишечника у тонкоклювой кайры паразитировали цестоды *Alcataenia armillaris*, а у толстоклювой кайры — *A. armillaris* и *Tetrabothrius erostris*. У тонкоклювой кайры в кишечнике общая активность аминопептидазы N была выше, а общая активность мальтазы выше в кишечнике толстоклювых кайр. Активность дисахаридаз в тонком кишечнике кайр в дистальном направлении снижалась, активность аминопептидазы N увеличивалась. В месте паразитирования цестод *A. armillaris* и *T. erostris* в дистальном отделе кишечника у толстоклювой кайры снижалась активность и аминопептидазы N, и мальтазы.

Ключевые слова: *Uria aalge*, *Uria lomvia*, тонкоклювая кайра, толстоклювая кайра, аминопептидаза N, мальтаза, сахараза

DOI: 10.31857/S0044452922060067

Морские птицы (тонкоклювая кайра (*Uria aalge*) и толстоклювая кайра (*Uria lomvia*)) относятся к уникальным представителям морской орнитофауны, которые освоили три стихии — воздух, земля и вода. В период размножения кайры образуют многочисленные колонии на скалистых берегах островов и побережья Северного полушария, в том числе и в районах Мурманского побережья Баренцева моря [1]. Основной объект питания кайр — рыба, которую они добывают при нырянии [2]. При изучении морфологических характеристик близкородственных видов птиц (тонкоклювых и толстоклювых кайр) установлено, что способность кайр к маневрированию в воде тесно связана с их особенностями к добычанию пелагических рыб [3]. Spring подчеркивал, что толстоклювая кайра обладает более стабильным подводным плаванием и способна перемещаться на большие расстояния по сравнению с тонкоклювыми кайрами. Эти качества он рассматривал в качестве потенциала птиц указанного вида, который они могут использовать при добыче беспозвоночных животных и донных рыб. В связи с этим показатели активностей пищеварительных ферментов у двух видов кайр могут иметь различия в зависимости от особенностей питания [3].

Пищеварение морских птиц изучено мало. Ряд работ посвящен исследованию пищеварительных ферментов у буревестникообразных птиц (отр. Procellariiformes) и пингвинов (сем. Spheniscidae), которые участвуют в переваривании морских планктонных беспозвоночных — хитиназ и восковых эстераз [4, 5]. Опубликованы результаты определений активностей мальтазы, сахаразы и лактазы в тонком кишечнике у пяти видов морских птиц (хохлатого (*Eudyptes chrysocome*), королевского (*Aptenodytes patagonicus*) и папуанского (*Pygoscelis papua*) пингвинов, большого поморника (*Stercorarius skua*) и доминиканской чайки (*Larus dominicanus*)) [6]. Сведений об активности пищеварительных ферментов в слизистой кишечника толстоклювых и тонкоклювых кайр немного и они ограничены анализом общих показателей (в частности, общей протеолитической и гликозидазной активностей) [7]. При изучении пищеварения птиц исследователи часто используют значения активности ферментов (аминопептидазы N, мальтазы и сахаразы) для описания физиологии пищеварительной деятельности птиц на разных стадиях их развития, в период голодания и пищевого стресса, а также в зависимости от их спектра питания [8–12]. Установлено, что активность саха-

разы и мальтазы повышена в кишечнике птиц, в питании которых преобладают углеводы, а активность аминопептидазы N повышена в кишечнике птиц, в спектре питания которых доминируют белки [8–12].

Наряду с этим влияние паразитарной инвазии на пищеварение кайр также имеет большое значение. Многие гельминты используют в качестве среды обитания именно кишечник позвоночных животных (окончательных хозяев). В кишечнике черви достигают половозрелого состояния, активно питаются и выметывают большое количество яиц. При этом, в частности, у ленточных червей пищеварительная система отсутствует и они поглощают питательные вещества (аминокислоты, моносахариды и др.) всей поверхностью тела [13]. Кроме того, цестоды способны адсорбировать на тегументе ферменты из кишечника хозяина [14, 15]. Таким образом, гельминты могут представлять собой конкурентов для своих хозяев за пищевые ресурсы и быть причиной нарушений функций пищеварительной системы.

Определение активности аминопептидазы N, мальтазы и сахаразы в слизистой кишечника близкородственных видов птиц (тонкоклювой и толстоклювой кайр) стало целью представленного исследования. В качестве факторов, влияющих на пищеварительную активность, рассматривали кормовые предпочтения птиц и гельминтную инвазию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на взрослых особях тонкоклювой кайры *U. aalge* (Linnaeus, 1758) и толстоклювой кайры *U. lomvia* (Pontoppidan, 1763), которые гнездятся на Гавриловских островах Баренцева моря (Мурманский регион, Россия, 69°09'30"N 35°57'0E) на территории Кандалакшского государственного природного заповедника. Тонкоклювые ($n = 10$) и толстоклювые кайры ($n = 10$) отловлены с помощью орнитологической петли в июне 2018 г. Кайр добывали с разрешения Федеральной службы по надзору в сфере природопользования России (№ 01/2018). Все процедуры одобрены Кандалакшским государственным природным заповедником (Договор № 2018_19). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации.

Птиц усыпляли хлороформом, взвешивали, определяли их пол и оценивали уровень жирности по четырехбалльной шкале [16]. Уровень жирности регистрировали следующим образом: 1 – истощенные птицы; 2 – отсутствие брюшного жира; 3 – наличие брюшного жира; 4 – брюшной жир, сильно выступающий над грудью.

Желудочно-кишечный тракт вырезали, отделяли желудок, печень, поджелудочную железу и тонкий кишечник. Тонкий кишечник взвешивали (г), промывали ледяным физиологическим раствором и с помощью пинцета осторожно удаляли брыжейки и жир, чтобы можно было его выпрямить. Тонкий кишечник делили на три отдела: проксимальный (от пилорического сфинктера) (ПО), медиальный (МО) и дистальный (ДО). Химус собирали и использовали для паразитологического анализа. Слизистую оболочку каждого отдела снимали шпателем для биохимического анализа. Длину и ширину каждого участка кишечника измеряли линейкой. Измерения проводились на гладкой стеклянной поверхности, которая была смочена физиологическим раствором. По результатам измерений определены значения длины тонкого кишечника (см) и площади поверхности тонкого кишечника (см²).

Печень и поджелудочную железу очищали от посторонних тканей и взвешивали (г).

Слизистую оболочку из каждого отдела кишечника гомогенизировали в 20 объемах ледяного физиологического раствора. Гомогенат разливали по нескольким пластиковым пробиркам, замораживали и хранили при температуре -20°C до дальнейшего исследования.

Активность аминопептидазы N (EC 3.4.11.2) определяли с использованием субстрата L-аланин-p-нитроанилида (Sigma, США) [17]. К 0.1 мл гомогената добавляли 1 мл раствора (2.04 mM L-аланин-p-нитроанилида в 0.2 M фосфатном буфере ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0)). Реакцию инкубировали в течение 10 мин при 40°C , а затем останавливали 3 мл 2 M ледяной уксусной кислоты. Оптическую плотность раствора измеряли при 384 нм. Активность аминопептидазы N (мМ/мин/г ткани) определяли с использованием стандартной кривой p-нитроанилида.

Активности дисахаридаз измеряли по методу Dahlqvist [18] в модификации Martinez del Rio [19]. Активности мальтазы (EC 3.2.1.20) и сахаразы (EC 3.2.1.48) определяли с использованием субстрата 56 mM растворов мальтозы и 56 mM растворов сахарозы в 0.1 M малеат/NaOH, pH 6.5. Аликвоты по 0.1 мл гомогената инкубировали с 0.1 мл растворов мальтозы или 0.1 мл сахарозы в течение 10 мин при 40°C . Затем для определения концентрации глюкозы к инкубационной смеси добавляли 2.0 мл смеси ферментов (глюкооксидазы и пероксидазы) (глюкооксидазный метод, “Абрис+”, Россия) [20]. Через 30 мин измеряли оптическую плотность раствора при 505 нм. Активность дисахаридаз (мМ/мин/г ткани) определяли с использованием стандартной кривой глюкозы.

Общую гидролитическую активность ферментов (аминопептидазы N, мальтазы и сахаразы) всего тонкого кишечника рассчитывали путем умно-

Таблица 1. Состав и относительная встречаемость кормов (%) в желудках *Uria lomvia* и *Uria aalge*, гнездящихся на Гавриловских островах Баренцева моря, июнь 2018 г.

Вид корма	<i>Uria lomvia</i>		<i>Uria aalge</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>N</i>	15		17	
Мойва (<i>Mallotus villosus</i>)	6	40.0	7	41.2
Сайда (<i>Pollachius virens</i>)	5	33.3	5	34.0
Треска (<i>Gadus morhua</i>)	4	26.7	2	11.8
Европейская песчанка (<i>Ammodytes tobianus</i>)	—	—	1	5.9
Атлантическая сельдь (<i>Clupea harengus</i>)	—	—	2	11.8

N — общее количество зарегистрированных кормов; *n* — количество зарегистрированных кормов определенной группы.

жения активности ферментов на 1 г ткани в каждом отделе на 1/3 общей массы тонкой кишки и суммирования по трем отделам.

Для определения спектра питания кайр изучали содержимое желудков. Желудок разрезали продольно по всей длине, вскрывали и промывали смесью морской и пресной воды в соотношении 1:1. Остатки добычи в каждом образце желудка определяли с использованием бинокулярного микроскопа EZ4D Leica (Германия). Отолиты, оставшиеся в желудке, идентифицировали на минимально возможном таксономическом уровне [21]. Отолиты из желудка каждой птицы помещали в пробирки, заполненные 70%-ным этиловым спиртом, для длительного хранения. На основании результатов рассчитывали относительную встречаемость различных групп кормов как отношение количества зарегистрированных кормов определенной группы к общему количеству зарегистрированных кормов всех групп: $F = n/N \times 100\%$, где *n* — количество зарегистрированных кормов определенной группы. *N* — общее количество зарегистрированных наименований всех групп кормов.

Паразитологический анализ проводили по стандартной методике. Цестод извлекали, промывали водой и фиксировали в 70%-ном этаноле. Фиксированных червей окрашивали муцикармином (Fluka, Германия) и помещали в канадский

бальзам. Систематическую принадлежность гельминтов определяли под световым микроскопом Микмед 2 (ЛОМО, Россия) при увеличении $\times 300$ с использованием идентификационных ключей [22]. Рассчитали количественные показатели заражения — интенсивность инвазии (ИИ), экстенсивность инвазии (ЭИ) и индекс обилия (ИО).

Результаты измерений активности ферментов представлены в виде среднего значения \pm ошибки средней ($\pm SE$). Проверку нормальности распределения выборки проводили с использованием критерия асимметрии и эксцесса. Достоверность различий между морфометрическими измерениями, значениями активностей ферментов у толстоклювых и тонкоклювых кайр, а также влияние гельминтной инвазии на активность ферментов оценивали по непараметрическому критерию Уилкоксона—Манна—Уитни ($p < 0.05$). Достоверность различий в активности ферментов между отделами кишечника у двух видов кайр определяли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями. Связь между составом спектра питания и видами птиц изучали при помощи критерия Пирсона. Статистический анализ проводили с использованием программных пакетов Microsoft Excel и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В желудках *U. aalge* и *U. lomvia* обнаружены только отолиты рыб. Мойва (*Mallotus villosus*), сайда (*Pollachius virens*) и треска (*Gadus morhua*) были самыми распространенными объектами питания у обоих видов кайр (табл. 1). Примечательно, что европейская песчанка (*Ammodytes tobianus*) и атлантическая сельдь (*Clupea harengus*) найдены только в желудках тонкоклювых кайр. Частота встречаемости обнаруженных видов рыб в спектре питания кайр не связана с видом птиц ($X_{5,1}^2 = 0.21$, $df = 4$, $p = 0.27$).

В тонком кишечнике толстоклювых кайр паразитировали цестоды *A. armillaris* и *T. erostris*, у тонкоклювых кайр зафиксированы только *A. armillaris* (табл. 2). Цестоды *A. armillaris* обнаружены в дистальном отделе тонкого кишечника у обоих видов птиц. Цестода *T. erostris* также паразитировала в ди-

Таблица 2. Показатели инвазии в тонком кишечнике *Uria lomvia* и *Uria aalge*, гнездящихся на Гавриловских островах Баренцева моря, июнь 2018 г.

Вид цестоды	<i>Uria lomvia</i>			<i>Uria aalge</i>		
	ЭИ, %	ИИ, экз.	ИО, экз.	ЭИ, %	ИИ, экз.	ИО, экз.
<i>Alcataenia armillaris</i>	40.0	1–8	1.2	30.0	1–8	1.3
<i>Tetrabothrius erostris</i>	30.0	1.0	0.3	—	—	—

Интенсивность инвазии (ИИ), экстенсивность инвазии (ЭИ) и индекс обилия (ИО).

Таблица 3. Морфометрические параметры *Uria lomvia* и *Uria aalge*, гнездящихся на Гавриловских островах Баренцева моря, июнь 2018 г.

Параметры	<i>Uria lomvia</i>	<i>Uria aalge</i>
Масса тела (г)	1014.8 ± 14.2	1087.4 ± 18.0*
Уровень жирности	2.7 ± 0.28	3.0 ± 0.14
Масса печени (г)	60.8 ± 1.6	59.5 ± 1.3
Масса поджелудочной железы (г)	5.2 ± 0.42	4.0 ± 0.22
Масса тонкого кишечника (г)	39.4 ± 1.9	33.8 ± 2.6
Площадь поверхности тонкого кишечника (см ²)	191.0 ± 4.9	163.5 ± 3.6*
Длина тонкого кишечника (см)	116.0 ± 3.2	94.7 ± 1.2*

* Достоверные различия между двумя видами кайр ($p < 0.05$).

Таблица 4. Общая гидролитическая активность ферментов *Uria lomvia* и *Uria aalge*

Активность ферментов	<i>Uria lomvia</i>	<i>Uria aalge</i>
Аминопептидаза N	9.0 ± 0.7	12.9 ± 1.3 *
Мальтаза	11.3 ± 1.2	7.8 ± 0.8 *
Сахараза	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1
Аминопептидаза N/ мальтаза	0.9 ± 0.09	1.7 ± 0.13 *

* Достоверные различия между двумя видами кайр ($p < 0.05$).

стальном отделе тонкого кишечника толстоклювой кайры.

Сравнительный анализ некоторых морфометрических параметров двух видов кайр показал, что масса тела достоверно выше у тонкоклювой кайры ($p < 0.05$) (табл. 3). Длина и площадь поверхности тонкого кишечника были выше у толстоклювой ($p < 0.05$). Значения уровня жирности, массы печени, поджелудочной железы и тонкого кишечника не имели достоверных различий у обоих видов кайр.

Общая активность аминопептидазы N была выше в тонком кишечнике тонкоклювой кайры ($p < 0.05$) (табл. 4). В свою очередь, общая активность мальтазы была выше в тонком кишечнике толстоклювой кайры ($p < 0.05$). Соотношение активностей аминопептидазы N и мальтазы у тонкоклювой кайры было более чем в 1.8 раза выше, чем у толстоклювой кайры ($p < 0.05$). Общая активность сахаразы не имела существенных различий как у *U. aalge*, так и у *U. lomvia* ($p < 0.05$).

Активность аминопептидазы N в тонком кишечнике увеличивалась в проксимально-дистальном направлении как у *U. aalge*, так и у *U. lomvia* (рис. 1а). Сравнительный анализ показал, что значения активности аминопептидазы N у тонкоклювой кайры были выше вдоль тонкого кишечника

аналогичных показателей у толстоклювой кайры (ПО: $F_{2,1} = 3.2, p < 0.01$; МО: $F_{4,1} = 12.9, p < 0.01$; ДО: $F_{2,1} = 2.9, p < 0.01$). Активность мальтазы и сахаразы снижалась от проксимального отдела к дистальному у птиц обоих видов (рис. 1б, с). Активность мальтазы в проксимальном отделе кишечника толстоклювой кайры была выше, чем у тонкоклювой кайры ($F_{2,1} = 3.5, p < 0.01$). В медиальном отделе у толстоклювой кайры установлена более высокая активность сахаразы, чем у тонкоклювой кайры ($F_{2,1} = 2.3, p < 0.05$).

Активности аминопептидазы N и мальтазы в дистальных отделах кишечника толстоклювых кайр, зараженных цестодами *A. armillaris*, снижались по сравнению с показателями незараженных птиц ($p < 0.05$) (рис. 2а, 3а). При инвазии цестодами *T. erostris* активность аминопептидазы N и мальтазы в дистальных отделах кишечника зараженных толстоклювых кайр также уменьшалась, а активность мальтазы в проксимальном отделе увеличивалась относительно показателей контроля ($p < 0.05$) (рис. 2а, 3а). Показатели активности сахаразы в кишечнике у толстоклювых кайр при инвазии не имели достоверных отличий по сравнению с аналогичными параметрами у кайр, свободных от инвазии (рис. 4а). Не обнаружено статистических различий в значениях активности аминопептидазы N, мальтазы и сахаразы во всех отделах тонкого кишечника между незараженными тонкоклювыми кайрами и тонкоклювыми кайрами, зараженными *A. armillaris* (рис. 2б, 3б, 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По анализу содержимого желудков толстоклювой и тонкоклювой кайр, гнездящихся на Гавриловских островах Баренцева моря, установлено, что рыба (мойва, песчанка, треска) составляет основу спектра питания у обоих видов птиц. При рассмотрении результатов паразитологического вскрытия можно заключить, что и толстоклювая кайра, и тонкоклювая кайра наряду с этим питались и ракообразными. Это следует из того факта, что в тонком кишечнике обоих видов птиц обнаружены цестоды *A. armillaris*. Известно, что цистецеркоиды цестод *A. armillaris* используют ракообразных (например, эвфаузиид *Euphausia similis*) в качестве промежуточных хозяев и попадают в кишечник кайр при поедании ими амфипод и эвфаузиид [23]. Согласно результатам ранее проведенных исследований, тонкоклювые кайры питаются главным образом рыбой, а в спектр питания толстоклювой кайры входят и рыба, и раки [1, 2, 24]. В то же время известно, в частности, что крупный пелагический планктон (эвфаузииды *Thysanoessa* sp.) был основной добычей обоих видов кайр, гнездящихся близ о. Медвежий в центральной части Баренцева моря [25]. Mehlum предположил, что в соответствии с теорией оптимального

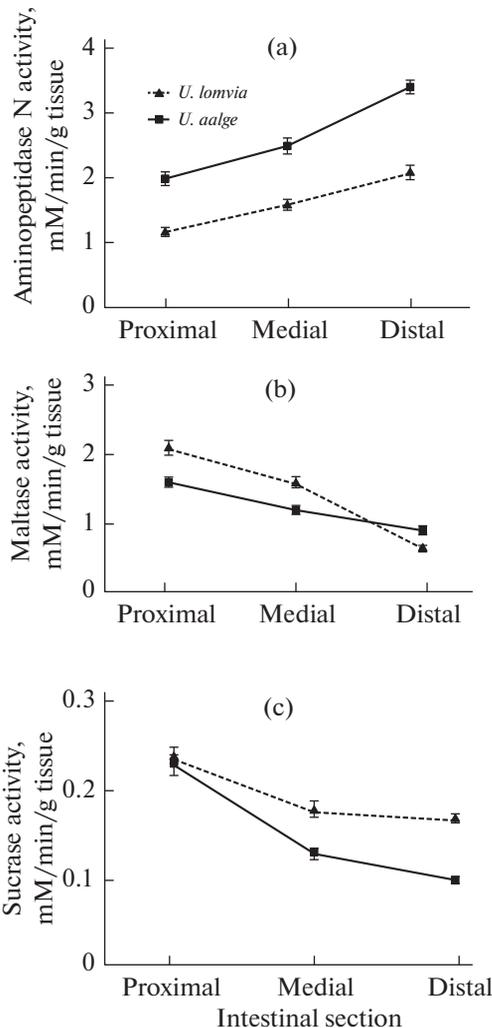


Рис. 1. Активность аминопептидазы N (а), мальтазы (б) и сахаразы (с) в трех отделах тонкого кишечника *U. lomvia* (n = 10) и *U. aalge* (n = 10). Представлены средние значения (\pm SE) для *U. lomvia* (треугольник) и *U. aalge* (квадрат).

кормления кайры добывают крупную и высококалорийную добычу (мойву) для вскармливания птенцов, а сами питаются ракообразными в годы с низким обилием рыбы [25]. Но, не смотря на устойчивую схожесть в спектре питания у толстоклювой и тонкоклювой кайр в представленной работе, пищеварительная активность и некоторые морфологические параметры тонкого кишечника имели статистически достоверные различия.

Активность аминопептидазы N выше у тонкоклювой кайры, активность мальтазы выше у толстоклювой кайры (табл. 3). На активность пищеварительных ферментов птиц влияют множество факторов, но определяющее значение специалисты отводят составу кормов [11, 12, 17, 26, 27]. Исследователи предположили, что модуляция активности пищеварительных ферментов представляет

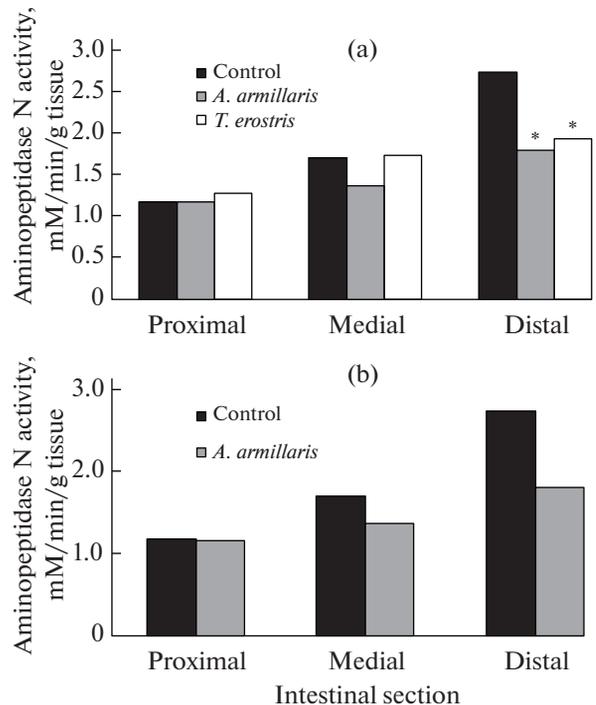


Рис. 2. Влияние заражения *Alcataenia armillaris* и *Tetrabothrius erostris* на активность аминопептидазы N. Активность аминопептидазы N представлена в трех отделах тонкого кишечника *U. lomvia* (а) и *U. aalge* (б). Указаны средние значения (\pm SE) незараженных кайр (контроль) и кайр, зараженных *A. armillaris* и *T. erostris*. Отмечено снижение активности аминопептидазы N в дистальном отделе тонкого кишечника у *U. lomvia*, зараженной *A. armillaris* ($p < 0.05$) и *T. erostris* ($p < 0.05$).

механизм, с помощью которого желудочно-кишечный тракт может реагировать на изменения в составе и качестве кормов [26]. Так, была предложена теория адаптивной модуляции, согласно которой активность пищеварительных ферментов должны соответствовать уровню субстрата, чтобы полностью переварить доступные питательные вещества, избегая при этом синтеза ненужных (невостребованных) ферментов [26]. Экспериментальные исследования показали, что с увеличением содержания азота в диете молодых особей крякв (*Anas platyrhynchos*), воробьиных (сем. Passeridae) и славковых (сем. Sylviidae) птиц повышается активность аминопептидаз в тонком кишечнике [17, 28, 29]. Зависимость активности карбогидраз в тонком кишечнике при диете с высоким содержанием углеводов отмечена для обыкновенных перепелов (*Coturnix coturnix*) и домашних кур (*Gallus gallus*) [29]. Измеряя активность аминопептидазы N, мальтазы и сахаразы в кишечнике птиц, было предложено использовать соотношение значений активностей аминопептидазы N и мальтазы [17, 27]. Этот параметр отражает относительную способность птиц гидролизовать белки по сравнению с углеводами, а также, по рекомендации Сабата,

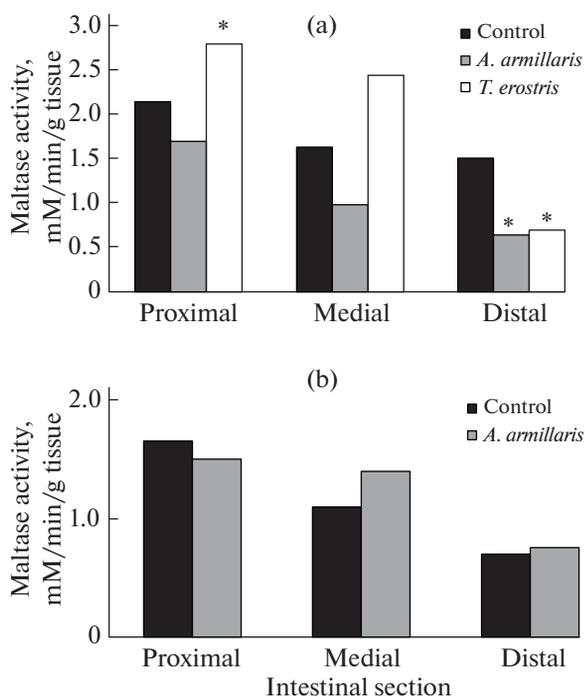


Рис. 3. Влияние *Alcataenia armillaris* и *Tetrahobthrius erostris* на активность мальтазы. Активность мальтазы представлена в трех отделах тонкого кишечника *U. lomvia* (a) и *U. aalge* (b). Указаны средние значения (\pm SE) для незараженных кайр (контроль) и кайр, зараженных *A. armillaris* и *T. erostris*. Отмечены увеличение активности мальтазы в проксимальном отделе показано для *U. lomvia*, зараженной *T. erostris* ($p < 0.05$) и снижение активности мальтазы в дистальном отделе показано для *U. lomvia*, зараженной *A. armillaris* ($p < 0.05$) и *T. erostris* ($p < 0.05$).

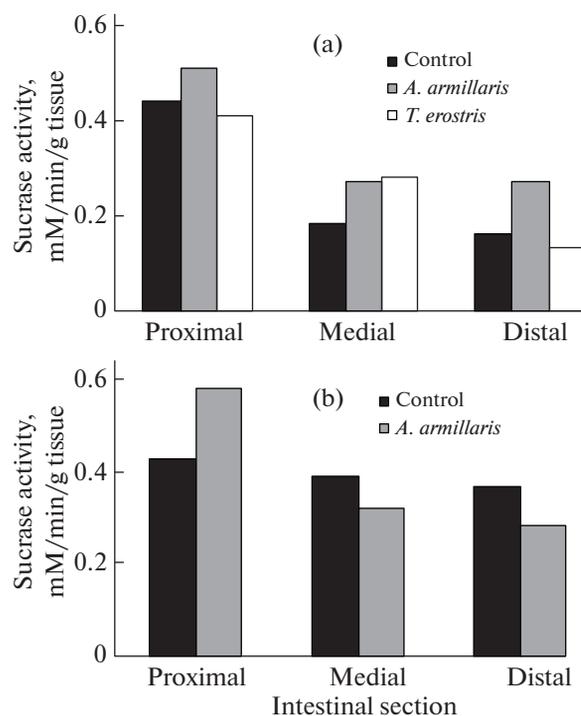


Рис. 4. Влияние *Alcataenia armillaris* и *Tetrahobthrius erostris* на активность сахаразы. Активность сахаразы представлена в трех отделах тонкого кишечника *U. lomvia* (a) и *U. aalge* (b). Указаны средние значения (\pm SE) для незараженных кайр (контроль) и кайр, зараженных *A. armillaris* и *T. erostris*. Не обнаружено достоверных различий между значениями активности сахаразы у незараженных кайр и кайр, зараженных цестодами *T. erostris* и *A. armillaris*.

может быть показателем относительного содержания белков и углеводов в диете птиц из природных популяций [27]. Соотношение между активностями аминопептидазы N и мальтазы у тонкоклювой и толстоклювой кайр выше, чем у травоядных и всеядных птиц, и сопоставимо с таковой у чилийского водяного печника (*Cinclodes nigrofumosus*), спектр питания которого составляют ракообразные и морские беспозвоночные [27]. Так как невозможно всесторонне оценить спектр питания тонкоклювой и толстоклювой кайр из природных популяций, то можно с высокой долей вероятности предположить, что в диете обоих видов присутствовали объекты с высоким содержанием белка. Сравнительный анализ показал, что соотношение активностей аминопептидазы N и мальтазы у тонкоклювой кайры превышает аналогичный параметр у толстоклювой кайры (табл. 3). Следовательно, гидролиз белков в тонком кишечнике тонкоклювой кайры протекал интенсивнее, что, по-видимому, связано с более высоким содержанием белка в их диете по сравнению с толстоклювой кайрой.

Активность пищеварительных ферментов — это не единственное условие, влияющее на эффективность питания и усвоение птицами питательных веществ. Различия во времени удержания пищи в желудочно-кишечном тракте также играют значительную роль в усвоении питательных субстратов [30].

По типу питания морских птиц, принадлежащих к семейству Alcidae (в том числе тонкоклювых и толстоклювых кайр), относят к видам-специалистам и рассматривают их как животных, предпочитающих определенный вид кормов (рыба) [31]. В отличие от видов-универсалов (серебристая чайка (*Larus argentatus*) и моевка (*Rissa tridactyla*), спектр питания которых широк и разнообразен, у толстоклювой и тонкоклювой кайр длина тонкого кишечника короче, а время переваривания и усвоения пищи менее продолжительное [31]. Согласно выводам Hilton и соавт. исследования, сам факт употребления высококалорийных кормов (рыбы) компенсирует ее более низкую усвояемость по сравнению с птицами, имеющими более длинный кишечник (чем короче тонкий кишечник, тем меньше время переваривания и усвоение пищи в

нем) [31]. В ходе нашего исследования установлено, что длина тонкого кишечника и площадь его поверхности у тонкоклювой кайры меньше, чем у толстоклювой кайры (табл. 2). При этом, как уже отмечалось выше, тонкоклювая кайра имеет более узкую пищевую специализацию и потребляет главным образом рыбу. У толстоклювых кайр, имеющих более длинный тонкий кишечник, пищеварение вероятно медленное и более эффективное, но при этом они активнее, чем тонкоклювые кайры, добывают менее качественные и калорийные корма (прежде всего ракообразных). Представленные результаты подтверждают теорию, выдвинутую Hilton и соавт., об особенностях пищеварения морских птиц и морфологии кишечника [31, 32].

В целом на распределение активности ферментов вдоль тонкого кишечника птиц влияют многие факторы (спектр питания, сезон, возраст, период жизненного цикла, а также морфологические особенности различных частей тонкого кишечника) [8, 10, 28, 33–35]. У многих видов птиц активность дисахаридаз снижается вдоль тонкого кишечника в проксимально-дистальном направлении. Как предполагали исследователи, это связано с уменьшением концентрации пищевого субстрата в тонком кишечнике [36]. Для аминопептидаз обнаружена обратная зависимость [8, 10, 34, 35]. У тонкоклювой и толстоклювой кайр прослежена аналогичная тенденция. Активности мальтазы и сахаразы в слизистой снижались в проксимально-дистальном направлении вдоль тонкого кишечника, активность аминопептидазы N, напротив, повышалась.

В дистальном отделе тонкого кишечника у толстоклювой кайры паразитировали цестоды *A. armillaris* и *T. erostris*, а у тонкоклювой кайры — только *A. armillaris*. Снижение активности аминопептидазы N и мальтазы в месте локализации *A. armillaris* и *T. erostris* зарегистрировано в слизистой тонкого кишечника только у толстоклювых кайр. Ранее в местах локализации *T. erostris* зарегистрировано снижение активности протеаз у моевки и серебристой чайки независимо от возраста. У птенцов серебристых чаек, зараженных *T. erostris*, отмечено снижение активности протеаз вдоль всей длины тонкого кишечника [14]. У птенцов моевки при инвазии *T. erostris* уменьшалась активность гликозидаз как в месте локализации червей, так и вдоль всего кишечника [37]. Снижение активности пищеварительных ферментов, главным образом, ферментов гидролиза белков связывают со способностью червей в кишечнике ингибировать активность протеаз хозяина [38, 39]. Так, например, гомогенаты *T. erostris* из тонкого кишечника моевки и серебристой чайки инактивировали активность трипсина от 62.2 до 79.6% и активности протеаз слизистой из тонкого кишечника птиц от 16.4 до 37.8% [38]. Можно предположить, что снижение

активности ферментов гидролиза белков (аминопептидазы N) в слизистой тонкого кишечника толстоклювых кайр вызвано ингибированием ее активности цестодами *A. armillaris* и *T. erostris*. Вероятно, ленточные черви *A. armillaris* и *T. erostris* выступают в качестве конкурентов для толстоклювых кайр не только за пищевые ресурсы, но и в некоторой степени способны влиять на активность пищеварительных ферментов.

В результате исследования установлено, что инвазия цестодами *A. armillaris* не влияет на активность пищеварительных ферментов в тонком кишечнике тонкоклювых кайр. По литературным данным известно, что указанным видом *A. armillaris* заражены преимущественно толстоклювые кайры [40, 41]. Если инвазия *A. armillaris* и фиксируется у тонкоклювых кайр, то значения ее показателей значительно ниже параметров заражения толстоклювых кайр [42]. В представленной работе показатели инвазии (ИИ, ИО) у тонкоклювых и толстоклювых кайр не имели достоверных отличий (табл. 2). В связи с тем, что из 10 особей тонкоклювой кайры только три заражены цестодами *A. armillaris*, выводы о влиянии паразитарной инвазии на пищеварительную активность птиц носят предварительный характер. Хотя обнаруженные отличия в особенностях пищеварения (длина и площадь тонкого кишечника, активности аминопептидазы N и мальтазы) у двух близкородственных видов кайр, вероятно, могут определять степень влияния гельминтов на процессы пищеварения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность администрации и сотрудникам Кандалакшского государственного природного заповедника за помощь в проведении полевых работ, научному сотруднику ММБИ РАН А.В. Ежову за помощь в сборе материала.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме “Морские птицы Арктики и Субарктики: биология, физиология, паразитология” (№ госрегистрации 121091600102-3) в рамках государственного задания ММБИ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (М.М.К.), планирование экспериментов (М.М.К.), сбор данных (М.М.К., В.В.К.), обработка данных (М.М.К., В.В.К.), написание и редактирование манускрипта (М.М.К., В.В.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krasnov YV, Barrett RT, Nikolaeva NG* (2007) Status of black-legged kittiwakes (*Rissa tridactyla*), common guillemots (*Uria aalge*) and Brünnich's guillemots (*U. lomvia*) in Murman, north-west Russia, and Varanger, north-east Norw. *Polar Res* 26: 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1751-8369.2007.00015.x>
2. *Anker-Nilssen T, Bakken V, Strøm H, Golovkin AN, Bianki VV, Tatarinkova IP* (2000) The Status of Marine Birds Breeding in the Barents Sea Region; Norsk Polarinstitutt: Tromsø, Norway.
3. *Spring L* (1971) A comparison of functional and morphological adaptations in the common murre (*Uria aalge*) and thick-billed murre (*Uria lomvia*). *The Condor* 73: 1–27. <https://doi.org/10.2307/1366120>
4. *Jackson S, Place AR, Seiderer LJ* (1992) Chitin digestion and assimilation by seabirds. *The Auk* 109: 758–770. <https://doi.org/10.2307/4088151>
5. *Place AR* (1992) Comparative aspects of lipid digestion and absorption: physiological correlates of wax ester digestion. *Am J Physiology-Regulatory* 263: 464–471. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.263.3.R464>
6. *Kerry KR* (1969) Intestinal disaccharidase activity in a monotremes and eight species of marsupials (with an added note on the disaccharidases of five species of seabirds). *Comp Biochem Physiol* 29: 1015–1022. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91003-2](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91003-2)
7. *Kuklina MM, Kuklin VV* (2012) Activity of digestive enzymes of thick-billed guillemot (*Uria lomvia*) and common guillemot (*U. aalge*) invaded by cestodes. *J Evol Biochem Physiol* 48: 272–279. <https://doi.org/10.1134/S0022093012030036>
8. *Chediack JG, Furrer SC, Cid FD, Filippa V, Caviedes-Vidal E* (2012) Effect of fasting on the structure and function of the gastrointestinal tract of house sparrows (*Passer domesticus*). *Compar Biochem Physiol Part A*. 163: 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.189>
9. *Gatica-Sosa C, Brzęk P, Chedlack JG, Cid FD, Karasov WH, Caviedes-Vidal E* (2016) Differential transcriptional responses underlie dietary induction of intestinal carbohydrase activities in house sparrow nestlings. *Animal Physiol Animal Nutrition* 100: 236–242. <https://doi.org/10.1111/jpn.12354>
10. *Garro C, Brun A, Caviedes-Vidal E* (2017) Aminopeptidase activity is related to the amino acids composition of the food to passerine birds. *Peer J Preprints* e3443v2 <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.3443v2>.
11. *Ramirez-Otarola N, Naya DE, Sabat P* (2018) Seasonal changes in digestive enzymes in five bird species. *Canad J Zool* 96: 707–712. <https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0350>
12. *Newman J, Maurer M, Forbey JS, Brittas R, Johansson Ö, Nielsen Ó, Willebrand T, Kohl KD* (2021) Low activities of digestive enzymes in the guts of herbivorous grouse (Aves: Tetraoninae). *J Ornithol* 162: 477–485. <https://doi.org/10.1007/s10336-020-01835-z>
13. *Dalton JP, Skelly P, Halton DW* (2004) Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Can J Zool* 82: 211–232. <https://doi.org/10.1139/z03-213>
14. *Kuklina MM, Kuklin VV* (2016) The activities of digestive enzymes as a determinant factor in the localization of *Tetrabothrius erostris* (Loennberg) (Cestoda: Tetrabothriidae) in the intestine of the herring gull *Larus argentatus* Pontoppidan. *Inland Water Biol* 9: 82–88. <https://doi.org/10.1134/S1995082916010107>
15. *Izvekova GI, Frolova TV, Izvekov EI* (2017) Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda). *Helmintologia* 54: 3–10. <https://doi.org/10.1515/helm-2017-0001>
16. *Ashford RW* (1971) Blood parasites and migratory fat at lake Chad. *Ibis* 113: 100–101. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1971.tb05127.x>
17. *Ramirez-Otarola N, Narváez C, Sabat P* (2011) Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds; dietary and phylogenetic correlates. *Compar Physiol Part B* 181: 817–827. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0557-3>
18. *Dahlqvist A* (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 22: 99–107. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90263-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90263-7)
19. *Martínez del Río C* (1990) Dietary, phylogenetic, and ecological correlates of intestinal sucrose and maltase activity in birds. *Physiol Zool* 63: 87–101. <https://doi.org/10.1086/physzool.63.5.30152625>
20. *Trinder P* (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6: 24–27. <https://doi.org/10.1177/000456326900600108>
21. *Campana SE* (2004) Photographic atlas of fish otoliths of the Northwest Atlantic oceans. National Res Council Canada, Ottawa.
22. *Ryzhikov KM, Rusavy B, Khokhlova IG, Tolkatchova LM, Kornychin VV* (1985) Helminths of Fish-Eating Birds of the Palaearctic Region II. Cestoda and Acanthocephales. *Acad Praha*.
23. *Shimazu T* (1975) On the parasitic organisms in a krill, *Euphausia similis*, from Suruga Bay. V. Larval cestodes. *Jap J Parasitol* 24: 122–128.
24. *Ежов АВ* (2019) Реакций моевок (*Rissa tridactyla*) и кайр (*Uria aalge* и *U. lomvia*) Мурманна на многолетнюю нестабильность кормовой базы в Баренцевом море. *Вестник ТвГУ Сер Биол экол* 53: 72–82. [*Ezhov AV* (2019) Murman kittiwake (*Rissa tridactyla*) and guillemot (*Uria aalge* и *U. lomvia*) reaction on the long-term instability of food availability in Barents Sea. *Herald of Tver St Univ. Series: Biol Ecol* 53: 72–82. (In Russ)].
25. *Mehlum F* (2001) Crustaceans in the diet of adult common and Brünnich's guillemots *Uria aalge* and *U. lomvia* in the Barents Sea during the breeding period. *Marine Ornithol* 29: 19–22.
26. *Karasov WH, Diamond JM* (1988) Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience* 38: 602–611. <https://doi.org/10.2307/1310825>
27. *Sabat P* (2000) Intestinal disaccharidases and aminopeptidase-N in two species of Cinclodes (Passerine: Furnariidae). *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 345–350. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2000000200009>
28. *Afik DL, Caviedes-Vidal E, Martínez del Río C, Karasov WH* (1995) Dietary modulation of intestinal hydrolytic enzymes in yellow-rumped warblers. *Am J Physiol* 269:

- 420–423.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.2.R413>
29. Kohl KD, Ciminari ME, Chedlack 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>
 30. Karasov WH (1996) Digestive plasticity in avian energetics and feeding ecology, 61–84. In C. Carey [Ed.], *Avian energetics and nutritional ecology*. Chapman and Hall, New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0425-8_3
 31. Hilton GM, Furness RW, Houston DC (2000 a) A comparative study of digestion in North Atlantic seabirds. *J Avian Biol* 31: 36–46.
 32. Hilton GM, Furness RW, Houston DC (2000 b) The effects of diet switching and mixing on digestion in seabirds. *Funct Ecol* 14:145–154.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00403.x>
 33. Martínez del Río C, Brugger E, Rios JL, Vergara ME, Witter M (1995) An experimental and comparative study of dietary modulation of intestinal enzymes in European Starlings (*Sturnus vulgaris*). *Physiol Biochem Zool* 68:490–511.
<https://doi.org/10.1086/physzool.68.3.30163781>
 34. McWilliams SR, Caviedes-Vidal E, Karasov WH (1999) Digestive adjustments in Cedar Waxwings to high feeding rate. *J Exp Zool* 283: 394–407.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990301/01\)283:4/5<394::AID-JEZ9>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990301/01)283:4/5<394::AID-JEZ9>3.0.CO;2-0)
 35. Sabat P, Gonzalez SP (2003) Digestive enzymes in two species of marine cinclodes (Passeriformes: Furnariidae). *The Condor* 105: 830–833.
<https://doi.org/10.1093/condor/105.4.830>
 36. Hume ID (1998) Optimization in design of the digestive system. In ER Weibel, CR Taylor, L Bolis [Eds]. *Principles of animal design*. Cambridge Univ Press, Cambridge UK. 212–219.
 37. Kuklina MM, Kuklin VV (2018) Effect of cestodal infestation on the distribution pattern of digestive enzyme activities along the small intestine of the kittiwake. *J Evol Biochem Physiol* 54: 257–263.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018040051>
 38. Izvekova GI, Kuklina MM, Frolova TV (2017) Inactivation of proteolytic enzymes by cestodes. *Dokl Biol Sci* 475: 161–164.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617040081>
 39. Frolova TV, Izvekov EI, Solovyev MM, Izvekova GI (2019) Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus lacticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). *Comp Biochem Physiol Part B* 235: 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009>
 40. Куклин ВВ, Куклина ММ (2005) Гельминты птиц Баренцева моря: фауна, экология, влияние на хозяев. Апатиты: Изд-во Кольского научного центра РАН. 289 с. [Kuklin VV, Kuklina MM (2005) Helminths of birds of the Barents Sea: fauna, ecology, impact on the hosts. Apatity: Publ. KSC RAS. 289 p. (In Russ)].
 41. Muzaffar SB (2009) Helminths of murre (Alcidae: *Uria* spp.): markers of ecological change in the marine environment. *J Wildlife Diseases* 45: 672–683.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.3.672>
 42. Kuklin VV (2017) Comprehensive and comparative analysis of the helminth fauna of the dominant colonial seabird species on the Murman coast. *Biol Bull* 44: 827–843.
<https://doi.org/10.1134/S1062359017080118>

Activity of Digestive Enzymes in the Small Intestine of Common Murres and Thick-Billed Murres: Effect of Diet Composition and Helminth's Infection

M. M. Kuklina^{a,*} and V. V. Kuklin^a

^a Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academia Science, Murmansk, Russia

*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru

It was found that the diet of common murres and thick-billed murres nesting on the Gavrilovsky Islands of the Barents Sea consisted of small fish (capelin, pollack and juvenile cod) and crustaceans during the breeding season in June 2018. Cestodes *Alcataenia allmillaris* were parasitized in the distal section of the small intestine of the common murres, and *A. armillaris* and *Tetrabothrius erostris* were parasitized in the distal section of the small intestine of the thick-billed murres. The total aminopeptidase N activity in the intestine of the common murres was higher than thick-billed murres, and the total maltase activity was higher in the intestine of the thick-billed murres than common murres. The activity of disaccharidases of both species murres decreased along small intestine in the distal direction, the activity of aminopeptidase N increased. At the site of infection of cestodes *A. armillaris* and *T. erostris*, the activity of both aminopeptidase N and maltase decreased in the distal section of the small intestine of thick-billed murres.

Keywords: Common murre, Thick-billed murre, *Uria aalge*, *Uria lomvia*, aminopeptidase N, maltase, sucrase, diet, cestodes

СИНХРОНИЗИРОВАННАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ОТДЕЛАХ МОЗГА И КАМЕРАХ СЕРДЦА *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

© 2022 г. Е. Э. Колесникова^{1,*}, И. В. Головина¹, А. А. Солдатов¹, Т. В. Гаврюсева¹

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

*e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 14.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

Проведено сравнение активности оксидоредуктаз энергетического метаболизма – малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) в отделах мозга – продолговатом мозге (ПМ) и переднем, промежуточном, среднем мозге (СППМ) и камерах сердца – предсердии и желудочке черноморской скорпены в условиях острой гипоксии (0.9–1.2 мг О₂ л⁻¹, 90 мин). В мозге и сердце активность МДГ была существенно выше ЛДГ ($p < 0.05$), что характерно для оксифильных тканей. Активность МДГ ПМ и предсердия оказалась выше таковой в СППМ и желудочке соответственно. При острой гипоксии отмечались специфические сдвиги энергетического метаболизма в структурах мозга и сердца в виде двух паттернов изменения активности оксидоредуктаз. При гипоксии в ПМ и предсердии активность МДГ существенно уменьшалась ($p < 0.05$). В СППМ и желудочке сердца отмечалась выраженная активация ЛДГ ($p < 0.05$). Предполагается, что сходство метаболических реакций ПМ и предсердия определяется функционированием встроенных в них механизмов генерации респираторного и сердечного ритма, связанных с регулируемым цАМФ (производным АТФ) HCN-каналами. При нормоксии интенсивные электрические осцилляции ПМ и предсердия требуют высоких энергозатрат, которые обеспечиваются за счет аэробного гликолиза; при гипоксии падение синтеза АТФ способствует инактивации HCN-каналов и переключению дыхательной и сердечной функции в выгодный для выживания скорпены режим супрессии. При кислородном голодании переход к анаэробному гликолизу в СППМ и желудочке сердца скорпены обеспечивает прежде всего сохранение их целостности.

Ключевые слова: рыбы, гипоксия, мозг, сердце, МДГ, ЛДГ

DOI: 10.31857/S0044452922060055

Состояние кислородной недостаточности или гипоксии (кислородного голодания) нередко возникает в результате воздействия на организм различных факторов и сопутствует многим заболеваниям человека [1], включая ишемические поражения сердца, головного мозга, формирование полиорганной недостаточности при ДВС–синдроме (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания) и другие [2]. Распространенность гипоксии при патологических состояниях вынуждает искать пути преодоления кислородной недостаточности путем изучения особенностей синтеза АТФ в различных органах и тканях при снижении PO₂.

В частности, одним из таких путей борьбы с гипоксией является поиск маркеров устойчивости к кислородному голоданию, что предполагает филогенетический подход к изучению адаптационных механизмов в систематических группах позвоночных с разным происхождением. Сравнительные филогенетические исследования при подходе *pars*

pro toto вносят значительный вклад в понимание функционирования отдельных органов [1]. В последнее время костистые рыбы представляют собой выдающуюся модель для биологических исследований, поскольку являются обитателями подверженных эпизодам выраженной гипоксии водных экосистем и обладают определенной степенью устойчивости к кислородному голоданию. Одно из наиболее разительных различий между животными, толерантными к гипоксии, и животными, не переносящими гипоксию, заключается в способности последних поддерживать энергетический статус мозга и сердца в условиях ограниченного запаса энергии. Устойчивые к гипоксии позвоночные животные становятся уникальным объектом исследования и источником информации о механизмах выживания при кислородном голодании; подобную информацию невозможно получить при моделировании гипоксических состояний различного генеза у млекопитающих, которые не обладают такой степенью приспособления к ги-

поксии/аноксии [3, 4]. Несмотря на очевидные фундаментальные различия между костистыми рыбами и человеком, существует высокий уровень генетической консервации базовых физиологических механизмов [5]. Следовательно, данные о механизмах, обеспечивающих устойчивость к дефициту кислорода в разных таксономических группах животных, могут оказаться чрезвычайно полезными при разработке новых методов лечения заболеваний, связанных с фактором гипоксии [1, 6].

Оксидоредуктазы – малатдегидрогеназа (MDH, L-малат: NAD-оксидоредуктаза, EC 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназа (LDH, L-лактат: NAD-оксидоредуктаза, EC 1.1.1.27) принимают непосредственное участие в производстве энергии, регулируют окислительно-восстановительный потенциал клеток и служат маркерами окислительной и гликолитической емкости энергетического обмена. Любое изменение гидрохимических характеристик водной среды обитания, в первую очередь PwO_2 , вызывает сдвиги между аэробными и анаэробными путями энергетических метаболических процессов, в которых участвуют оксидоредуктазы. Реакции гликолиза, которые обеспечивают оксидоредуктазы, являются неотъемлемой частью механизмов адаптации к гипоксии, а также составляют O_2 -зависимую ферментную систему энергетического метаболизма, используемую для проведения исследований [7].

Черноморский морской ерш (скорпена) – бентосный, использующий стратегию “sit-and-wait” хищник-засадчик, который характеризуется особой толерантностью к ряду стрессорных факторов, включая дефицит кислорода. Скорпена способна переживать гипоксию с нижней границей 0.35 мг O_2 /л в течение 4 ч [8] и условия аноксии в течение 20–30 мин [9]. Поскольку выживание рыб в водной среде с достаточно низким PwO_2 напрямую связано с поддержанием метаболической и функциональной активности жизненно важных органов – головного мозга и сердца, особый интерес представляет выяснение особенностей биохимической стратегии энергетического метаболизма мозга и сердца устойчивой к гипоксии скорпены. Испытывающие повышенную потребность в O_2 отдельные структуры мозга и сердца костистых рыб существенно различаются по происхождению, цитоархитектонике и специфике кровоснабжения (артериального или венозного), что может проявляться в их метаболической активности.

Ранее нами уже описывались особенности энергетических процессов мозга и сердца скорпены при гипоксии [10, 11]. Поскольку существует представление о подобии энергетического обмена тканей мозга и сердца костистых рыб [12, 13], то целью на-

стоящего исследования было сопоставление активности оксидоредуктаз в отделах мозга и сердца скорпены в условиях острой гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями комитета по этике Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (протокол № 28 от 15.02.2018).

Объектом исследования послужили взрослые особи морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 (Scorpaenidae) в летний период (16 экз., длина тела – 12–17 см, масса тела – 70–130 г). Рыбу отлавливали в июле–августе ставным неводом и доставляли в лабораторию в пластиковых баках (объем 60 л) с аэрацией. Для снятия стресса после транспортировки ершей содержали одну неделю в проточном аквариуме, в работе использовали только подвижных и активно питающихся особей.

Эксперименты проводили в специально разработанной камере при температуре воды $21 \pm 0.5^\circ C$ [7]. Рыб содержали при концентрации кислорода в воде 5.6–6.7 мг O_2 л⁻¹ (нормоксия). После адаптации к этим условиям (24 ч) концентрацию кислорода в воде снижали в течение 15–20 мин до 0.9–1.2 мг O_2 л⁻¹ путем прокачивания азота. Экспозиция особей к условиям гипоксии составляла 90 мин, содержание кислорода в воде контролировали с помощью оксиметра ELWRO PRL T N5221 (Польша).

По окончании эксперимента сразу после декапитации рыб выделяли образцы тканей мозга в виде продолговатого мозга (ПМ) и передних отделов – среднего, промежуточного, переднего мозга (СППМ) массой 0.030 ± 0.002 и 0.107 ± 0.011 г соответственно (рис. 1а). Сердце скорпены разделяли на предсердие (0.061 ± 0.012 г) и желудочек (0.143 ± 0.012 г) (рис. 1б). Препарирование тканей, гомогенизацию и центрифугирование проводили при охлаждении ($0 \pm 4^\circ C$). Полученные ткани до биохимических анализов хранили при температуре $-80^\circ C$ в морозильной камере (Farma 900 Series, Termo Scientific, США).

Активность ЛДГ и МДГ измеряли спектрофотометрически (СФ-2000 ОКБ “Спектр”, Россия) в кварцевой кювете с ходом луча 10 мм, объемом 3 мл при длине волны 340 нм по скорости окисления восстановленной формы кофермента НАДН, используя в качестве среды выделения 0.2 М Трис-HCl буфер, pH 7.5 [14]. Реакцию начинали внесением экстракта и снимали отсчеты через 30 с в течение 2–3 мин. Субстратом для определения активности ЛДГ служил пируват, для МДГ – оксалоацетат. Активность МДГ и ЛДГ определяли при температуре инкубации реакционной смеси $25^\circ C$. Удельную активность ферментов выражали в

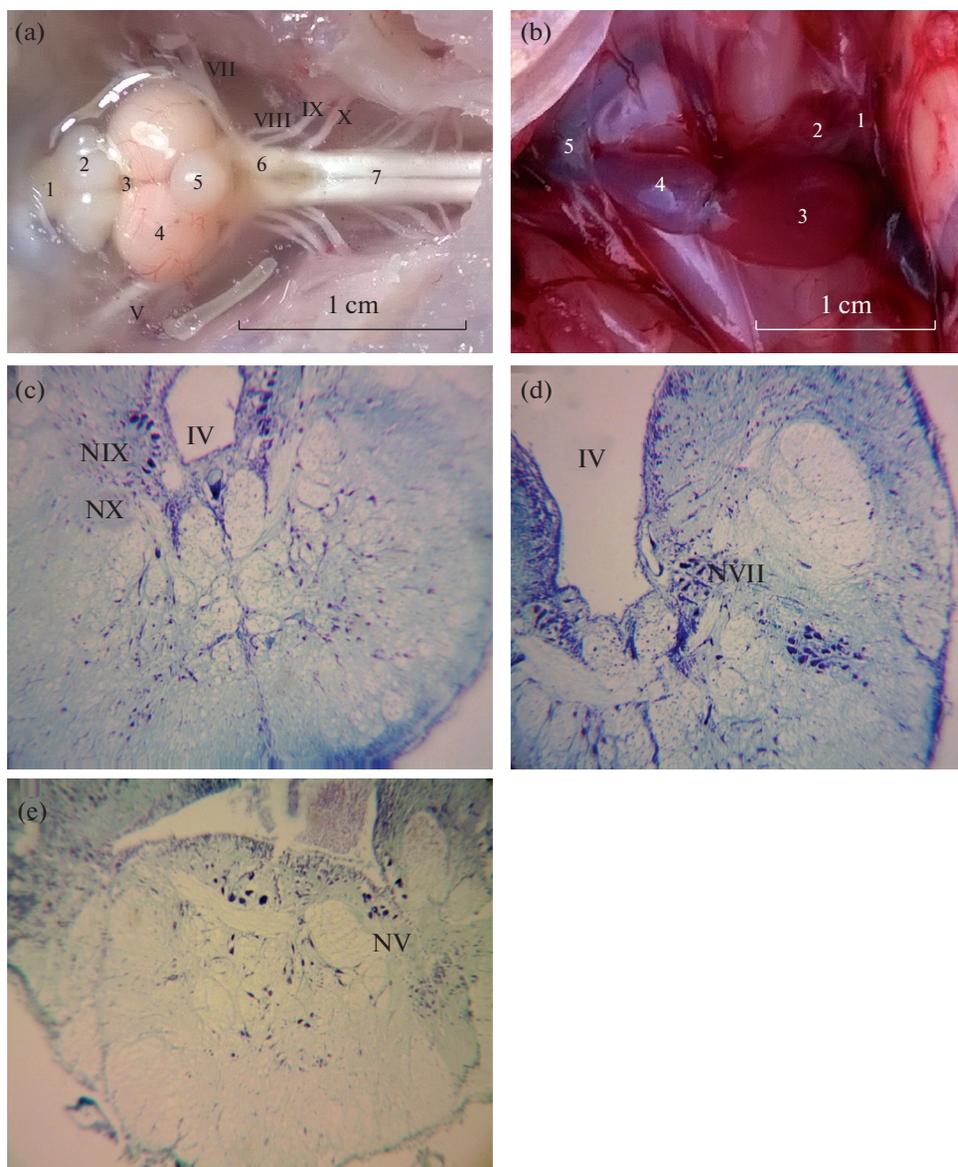


Рис. 1. Мозг и сердце *Scorpaena porcus*. а – общий вид мозга (дорсальная поверхность): 1 – обонятельная луковица, 2 – передний мозг, 3 – промежуточный мозг, 4 – средний мозг, 5 – мозжечок, 6 – продолговатый мозг, 7 – спинной мозг. Черепно-мозговые нервы: V – тройничный нерв, VII – лицевой нерв, VIII – слуховой нерв, IX – языкоглоточный нерв, X – блуждающий нерв. б – общий вид сердца: 1 – венозный синус, 2 – предсердие; 3 – желудочек; 4 – луковица аорты, 5 – брюшная аорта. с, d, e – ядра черепно-мозговых нервов продолговатого мозга скорпены (окраска по Ниссля): NIX – языкоглоточного (IX) нерва, NX – блуждающего (X) нерва, NVII – лицевого (VII) нерва, NV – тройничного (V) нерва. IV – четвертый желудочек мозга.

мкмольх НАДН мин⁻¹ мг⁻¹ белка супернатанта. Содержание белка определяли микробиуретовым методом, экстинкцию измеряли при длине волны 330 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали препарат кристаллического сывороточного альбумина. Результаты представлены как $M \pm t$, достоверность различий средних оценивали по *t*-критерию Стьюдента, различия считали значимыми при $p < 0.05$. Статистическую обработку и графическое оформление полученной информации проводили

при помощи стандартного программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нормоксия. Максимальная активность МДГ была зафиксирована в ПМ, что было на 39% выше ее активности в СППМ, однако различия не были статистически достоверны (рис. 2). Активность ЛДГ в отделах мозга была практически одинакова (2.3 vs 2.8 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка) и ниже

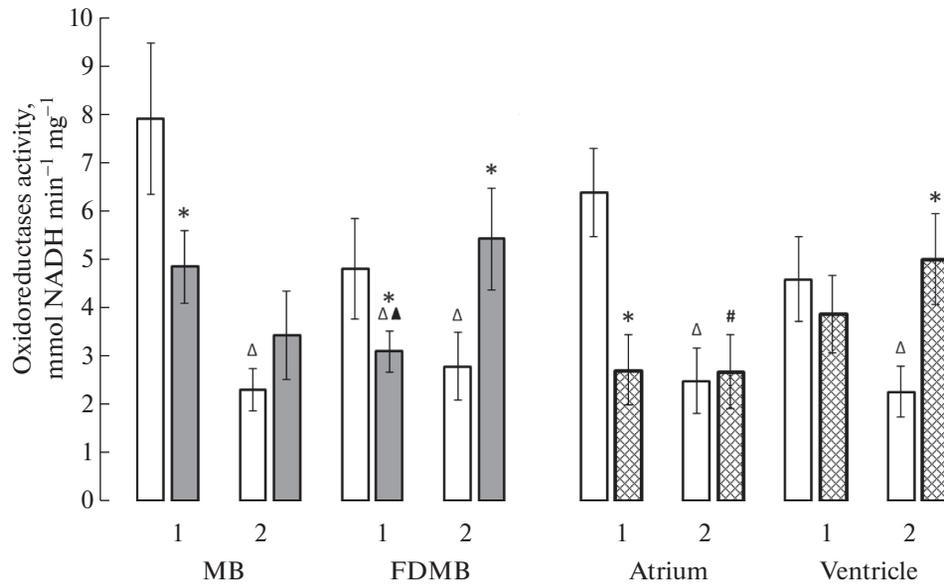


Рис. 2. Активность оксидоредуктаз в отделах мозга и камерах сердца *Scorpaena porcus*. Светлые столбики – нормоксия, темные столбики – гипоксия; 1 – активность МДГ; 2 – активность ЛДГ; MB – продолговатый мозг; FDMB – передние отделы мозга (передний, промежуточный, средний мозг; Atrium – предсердие; Ventricle – желудочек. Различия достоверны, $p < 0.05$: * нормоксия vs. гипоксия; Δ – активность МДГ vs. активность ЛДГ; ▲ – MB vs. FDMB; # – предсердие vs. желудочек.

по сравнению с МДГ в 3.5 раза в ПМ ($p < 0.05$) и в 1.7 раза – в СППМ ($p > 0.05$). Отмечалась тенденция к большей величине индекса МДГ/ЛДГ в ПМ (рис. 3).

В предсердии скорпены зарегистрирована самая высокая активность МДГ, что на 28% выше, чем в желудочке сердца. Вместе с тем найденные различия не имели статистической значимости (рис. 2). Существенных различий между отделами миокарда по активности ЛДГ (2.5 vs 2.3 мкмоль

НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка) и величине индекса МДГ/ЛДГ (2.57 vs 2.03) не выявлено (рис. 3).

Гипоксия. Активность МДГ в ПМ снизилась в 1.6 раза ($p < 0.05$), в СППМ – в 1.5 раза (рис. 2). Одновременно активность ЛДГ имела некоторую тенденцию к увеличению в ПМ и вдвое возросла в СППМ ($p < 0.05$). Индекс МДГ/ЛДГ уменьшился в 1.8–1.4 раза относительно нормоксических показателей в ПМ ($p < 0.05$) и СППМ соответственно (рис. 3).

Острая гипоксия вызвала снижение активности МДГ в предсердии в 2.4 раза ($p < 0.05$), активность ЛДГ сохранилась на прежнем уровне, в результате индекс МДГ/ЛДГ уменьшился в 2.5 раза ($p < 0.05$) (рис. 3).

Напротив, в желудочке сердца активность МДГ незначительно снизилась, в то время как активность ЛДГ достоверно увеличилась в 2.2 раза ($p < 0.05$) (рис. 2). Таким образом, активность ЛДГ в желудочке вдвое превысила таковую в предсердии ($p < 0.05$). Величина индекса МДГ/ЛДГ в желудочке уменьшилась в 2.6 раза ($p < 0.05$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как упоминалось выше, ткани мозга и сердца рыб имеют сходный энергетический потенциал, позволяющий синхронизировать интенсивность их аэробного и анаэробного метаболизма [12, 13]. Безусловно, уровень активности оксидоредуктаз мозга и сердца скорпены в целом определялся рам-

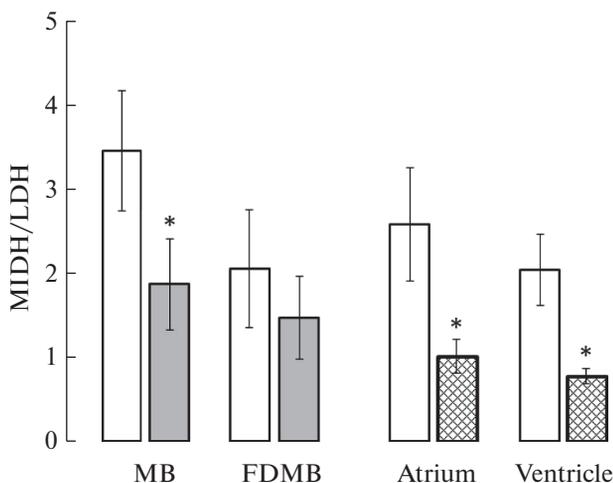


Рис. 3. Индекс МДГ/ЛДГ в отделах мозга и камерах сердца *Scorpaena porcus*. Обозначения как на рис. 2.

ками парадигмы синхронизации метаболизма двух жизненно важных органов. Вместе с тем оказалось, что разные компартменты этих органов отличались своеобразными чертами производства энергии.

Как известно, мозг костистых рыб состоит из последовательно расположенных структур, типичных для большинства позвоночных [15, 16] – переднего, промежуточного, среднего (СППМ), заднего (включает мозжечок; в отличие от птиц и млекопитающих у костистых рыб нет моста) и продолговатого мозга (ПМ). ПМ обеспечивает базовые кардиореспираторные рефлексы (моторные ядра VII, IX, X ЧМН, рис. 1b, c, e). Составляющие СППМ структуры включают центры обоняния, зрения, слуха и осуществляют интегрирование и регуляцию функций организма, обеспечивают обучение, координируют сложные движения.

Организация ЦНС описывается эволюционной, сегментарной, онтогенетической, эмбриологической, геномной моделями [17], которые подразумевают определенную гетерогенность мозга. Как известно, морфогенез мозга осуществляется согласно обширной генетической программе, включающей подпрограмму регионализации мозга [18]. В эмбриональном периоде в зачатке ЦНС – нервной трубке – у хордовых [19], включая костистых рыб [20], отмечается дополнительно поперечно-сегментированная организация. При такой форме организации вся нервная трубка делится продольно и поперечно на множество более мелких доменов, в которых большое количество регулирующих развитие мозга генов, включая многие гомеобоксены (*HOX* гены), ограниченно экспрессируются по региональному шаблону [20]. Такая архитектура мозга с элементами региональной организации по целому ряду признаков позволяет считать этот орган сложным гетерогенным образованием, что может проявляться в особенностях энергетического метаболизма функциональных локусов и структур.

Все изученные нами структуры мозга скорпены в целом характеризовались достаточно близким уровнем активности МДГ, которая была существенно выше активности ЛДГ, что согласуется с полученными ранее результатами [10, 11]. Преобладание активности МДГ над ЛДГ является характерной чертой оксифильных тканей [21]. Вместе с тем повышенная активность МДГ в ПМ по сравнению с СППМ может указывать на степень интенсивности его энергетического метаболизма. ПМ содержит элементы механизма генерации респираторного ритма (*respiratory rhythm generator*, RRG). RRG состоит из двух взаимодействующих осцилляторов – полоски нейронов, представленной моторными ядрами лицевого (VII), языкоглоточного (IX) и блуждающего (X) ЧМН [22], и паратригеминальной респираторной группой (pTRG), связанной с ядром тройничного (V) ЧМН [23, 24]. RRG формирует эфферентные респираторные команды

к мышцам черепа, челюстей, жаберных дуг, сокращение которых обеспечивает всасывание и проталкивание воды через буккальную полость и жаберный аппарат рыб. Кажется очевидным, что интенсивные осцилляции нейронов RRG могут нуждаться в более существенных энергозатратах по сравнению со структурами СППМ.

Следует отметить, что все изучаемые образцы мозга скорпены характеризовались практически одинаковым уровнем активности ЛДГ. Причем активность ЛДГ тканей мозга по своей величине была близка к активности ЛДГ белых мышц скорпены [25], энергообеспечение сокращений которых осуществляется за счет образуемой преимущественно анаэробным путем АТФ [26]. Аналогичное сходство свойств изоформ ЛДГ мозга и мышц с высоким сродством к пировуату было найдено у устойчивой к дефициту кислорода цихласомы *Cichlasoma amazonarum*, что позволяет ей выживать в условиях среды с хронической гипоксией [27], обеспечивая различные паттерны “оборонительной стратегии” тканей мозга.

Величина активности ЛДГ в структурах мозга скорпены свидетельствует об адаптированности к условиям ограниченного доступа к кислороду (так называемая “анаэробизация” [11]) путей энергетического метаболизма и отражает определенный потенциал адаптационных механизмов, направленный на немедленную компенсацию дефицита энергии даже при незначительном изменении PwO_2 . Признаки подобного приспособления мозга скорпены могут быть напрямую связаны с исходно ограниченным кровоснабжением мозга костистых рыб (менее 1% общего кровотока) [28]. Данный факт более чем скромного кровоснабжения также может сближать энергетический метаболизм мозга рыб с белыми мышцами, обладающими низкой плотностью капиллярной сети и, как следствие, значительными диффузионными расстояниями [25, 29], что заставляет их создавать запасы гликогена [30]. Высокие концентрации гликогена в глиальных клетках в качестве ближайшего источника глюкозы считают характерной чертой зачастую испытывающих периоды гипогликемии либо ишемии видов [31]. В частности, наличие депонированного гликогена позволяют мозгу карася увеличить свою устойчивость к дефициту кислорода приблизительно в 150 раз [32]. Таким образом, “анаэробизация” мозга костистых рыб, включая скорпену, по сравнению с высшими позвоночными является приспособительным механизмом оксифильного мозга в водной среде с ограниченной доступностью кислорода. Вместе с тем, по-видимому, отдельные компартменты мозга скорпены могут характеризоваться разной степенью “оксифильности” и уязвимости к кислородному голоданию, которая определяется целым набором факторов.

Несмотря на характерную для малоподвижных придонных видов рыб “аваскулированную/венозную” разновидность сердца, не предполагающую артериального коронарного кровоснабжения [33], сердце скорпены обладает сходными с мозгом значениями активности оксидоредуктаз в виде более высокой активности МДГ vs. ЛДГ [10]. Одновременно при общем подобии энергетического метаболизма мозга и сердца, камеры последнего – предсердие и желудочек – также имели свои отличительные черты.

Сердце позвоночных является эволюционно “старым” органом [30, 34]. Как известно, оно представляет собой сильно модифицированный мышечный сосуд, состоящий из многочисленных клеточных линий [34, 35]. В процессе эмбриогенеза “сигнальные” молекулы ретиноевой кислоты устанавливают предсердную “идентичность” заднего конца сердечной трубки [36], тем самым передавая информацию о позиционировании трубки по переднезадней оси к генам, вызывающим специфическое развитие данной камеры. Развитие и формирование сердца как органа регулируется основным набором эволюционно консервативных факторов транскрипции (NK2, MEF2, GATA, Tbx, Hand), которые контролируют “судьбу” клеток сердца, экспрессию кодирующих сократительные белки генов и морфогенез сердечных структур [35]. Эволюция сердца обуславливает его неоднородность [37], которая проявляется электрической и механической гетерогенностью, нарастающей по мере усложнения конструкции сердца и предусматривающей многообразие механизмов реагирования на различные стимулы.

Так же как в мозге особенностью камер сердца скорпены оказалась различная интенсивность активности МДГ при одинаковой активности ЛДГ [10]. С одной стороны, несмотря на ведущую функциональную роль желудочка активность МДГ в нем была заметно ниже таковой в предсердии. Такого рода тренд активности МДГ желудочка, по-видимому, с одной стороны, может быть обусловлен его специфической цитоархитектоникой и связанным с ней исключительно венозным кровоснабжением. У костистых рыб предсердие отличается относительно тонкой трабекулированной стенкой по сравнению с толстой стенкой желудочка, включающей большое количество межтрабекулярных пространств (трабекулярных полостей, лакун) [38]. Подобная сложная организация миокарда позволяет каждой отдельной лакуне функционировать по принципу “много маленьких сердец” в границах “большого” желудочка [39], что предполагает высокую вариабельность P_vO_2 либо наличие отрицательного градиента P_vO_2 по мере удаления от основного просвета камеры до конечных участков лакун при замедлении кровотока. Диверсии P_vO_2 могут оказать влияние на “предпочте-

ние” активности отдельных оксидоредуктаз в подержании эффективного энергетического метаболизма отделов сердца. В случае скорпены снижение значимости МДГ, по-видимому, обусловлено ограниченной доступностью кислорода в венозной крови, перфузирующей сложный лакунарный рельеф внутренней поверхности желудочка. С другой стороны, более высокая аэробная активность предсердия может определяться наличием в его стенках структур проводящей системы, которые обеспечивают автоматию сердца – синоатриального узла (*sinoatrial node*, SA-узла) и клеточпейсмекеров атриовентрикулярной области [40]; функционирование водителей ритма проводящей системы также сопровождается интенсивными электрическими осцилляциями.

В сердце костистых рыб отмечаются дополнительные адаптационные механизмы. Оксифильное *per se* сердце костистых рыб обладает высокими запасами гликогена, занимая второе место по объему его накоплений после печени и превышая данный показатель для тканей мозга [41], что обеспечивает резерв адаптации миокарда к анаэробным условиям подобно мозгу. Один из самых высоких резервов гликогена в миокарде был найден у европейского керчака *Myoxocephalus scorpius* (Scorpaenidae) [41], что может быть косвенно связано с кровоснабжением миокарда исключительно венозной кровью. Было установлено, что благодаря таким запасам гликогена сердце устойчивого к гипоксии карася *Carassius carassius* при относительно высокой активности ЛДГ способно эффективно поддерживать необходимый уровень анаэробного метаболизма даже в близких к аноксии условиях, используя огромные запасы гликогена [4].

При бесспорном различии в эмбриональном происхождении и характере кровоснабжения (артериальное vs. венозное) активность оксидоредуктаз тканей мозга и сердца скорпены обладает несомненным сходством. Опираясь на показатели активности МДГ и ЛДГ, нами были выделены своего рода метаболические “пары” в виде ПМ – предсердия и передних отделов мозга (СППМ) – желудочка. Последняя пара образований характеризовалась более низкой интенсивностью аэробного метаболизма. Несмотря на имеющееся сходство энергетического метаболизма обоих оксифильных, достаточно высоко адаптированных к кислородному голоданию органов в целом, существует заметное неравенство интенсивности аэробного метаболизма (активности МДГ) относительно функциональных компартментов внутри самих органов, которое связано с электрическими процессами.

Как известно, снижение PO_2 сопровождается падением синтеза АТФ. Толерантные к гипоксии позвоночные животные используют одновременно две разные стратегии защиты от потери запасов АТФ в виде увеличения гликолитического потока

(эффект Пастера) и снижения скорости потребления АТФ (метаболическая депрессия). Первоначальный этап энергетической адаптации к гипоксии проявляется в способности значительно увеличить скорость выработки “гликолитического” АТФ [3, 43]. У рыб воздействие гипоксии обычно вызывает активацию уровня субстратного фосфорилирования посредством гликолиза, сопровождаемого ростом активности ЛДГ и снижением аэробного метаболизма [44, 45].

Нами было установлено, что экспозиция к гипоксии сопровождалась специфическими сдвигами энергетического метаболизма в отдельных структурах мозга и сердца скорпены, отражавшимися двумя наиболее яркими паттернами “поведения” оксидоредуктаз – существенным падением активности МДГ при слабом изменении активности ЛДГ (в ПМ и предсердии) и повышением активности ЛДГ при уменьшении активности МДГ (в СППМ и желудочке сердца).

Схожий уровень активности оксидоредуктаз ПМ и предсердия при снижении PwO_2 – падение активности МДГ при статистически незначимой величине изменения активности ЛДГ может предполагать подавление метаболизма и функциональной активности этих образований. Известно, что сокращения сердца и дыхательная активность рыб связаны тесными временными взаимоотношениями в виде кардиореспираторного сопряжения (*cardiorespiratory coupling*, CRC) и синхронизации (*cardiorespiratory synchronization*, CRS), достигая соотношения 1: 1 [46, 47]. CRC и CRS определяются спецификой перфузии и движения потока воды через жаберный аппарат. CRC и CRS находятся под контролем парасимпатической нервной системы (волокна блуждающего нерва). Установлено, что в условиях гипоксии сердце рыб заметно снижает частоту своих сокращений [48]. Брадикардия считается приспособительным механизмом, поддерживающим оптимальное перфузионно-вентиляционное соотношение жаберного аппарата [49]. Брадикардия и снижение сократимости миокарда предсердия костистых рыб являются результатом тормозного влияния блуждающего нерва, реализуемого через мускариновые холинергические рецепторы [48]. Одновременно, учитывая степень сопряжения частоты сердечных сокращений и дыхания у костистых рыб [46, 47], следствием CRS при гипоксии может быть одновременное замедление дыхания (сокращения количества дыхательных экскурсий жабр). По-видимому, при кислородном голодании ПМ и предсердие одновременно становятся локусом метаболической и функциональной супрессии, что служит обеспечению нового, “гипоксического” режима кардиореспираторной рефлекторной деятельности.

Функциональное состояние мозга при гипоксии определяется рядом механизмов. Большая

часть энергетического “бюджета” мозга приходится на достаточно затратное поддержание или восстановление трансмембранных ионных градиентов. В условиях ограниченной доступности кислорода экономизация АТФ в мозге рыб может достигаться за счет снижения проницаемости плазматических мембран для отдельных ионов в виде “ареста каналов” (*ion channel arrest*), что уменьшает потребность в АТФ и ведет к существенному энергосбережению [50]. Предполагается, что в возбудимых тканях мозга “арест каналов” приводит к “аресту спайковой активности” (*spike arrest*) [51], что является эффективным средством снижения частоты генерации потенциалов действия и приводит к существенному снижению количества расходуемой АТФ [52].

Так же как в мозге, ионные градиенты, которые создаются ионными токами через Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -каналы, необходимы для поддержания потенциала покоя и потенциала действия кардиомиоцитов [53]. Вместе с тем в отличие от характерного для тканей мозга “ареста ионных каналов” [50] при гипоксической брадикардии в кардиомиоцитах срабатывает механизм “ареста потенциала действия” [53]. Упомянутый механизм предполагает достижение баланса между производством и потреблением энергии за счет не затрагивающего количество или кинетику ионных каналов уменьшения частоты потенциалов действия, что позволяет сердцу существенно экономить энергию в условиях кислородного голодания [53].

Общим моментом электрофизиологических особенностей мозга и сердца (рис. 4) является экспрессия управляемых циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемых каналов (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*; HCN-каналы), принадлежащих к суперсемейству потенциал-зависимых калиевых каналов (K_v) [54]. Функцией данных каналов является обеспечение смешанных ионных Na^+/K^+ токов (“*a funny current*”, I_f). HCN-каналы медленно активируются при гиперполяризации клеточной мембраны при потенциалах, более отрицательных, чем -50 мВ, в то время как ионные токи в клетках сердца обычно активируются деполяризацией, а не гиперполяризацией. Результирующий ток через HCN-каналы имеет входящее направление и натриевую природу, одновременно ионы K^+ при таких значениях потенциала будут выходить из клетки.

HCN4-каналы играют важную роль в синаптической передаче и интеграции мозга [54, 55]. Генерация дыхательного ритма является результатом взаимодействия возбуждающей глутаматергической передачи и спайковой активности подмножества респираторных нейронов [56]. HCN-каналы являются составной частью механизма генерации респираторного ритма. В частности, у эмбрионов

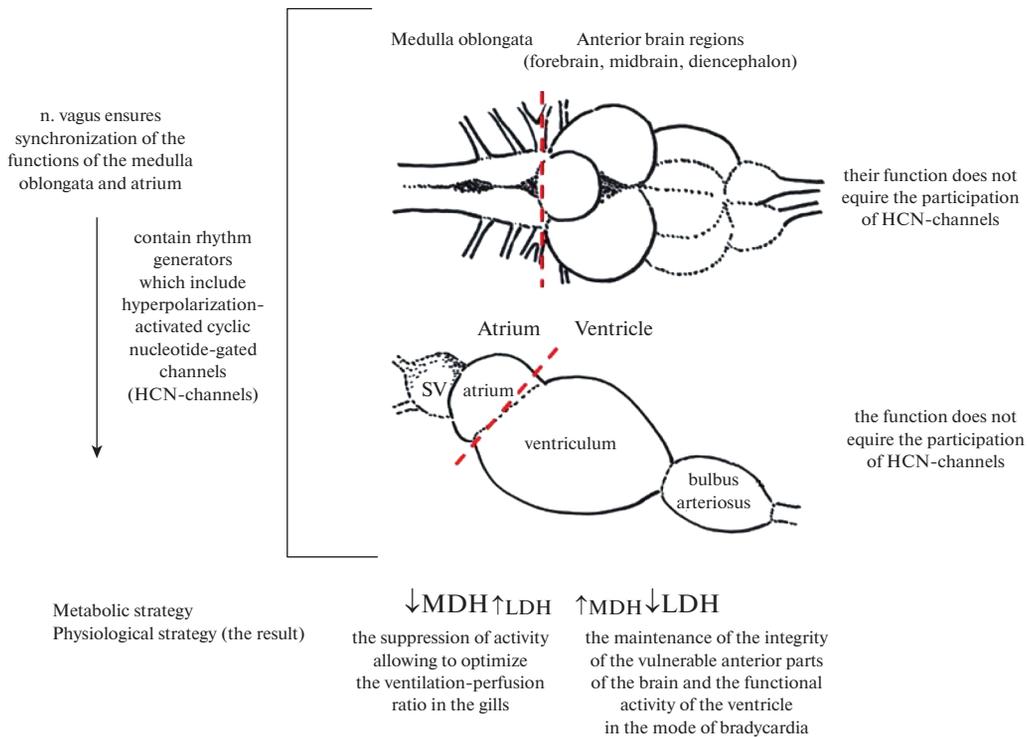


Рис. 4. Схема соотношения активности оксидоредуктаз отделов мозга и сердца *Scorpæna porcus* при гипоксии. Продолговатый мозг содержит моторные ядра VII, IX, X ЧМН, которые являются частью генератора респираторного ритма. Стенки предсердия также оснащены локусами, генерирующими сердечный ритм (клетки-пейсмейкеры синоатриального и атриовентрикулярного узлов). Предполагается, что основное звено генерации ритма обеих структур – ионные HCN-каналы, проницаемость которых регулируется цАМФ, синтезируемой из АТФ. При гипоксии продукция цАМФ снижается; открытие HCN-каналов минимально, что уменьшает плотность I_f -токов. Механизмам подавления электрических процессов внутри генераторов ритма продолговатого мозга и предсердия “выгодно” падение активности МДГ при несущественном повышении активности ЛДГ; низкая производительность оксидоредуктаз (метаболическая депрессия) снижает энергетический потенциал тканей. Следствием метаболической депрессии и функциональной супрессии продолговатого мозга и предсердия является оптимизация вентиляционно-перфузионного соотношения жаберного аппарата, обеспечиваемая согласованностью брадикардии и брадипноза. Блуждающий нерв контролирует кардио-респираторное взаимодействие и синхронизацию как при нормоксии, так и при гипоксии. Подавление аэробного метаболизма и выраженная активация гликолиза в чувствительных к кислородному голоданию передних отделах мозга и остро нуждающемся в АТФ миокарде желудочка сердца обеспечивает “выживание” нейронов и функционирование миокарда при краткосрочной гипоксии.

мышей была выявлена экспрессия мРНК субъединиц HCN-каналов в нейронах комплекса пре-Бетцингера (preBötC), формирующих ядро генерации инспираторного ритма RRG [56]. Предшественником preBötC высших позвоночных у рыб служит паравагальный регион ПМ, содержащий моторные ядра IX-X ЧМН [23].

Помимо мозга HCN-каналы экспрессируются в участках миокарда, связанных с генерацией сердечного ритма и обеспечивающих вегетативную регуляцию работы сердца [54]. В SA-узле *D. rerio* преобладают HCN4-каналы [39, 40]. HCN4-каналы представляют собой резервный механизм, который имеет особое значение для стимуляции и стабилизации функции водителя ритма сердца при снижении частоты сердечных сокращений; вместе с тем HCN4-каналы не требуются для ускорения частоты сердечных сокращений [57]. Проводимость HCN-каналов модулируется прямым взаи-

модействием с циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ), продуцируемым в сарколемме клеток SA-узла из АТФ Ca^{2+} -активируемой и Ca^{2+} -ингибируемой аденилатциклазами (ACs). цАМФ может влиять на частоту сердечных сокращений путем прямого связывания с HCN-каналами. Присоединение цАМФ к HCN-каналам приводит к их открытию, сопровождающемуся увеличением частоты сердечных сокращений. Симпатические и парасимпатические ветви вегетативной нервной системы могут контролировать сердечный ритм также путем активации или ингибирования ACs [58, 59].

Существует вероятность того, что при острой гипоксии именно HCN-каналы (в частности, подвид HCN4), тесно связанные с энергетическим метаболизмом, обеспечивают функциональную супрессию/подавление электрической активности ПМ и предсердия. При ведущей роли HCN-кана-

лов в настройке дыхательной и сердечной функции относительно PO_2 работа самого механизма ритмогенеза при краткосрочной адаптации к гипоксии “не требует” активной продукции макроэргов за счет аэробного (снижение активности МДГ), так и анаэробного (слабое изменение активности ЛДГ) метаболизма. В то же время при снижении PO_2 происходит дополнительное, “уточняющее” ограничение сердечной функции в виде брадикардии, достигаемой через аппарат мускариновых рецепторов синоатриальных пейсмекерных клеток [60]. Можно предположить, что в условиях гипоксии блуждающий нерв продолжает неукоснительно обеспечивать классическую синхронизацию/согласование сердечного и дыхательного ритмов, обеспечивая брадипноэ.

Толерантность к гипоксии для мозга позвоночных часто включает химические модуляторы/медиаторы, которые блокируют активность нейронов для сохранения энергии. ГАМК (γ -аминомасляная кислота) является известным медиатором метаболической депрессии при гипоксии/аноксии. При ограничении кислорода уровень ГАМК заметно повышается в мозге устойчивых позвоночных [61]. Пресинаптические HCN-каналы способны модулировать и ограничивать ГАМКергическую синаптическую передачу [62]; существует вероятность того, что при гипоксии инактивация HCN-каналов становится одним из механизмов высвобождения ГАМК, обеспечивающей состояние метаболической депрессии нейронов [63, 64]. Отсутствие макроэргов (энергетическая недостаточность) – вернее, чем ингибирующая модуляция – угнетает респираторную сеть при гипоксии и подчеркивает необходимость учета метаболических ограничений в подавлении активности как адаптационный механизм, способствующий сохранению энергии [63].

Вместе с тем при острой гипоксии в СППМ скорпены отмечают наиболее яркие по сравнению с ПМ проявления перехода энергетического метаболизма к анаэробному гликолизу, составляющему безусловный резерв мозга в условиях дефицита кислорода. Ранее было показано [65], что воздействие аноксии сопровождается двух-трехкратным увеличением интенсивности гликолиза в мозге по сравнению с печенью (т.е. мозг проявлял эффект Пастера) у чувствительной к аноксии радужной форели *Salmo gairdneri* и устойчивого канального сомика *Ictalurus nebulosus*. Одновременно, демонстрировавшие более выраженный эффект Пастера ткани мозга *Ictalurus nebulosus* содержали примерно в пять раз больше гликогена, чем мозг *Salmo gairdneri*, что указывает на его несколько больший анаэробный резерв и гораздо большую анаэробную емкость по сравнению с анохия-чувствительной форелью [65]. В случае скорпены косвенные признаки указывают на наличие опреде-

ленного анаэробного резерва и соответствующей емкости наиболее чувствительных к кислородному голоданию передних отделов мозга СППМ, определение истинной величины которых требует дальнейшего изучения.

Предполагается [50], что мозг устойчивых к гипоксии/аноксии видов может иметь либо более низкую плотность ионных каналов на единицу площади мембраны, либо проницаемость ионных каналов меняется с началом кислородного голодания, что приводит к снижению потребности в АТФ для ионных насосов. Другим дополнением к “блокировке/остановке каналов” может быть экспрессия форм ионных каналов с более низкой проводимостью [52]. Так или иначе, природа нейронных взаимодействий и биохимических сигнальных механизмов, которые организуют скоординированное снижение метаболизма мозга, остается до настоящего времени неясной.

В то же время желудочек скорпены, которому при гипоксии необходимо поддерживать свою нагнетающую функцию, достаточно интенсивно осуществлял производство макроэргов путем гликолиза, на что указывает подъем активности ЛДГ при менее выраженном снижении активности МДГ. В условиях резкого ограничения доступности кислорода анаэробный гликолиз становится основным источником продукции АТФ кардиомиоцитов. Так, в частности, такое воздействие гипоксии в виде повышения активности ЛДГ было зафиксировано в миокарде *Clarias batrachus* [45], астронотуса *Astronotus crassipinnis* и дискуса *Symphysodon aequifasciatus* [66].

Предполагают, что в направленности и “объеме” метаболической реакции миокарда на воздействие гипоксии существенное значение отводится экспрессии изоформ ЛДГ [66]. Показано, что преобладание ЛДГ мышечного типа в сердце *A. crassipinnis* было сопряжено с активацией анаэробного гликолиза на фоне накопления пирувата, возникающего при снижении окислительного метаболизма. Фактически, в условиях кислородного голодания в миокарде наблюдается увеличение активности ЛДГ одновременно со снижением активности цитратсинтазы, лимитирующей первый этап цикла Кребса, которая катализирует реакцию конденсации ацетата (ацетил-CoA) и оксалоацетата. Таким образом, в сердце таких животных происходит подавление окислительного метаболизма с последующей активацией анаэробного гликолиза, что обычно наблюдается у так называемых “хороших анаэробов”, таких, как водные черепахи и некоторые виды рыб [67].

Согласно результатам нашего исследования, отдельные структуры мозга и сердца скорпены различаются интенсивностью, направленностью и “предпочтением” путей энергетического метаболизма. Компартменты мозга и сердца, содержащие

осцилляторы и задающие частоту сердечного и респираторного ритма – предсердие и продолговатый мозг, – по-видимому, в большей степени нуждаются в интенсивном производстве АТФ. При гипоксии реализуются две стратегии преобразования энергетического метаболизма, которые сосуществуют в пределах одного органа, но в его разных отделах. Очевидно, в условиях кислородного голодания выбор определенной метаболической стратегии детерминирован потребностями встроенных механизмов, связанных со спецификой функционирования конкретной структуры. Сходство метаболических реакций на гипоксию продолговатого мозга и предсердия может базироваться на механизмах, связанных с HCN-каналами, регулируемые цАМФ как производным АТФ. При снижении PO_2 на фоне уменьшения продукции и потребления АТФ (метаболическая депрессия) инактивация HCN-каналов переводит дыхательную и сердечную функции в выгодный для выживания скорпены режим супрессии. В свою очередь, интенсивный анаэробный гликолиз обеспечивает функционирование желудка и передних отделов мозга в ограниченном режиме. Обращает на себя внимание тот факт, что установленное нами соответствие энергетического обмена компарментов мозга и сердца скорпены при нормоксии и гипоксии осуществляется на фоне многократной разницы в уровне содержания кислорода в артериальной и венозной крови, перфузирующей эти жизненно важные органы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ФИЦ Института биологии южных морей “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (номер гос. регистрации 121041400077-1) и “Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана” (номер гос. регистрации 121030100028-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента – Е.Е.К., И.В.Г., А.А.С.; сбор данных – Е.Е.К., И.В.Г., Т.В.Г.; обработка данных – Е.Е.К., И.В.Г., Т.В.Г.; написание и редактирование манускрипта – Е.Е.К., И.В.Г., А.А.С., Т.В.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ostadal B* (2014) Hypoxia and the heart of poikilotherms. *Curr Res Cardiol* 1:28–32.
2. *Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN* (2006) Modern conceptions of hypoxia pathogenesis. Hypoxia classification and the starters of its development. *Modern Science-Intensive Technol* 5 :23–27.
3. *Lutz PL, Nilsson GE, Pérez-Pinzón MA* (1996) Anoxia tolerant animals from a neurobiological perspective. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113:3–13. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02046-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02046-2)
4. *Nilsson GE, Lutz PL* Anoxia tolerant brains (2004) *J Cereb Blood Flow Metab* 24:475–486. <https://doi.org/10.1097/00004647-200405000-00001>
5. *Grimes AC, Kirby ML* (2009) The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *J Fish Biol* 74: 983–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>
6. *Milton SL, Dawson-Scully K* (2013) Alleviating brain stress: what alternative animal models have revealed about therapeutic targets for hypoxia and anoxia. *Future Neurol* 8: 287–301. <https://doi.org/10.2217/fnl.13.12>
7. *Somero GN* (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *J Exp Biol* 213: 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
8. *Soldatov AA, Andreenko TI, Kukhareva TA, Andreeva AY, Kladchenko ES* (2021) Catalase and Superoxide Dismutase Activity in Erythrocytes and the Methemoglobin Level in Blood of the Black Scorpionfish (*Scorpaena porcus*, Linnaeus 1758) Exposed to Acute Hypoxia. *Russ J Marine Biol* 47: 283–289. <https://doi.org/10.1134/S106307402104012X>
9. *Lushchak VI, Bahnjukova TV, Storey KB* (1998) Effect of hypoxia on the activity and binding of glycolytic and associated enzymes in sea scorpion tissues. *Braz J Med Biol Res* 31: 1059–1067. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998000800005>
10. *Kolesnikova EE, Soldatov AA, Golovina IV, Sysoeva IV, Sysoev AA, Kukhareva TA* (2021) Activity of Energy Metabolism Enzymes and the Adenylate System in Heart Chambers of a Black Sea Scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) under Acute Hypoxia. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1050–1059. <https://doi.org/10.1134/S0022093021050070>
11. *Kolesnikova EE, Soldatov AA, Golovina IV, Sysoeva IV, Sysoev AA* (2022) Effect of acute hypoxia on the brain energy metabolism of the scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758: the pattern of oxidoreductases activity and adenylate system. *Fish Physiol Biochem* 48: 1105–1115. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01103-2>
12. *Childress JJ, Somero GN* (1979) Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biol* 52: 273–283.
13. *Nilsson GE, Östlund-Nilsson S* (2008) Does size matter for hypoxia tolerance in fish? *Biol Rev Camb Philos Soc*

- 83: 173–189.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00038.x>
14. Мильман ЛС, Юровецкий ЮГ, Ермолаева ЛП (1974) Определение активности важнейших ферментов углеводного обмена. В кн.: Методы биологии развития. М. Наука. 346–364. [Mil'man LS, Yurovetskiy YG, Ermolaeva LP (1974) In: The methods of developmental biology. Determination of the activity of the essential enzymes of carbohydrate metabolism. M. Nauka. 346–364. (In Russ)].
15. Kotrschal K, Van Staaden MJ, Huber R (1998) Fish brains: evolution and anvironmental relationships. *Rev Fish Biol Fish* 8: 373–408.
<https://doi.org/10.1023/A:1008839605380>
16. Northcutt RG (2002) Understanding vertebrate brain evolution. *Integr Comp Biol* 42: 743–756.
<https://doi.org/10.1093/icb/42.4.743>
17. Swanson LW (2000) What is the brain? *Trends Neurosci* 23:519–527.
[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01639-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01639-8)
18. Ito H, Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N (2007) Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain, Behavior and Evolution* 69: 76–86.
<https://doi.org/10.1159/000095196>
19. Puelles L (1995) A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav Evol* 4–5: 319–337.
<https://doi.org/10.1159/000113282>
20. Kage T, Takeda H, Yasuda T, Maruyama K, Yamamoto N, Yoshimoto M, Araki K, Inohaya K, Okamoto H, Yasumasu S, Watanabe K, Ito H, Ishikawa Y (2004) Morphogenesis and regionalization of the medaka embryonic brain. *J Comp Neurol* 476: 219–239.
<https://doi.org/10.1002/cne.20219>
21. Almeida-Val VMF, Val AL, Duncan WP, Souza FC, Paula-Silva MN, Land S (2000) Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp Biochem Physiol B Biochem Physiol* 125: 219–226.
[https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(99\)00172-8](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(99)00172-8)
22. Taylor EW, Leite CAC, McKenzie DJ, Wang T (2010) Control of respiration in fish, amphibians and reptiles. *Braz J Med Bio Res* 43:409–424.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500025>
23. Milsom WK (2010) The phylogeny of central chemoreception. *Resp Physiol Neurobiol* 173: 195–200.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.05.022>
24. Milsom WK, Taylor ETW (2015) Control of breathing in elasmobranchs. *Fish Physiol* 34: 83–126.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801286-4.00002-2>
25. Shulman GE, Love RM (1999) *Advances in Marine Biology: The biochemical ecology of marine fishes*. Acad Press.
26. Houlihan DF, Mathers EM, Foster A (1993) Biochemical correlates of growth rate in fish. In *Fish ecophysiol*. Rankin JC, Jensen FB (Eds). Chapman & Hall: Fal-mouth, Cornwall. 45–71.
27. Almeida-Val VMF, Farias IP, Silva MN, Duncan WP, Val AL (1995) Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. *Braz J Med Biol Res* 28:1257–1263.
28. Schultz IR, Barron MG, Newman MC, Vick AM (1999) Blood flow distribution and tissue allometry in channel catfish. *J Fish Biol* 54: 1275–1286.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb02054.x>
29. Soldatov AA (2006) Organ blood flow and vessels of microcirculatory bed in fish. *J Evol Biochem Physiol* 42: 243–252.
<https://doi.org/10.1134/S002209300603001X>
30. Kieffer JD, Tufts BL (1998) Effects of food deprivation on white muscle energy reserves in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the relationships with body size and temperature. *Fish Physiol Biochem* 19:239–245.
<https://doi.org/10.1023/A:1007759407275>
31. Foster GD, Youson JH, Moon TW (1993) Carbohydrate metabolism in the brain of the adult lamprey. *J Exp Zool* 267: 27–32.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402670105>
32. Vornanen M, Paajanen V (2006) Seasonal changes in glycogen content and Na⁺-K⁺-ATPase activity in the brain of crucian carp. *Am J Physiol* 291: R1482–R1489.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00172.2006>
33. Tota B, Cimini V, Salvatore G, Zummo G (1983) Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranchs and teleost fishes. *Am J Anat* 167: 15–32.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001670103>
34. Olson E (2006) Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. *Science* 313: 1922–1927.
<https://doi.org/10.1126/science.1132292>
35. Harvey RP (2002) Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Gen* 3: 544–556.
<https://doi.org/10.1038/nrg843>
36. Simões-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, Yan CYI, Davidson B, Xavier-Neto J (2005) The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol* 277: 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.09.026>
37. Kibler NA, Nuzhny VP, Kharin SN, Shmakov DN (2020) Does Atrial Electrical Stimulation to the Sequence of Depolarization of the Ventricles of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Evol Biochem Physiol* 56: 60–65.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020010056>
38. Farrell AP, Jones DR, Hoar WS, Randall DJ (1992) The heart. In *Fish Physiology*. Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP (Eds). Acad Press Inc San Diego USA 1–88.
39. Tessadori F, van Weerd JH, Burkhard SB, Verkerk AO, de Pater E, Boukens BJ, Vink A, Christoffels VM, Bakkers J (2012) Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One* 7: e47644.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047644>

40. *Stoyek MR, Croll RP, Smith FM* (2015) Intrinsic and extrinsic innervation of the heart in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 523: 1683–1700. <https://doi.org/10.1002/cne.23764>
41. *Short CE, Driedzic WR* (2018) Species-specific low plasma glucose in fish is associated with relatively high tissue glucose content and is inversely correlated with cardiac glycogen content. *J Comp Physiol* 188: 809–819. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1172-3>
42. *Vornanen M* (1994) Seasonal adaptation of crucian carp (*Carassius carassius* L.) heart: glycogen stores and lactate dehydrogenase activity. *Can J Zool* 72: 433–442. <https://doi.org/10.1139/z94-061>
43. *Lutz PL, Nilsson GE* (1997) Contrasting strategies for anoxic brain survival—glycolysis up or down. *J Exp Biol* 200: 411–419. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.2.411>
44. *Richards JG* (2009) Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. *Fish Physiol* 27: 443–485. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00010-1)
45. *Kumar A, Gopesh A* (2015) Effect of hypoxia and energy conservation strategies in the air-breathing Indian catfish, *Clarias batrachus*. *Natl Acad Sci Lett* 38: 135–137. <https://doi.org/10.1007/s40009-014-0332-6>
46. *Taylor EW* (1992) Nervous control of the heart and cardiorespiratory interactions. *Fish Physiol* 12: 343–387. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60013-8](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60013-8)
47. *Taylor EW, Leite CAC, Florindo LH, Belao T, Rantin FT* (2009) The basis of vagal efferent control of heart rate in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *J Exp Biol* 212: 906–913. <https://doi.org/10.1242/jeb.020529>
48. *Vornanen M, Tuomennoro J* (1999) Effects of acute anoxia on heart function in crucian carp: importance of cholinergic and purinergic control. *Am J Physiol* 277: R465–R475. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.2.R465>
49. *Sollid J, Nilsson GE* (2006) Plasticity of respiratory structures—adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Resp Physiol Neurobiol* 154:241–251. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.02.006>
50. *Hochachka PW* (1986) Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234–241. <https://doi.org/10.1126/science.2417316>
51. *Sick TJ, Perez-Pinon M, Lutz PL, Rosenthal M* (1993) Maintaining coupled metabolism and membrane function in anoxic brain: A comparison between the turtle and rat. In *Surviving hypoxia*. Hochachka PW, Lutz PL, Sick T, Rosenthal M, van den Thillart D (Eds). CRC Press: Boca Raton, Florida. 351–363.
52. *Buck LT, Pamenter ME* (2018) The hypoxia-tolerant vertebrate brain: arresting synaptic activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 224: 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.11.015>
53. *Paajanen V, Vornanen M* (2003) Effects of chronic hypoxia on inward rectifier K⁺ current (I_{K1}) in ventricular myocytes of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. *J Membr Biol* 194:119–127. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-2032-x>
54. *Liu H, Aldrich RW* (2011) Tissue-specific N terminus of the HCN4 channel affects channel activation. *J Biol Chem* 286: 14209–14214. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.215640>
55. *Robinson RB, Siegelbaum SA* (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65: 453–480. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734>
56. *Bouvier J, Autran S, Dehorter N, Katz DM, Champagnat J, Fortin G, Thoby-Brisson M* (2008) Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzing complex *in vitro*. *Eur J Neurosci* 28: 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06345.x>
57. *Herrmann S, Stieber J, Stockl G, Hofmann F, Ludwig A* (2007) HCN4 provides a “depolarization reserve” and is not required for heart rate acceleration in mice. *EMBO J* 26: 4423–4432. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601868>
58. *Di Francesco D* (2006) Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 53: 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.03.006>
59. *Monfredi O, Maltsev VA, Lakatta EG* (2013) Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiol* 28: 74–92. <https://doi.org/10.1152/physiol.00054.2012>
60. *Laurent P, Holmgren S, Nilsson S* (1983) Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 76: 525–542. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90455-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90455-3)
61. *López-Barneo J, Nurse CA, Nilsson GE, Buck LT, Gassmann M, Bogdanova AY* (2010) First aid kit for hypoxic survival: sensors and strategies. *Physiol Biochem Zool* 83: 753–763. <https://doi.org/10.1086/651584>
62. *Cai W, Liu SS, Li BM, Zhang XH* (2022) Presynaptic HCN channels constrain GABAergic synaptic transmission in pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Biol Open* 11: bio058840. <https://doi.org/10.1242/bio.058840>
63. *Adams S, Zubov T, Bueschke N, Santin JM* (2021) Neuro-modulation or energy failure? Metabolic limitations silence network output in the hypoxic amphibian brainstem. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 320: R105–R116. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00209.2020>
64. *Park K, Yi JH, Kim H, Choi K, Kang SJ, Shin KS* (2011) HCN channel activity-dependent modulation of inhibitory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 952–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.087>

65. Heath AG (1988) Anaerobic and aerobic energy metabolism in brain and liver tissue from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and bullhead catfish (*Ictalurus nebulosus*). *J Exp Zool* 248: 140–146.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402480203>
66. Chippari-Gomes AR, Gomes LDC, Lopes NP, Val AL, Almeida-Val VMF (2005) Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Physiol* 141: 347–355.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.04.006>
67. Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford Univer Press Oxford Great Britain.

Synchronized Oxidoreductases Activity in the Brain and Heart Compartments of the Scorpionfish *Scorpaena Porcus* Linnaeus, 1758 under Acute Hypoxia

E. E. Kolesnikova^{a,#}, I. V. Golovina^a, A. A. Soldatov^a, and T. V. Gavruseva^a

^a Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia

[#]e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

The activity of oxidoreductases, malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase (MDH, 1.1.1.37; LDH, 1.1.1.27) in the medulla oblongata (MB), forebrain, midbrain, diencephalon (FDMB), heart atrium and ventricle were compared in the scorpionfish under acute hypoxia (0.9–1.2 mg O₂ l⁻¹, 90 min). In the brain and heart MDH activity was significantly higher than LDH activity ($p < 0.05$). In the MB and atrium MDH activity was enhanced compared to the FDMB and ventricle. Under hypoxia the features of energy metabolism were established in the brain and heart compartments in the form of two patterns of changes in the oxidoreductase activity. After hypoxic exposure MDH activity decreased ($p < 0.05$) in the MB and atrium. The rise of LDH activity was observed in the FDMB and ventricle ($p < 0.05$). Apparently, the synchronization of the energy metabolism of the MB and atrium is determined by the functioning of the embedded respiratory and heart rhythm generators which are associated with cAMP-regulated HCN-channels. Under normoxia electrical oscillations of the MB and atrium require high energy costs which are provided by aerobic glycolysis. Under hypoxia a drop in ATP synthesis contributes to the inactivation of HCN-channels and switching of respiratory and cardiac functions into a regime of functional suppression for the survival of the scorpionfish.

Keywords: teleosts, hypoxic tolerance, brain, heart, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРА СОМЫ У НЕЙРОНОВ ДОРЗАЛЬНОГО НАРУЖНОГО КОЛЕНЧАТОГО ТЕЛА КОШКИ: ДОРЗОВЕНТРАЛЬНЫЙ И ЦЕНТРОПЕРИФЕРИЧЕСКИЙ ГРАДИЕНТЫ

© 2022 г. А. А. Михалкин¹, Н. И. Никитина¹, Н. С. Меркульева^{1,*}

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

*e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.08.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 02.10.2022 г.

Исследована динамика постнатального формирования нейронов дорзального наружного колленчатого тела с использованием антител к селективному маркеру Y нейронов – нефосфорилированных доменов тяжелых цепей нейрофиламентов (антитела SMI-32). Измерена площадь соммы нейронов в различных функциональных зонах ядра. Выявлено три основных факта, отражающих особенности внутренней организации слоев и ретинопических зон дорзального наружного колленчатого тела. (1) Восходящий дорзовентральный градиент площади соммы SMI-32-иммунопозитивных нейронов, усиливающийся с возрастом; (2) Нисходящий центропериферический градиент площади SMI-32-иммунопозитивных нейронов, с возрастом ослабевающий; (3) Меньший размер нейронов в представительстве низа поля зрения по вертикальному меридиану. Полученные данные указывают на гетерогенность популяции Y нейронов и гетерохронность их постнатального развития.

Ключевые слова: морфометрия, наружное колленчатое тело, SMI-32, онтогенез, Y проводящий канал

DOI: 10.31857/S0044452922060079

Центральную нервную систему (ЦНС) подразделяют на дискретные структуры; до появления надежных молекулярных маркеров это деление основывалось на анализе цитоархитектоники, т.е. размера, формы и расположения нейронов [1]. Размер соммы нейронов продолжает оставаться верным морфометрическим критерием выделения отдельных нейрональных популяций головного и спинного мозга [2–4]. В процессе онтогенетического развития размер нейронов существенно увеличивается [5, 6]. Мы полагаем, что анализ возрастной динамики изменения размера нейронов может служить одним из критериев выделения скрытых субпопуляций в пределах единой популяции нейронов.

В качестве объекта интереса выбрано дорзальное наружное колленчатое тело (НКТд) – основное таламическое ядро, передающее информацию от сетчатки в зрительную кору [7]. НКТд имеет сложную организацию: в его составе выделяют несколько дискретных слоев, получающих ретинальные входы от разных глаз (ипсилатерального – слои A1, C1 или контралатерального – слои A, Cm (магноцеллюлярный слой C), C2). Также есть данные в пользу более дробного деления основных слоев – на верхние, центральные и нижние подслои [8, 9].

Помимо ламинарного деления, в составе НКТд описано как минимум три типа релейных нейронов – так называемые X, Y, W, на которых переключаются ретинальные афференты клеток соответствующего типа [10, 11], а как максимум – не менее десятка типов, поскольку X, Y и W нейроны, в свою очередь, подразделяют на несколько подтипов [12–14]. Среди этого множества нейрональных популяций только один тип – Y нейроны, формирующие систему, главным образом ответственную за восприятие движущихся объектов, имеет молекулярный маркер: нефосфорилированные домены тяжелых цепей нейрофиламентов, детектируемые с помощью антител SMI-32 [15, 16], и хондроитин сульфат протеогликанов, детектируемых с помощью антител Cat-301 [17]. Некоторые данные [18, 19] позволяют предположить гетерогенность популяции Y нейронов, из чего следует возможность их гетерохронного развития. Еще одним сложным моментом в изучении Y нейронов являются ретинопические карты, создающие еще один фактор для деления нейронов НКТд на подтипы. Целью данной работы было изучение постнатального развития субпопуляций Y нейронов на уровне НКТд.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU) и с одобрения Комиссии по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение № 28/04 от 28.04.2021 г.). В работе использована 31 кошка обоего пола: в возрасте 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62 и 123 дней (Д) (в каждой группе $n = 2-4$) и взрослые животные ($n = 3$). Протокол перфузии, взятия материала и иммуногистохимической реакции подробно рассмотрен в работах [20, 21]. У нейронов выявляли с помощью мышечных антител SMI-32 (BioLegend Cat. No. 801702; RRID: AB_2715852) в разведении 1:5000 [15, 16], антигеном которых являются нефосфорилированные домены тяжелых цепей нейрофиламентов [22]. Иммуногистохимическую реакцию проводили прямым методом на свободно плавающих срезах толщиной 50 мкм, изготовленных на замораживающем микротоме Reichert (Германия). Использовали вторичные антитела коза-анти-мышь (Vector Laboratories Cat# BA-9200, RRID: AB_2336171) в разведении 1: 600. Оцифровку срезов проводили с помощью светлопольного микроскопа Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония, объектив $\times 10$) и камеры Nikon D3400 (Nikon corporation, Япония). Морфометрический анализ нейронов проводили в программе “Cell annotation software” [23].

Анализировали площадь поперечного сечения сомы SMI-32-иммунопозитивных (SMI-32(+)) нейронов в слоях A, A1 и Cm НКТд (рис. 1а). Значения площади сомы были нормированы относительно медианного значения площади сомы на срезе (на графиках обозначены как relative units, г.у.). Самые широкие слои A и A1 дополнительно разделяли на три подслоя параллельно межслойным границам – верхний, средний и нижний (рис. 1б,с). Также, в A-слоях на фронтальных срезах выделяли представительство бинокулярного центра, бинокулярной и монокулярной периферии, содержащим 0° до 5° , от 5° до 45° , от 45° до 90° поля зрения соответственно. На сагиттальных срезах выделяли представительства центра, верхней и нижней периферии, содержащим от -10° до $+5^\circ$, от -50° до -10° , от $+5^\circ$ до $+50^\circ$ поля зрения соответственно (рис. 1б,с).

Для сравнения выборок использованы Nested ANOVA и post-hoc Tukey-тест (для множественных сравнений) и Nested t-test (для парных сравнений) [24], где N – количество животных определенной группы, n – количество срезов у животного. Для большинства животных было проанализировано по 3 среза в каждой плоскости, от некоторых животных использовали только фронтальные или только сагиттальные срезы. Статистически достоверными считали различия при уровне значимости

$p < 0.05$. Числовые данные на рисунках представлены в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в НКТд замерено около 26711 и 22495 SMI-32(+) нейронов на фронтальных и сагиттальных срезах соответственно, в отдельных группах сравнения рассмотрено от 1113 до 4915 SMI-32(+) нейронов в зависимости от возраста и плоскости резки. В анализ взяты только те нейроны, что имели четкие контуры темноокрашенной сомы и ее более светлоокрашенную центральную часть, соответствующую неокрашенному ядру [25]. Поскольку общую популяцию SMI-32(+) нейронов необходимо было поделить на несколько кластеров, мы объединили сходные возрастные группы: 0Д и 4Д, 10Д и 14Д, 21Д и 34Д, 62Д и 123Д.

Возрастная динамика площади сомы SMI-32(+) нейронов в слоях и подслоях НКТд. С возрастом происходит достоверный прирост площади сомы нейронов НКТд, что очевидно при использовании как фронтальных, так и сагиттальных срезов. На сагиттальных срезах наблюдается восходящий дорзовентральный градиент площади сомы SMI-32(+) нейронов: с максимальными значениями в слое Cm и минимальными – в слое A (рис. 2б); при этом на фронтальных срезах четкий градиент виден только у животных возраста 62–123 дня и у взрослых, в младших группах градиент нарушается большей площадью нейронов, расположенных в среднем слое A1 (рис. 2а). Достоверные отличия между слоем A и слоем Cm получены для животных групп 0–4Д ($p = 0.0243$), 62–123Д ($p < 0.001$) и взрослых ($p < 0.05$) – на фронтальных срезах, у для животных групп 0–4Д ($p < 0.0001$), 10–14Д ($p < 0.05$), 62–123Д ($p < 0.001$) и взрослых ($p < 0.001$) – на сагиттальных срезах. В целом восходящий дорзовентральный градиент в площади сомы SMI-32(+) нейронов более очевиден у животных старших возрастов.

Существуют данные в пользу субламинации слоев A и A1, а также неравномерном распределении SMI-32(+) нейронов в пределах A-слоев [15, 26]. В соответствии с этим анализировали значения площади сомы SMI-32(+) нейронов в верхней, средней и нижней частях слоев. Полученные данные подтверждают наличие дорзовентрального градиента изменения площади сомы нейронов. У животных большинства групп отличия между площадью сомы нейронов, расположенных в верхней части слоя A, и в слое Cm, достоверны (на фронтальных срезах – у групп 0–4Д: $p < 0.05$; 62–123Д: $p < 0.001$; взрослых: $p < 0.01$; на сагиттальных срезах – у животных всех групп (0–4Д: $p < 0.01$; 10–14Д: $p < 0.01$; 21–34Д: $p < 0.01$; 62–123Д: $p < 0.0001$; взрослые: $p < 0.01$) (рис. 3). Таким образом, восходящий дорзовентральный градиент площади сомы SMI-32(+) нейронов выявлен при как фронталь-

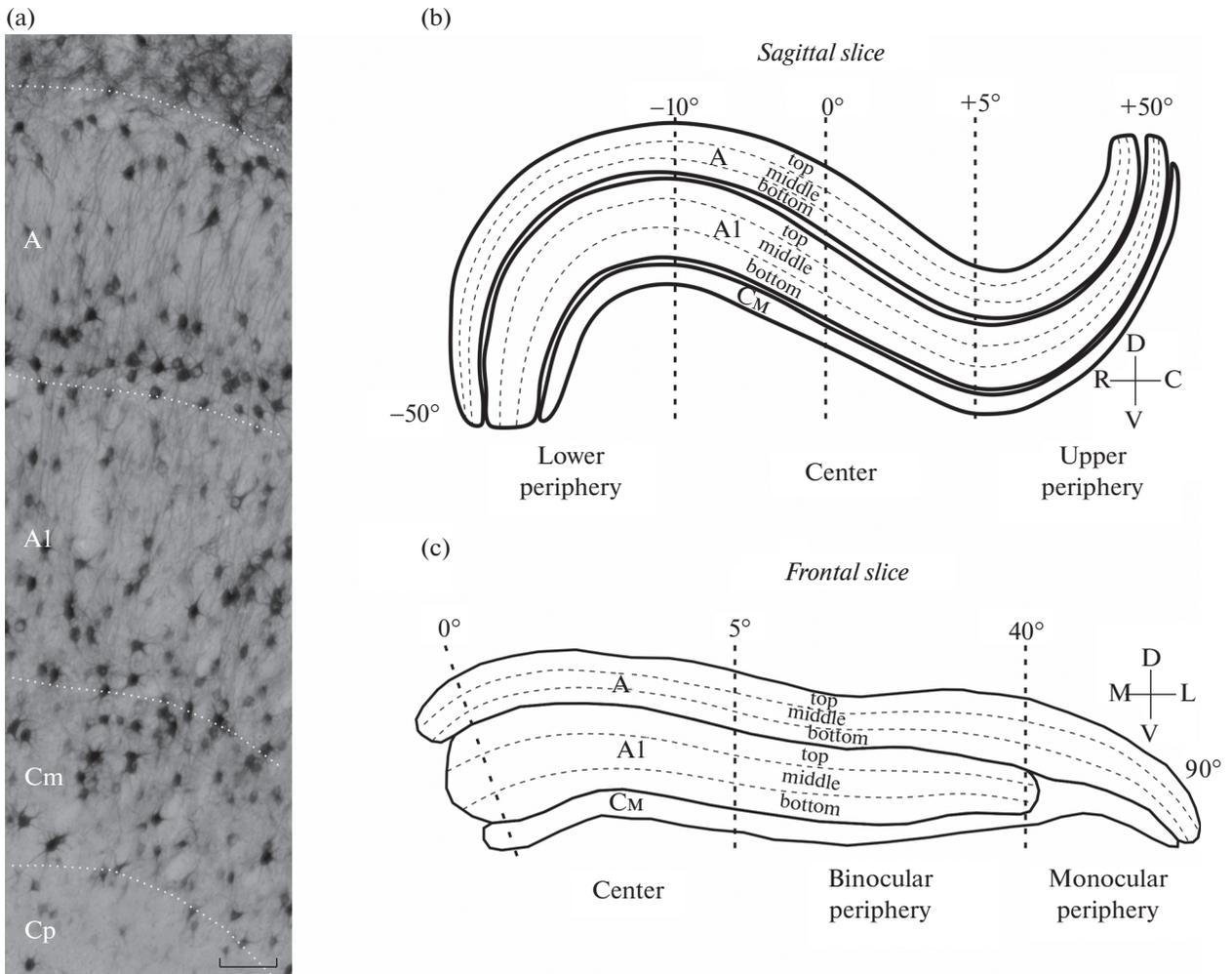


Рис. 1. Примеры SMI-32(+) нейронов в дНКТ (а) и деление ядра на функциональные зоны (b, c). Top, middle и bottom – подслои слоев А; center, upper и lower periphery, binocular и monocular periphery – представители соответствующих ретинотопических зон (центра поля зрения, верхней и нижней периферии по вертикальному меридиану, бинокулярной и монокулярной периферии по горизонтальному меридиану). Калибровочный маркер 150 мкм.

ных, так и сагиттальных срезах, но ярче проявлен во втором случае. У взрослых животных дорзовентральный градиент площади сомы SMI-32(+) нейронов более выражен, чем у котят.

Возрастная динамика площади сомы SMI-32(+) нейронов в ретинотопических зонах НКТд. Фронтальные срезы позволяют сравнить центр и периферию поля зрения вдоль горизонтального меридиана, сагиттальные срезы – вдоль вертикального.

На фронтальных срезах в слое А значения площади клеток в области представительства центра поля зрения больше, чем в представительствах бинокулярной и монокулярной периферии – во всех возрастных группах, кроме взрослых (0–4Д: $p < 0.0001$; 10–14Д: $p < 0.0001$; 21–34Д: $p < 0.0001$; 62–123Д: $p < 0.01$) (рис. 4а). В слое AI площадь сомы нейронов в представительстве центра также выше, чем в представительстве бинокулярной периферии; однако, эти отличия достоверны только для живот-

ных группы 62–123Д ($p < 0/05$) (рис. 4а). В слое Cm, как и в слое А, значения площади сомы в области представительства центра поля зрения недостоверно больше, чем в представительствах бинокулярной периферии – в большинстве групп, за исключением 21–34Д и взрослых, а по сравнению с монокулярной периферией – достоверно больше – в большинстве групп, за исключением взрослых (0–4Д: $p < 0.0001$; 10–14Д: $p < 0.01$; 21–34Д: $p < 0.001$; 62–123Д: $p < 0.001$) (рис. 4а).

На сагиттальных срезах в слое А площадь сомы нейронов в представительстве низа поля зрения всегда несколько ниже, чем в центре поля зрения; эти отличия достоверны только в возрасте 10–14Д: $p < 0.01$ (рис. 4б). В слое AI наблюдается сходная закономерность; при этом отличия достоверны для возрастов 10–14Д: $p < 0.01$; 62–123Д: $p < 0.05$ и взрослых: $p < 0.05$ (рис. 4б). Для обоих слоев площадь сомы нейронов верха поля зрения в большин-

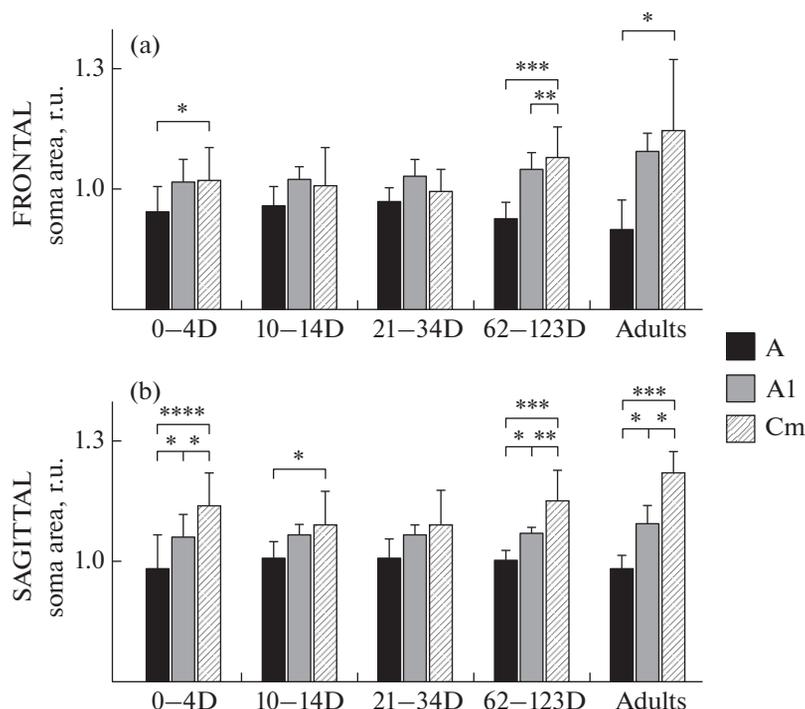


Рис. 2. Возрастная динамика относительной площади сомы SMI-32(+) нейронов слоев А (черный), А1 (белый) и Сm (штриховка) НКТд на фронтальных (а) и сагиттальных (б) срезах. r.u. – условные единицы (relative units); 0–123D, Adults – возрастные группы; средние значения \pm ст.откл., * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$; post-hoc Tukey тест.

стве возрастных групп меньше, чем у нейронов центра поля зрения, однако эти отличия достоверны только в одном случае – у животных 0–4Д ($p < 0.05$). В слое Cm, в общей сложности, показана схожая картина: площадь сомы нейронов больше в представительстве центра поля зрения, чем верхней или нижней периферии, однако эти отличия недостоверны. У животных 0–4Д сома нейронов нижней периферии меньше, чем у нейронов верхней периферии ($p < 0.05$). Таким образом, в целом, наиболее крупные SMI-32(+) нейроны НКТд находятся в представительстве центра поля зрения, наиболее мелкие нейроны – в представительстве монокулярной периферии вдоль горизонтального меридиана.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сам факт того, что с возрастом происходит увеличение площади сомы нейронов НКТд [27, 28], в том числе – SMI-32(+) нейронов [29], известен. Нами получено 3 новых результата, отражающих особенности внутренней организации слоев и ретинотопических зон НКТд: (1) наличие восходящего дорзовентрального градиента площади SMI-32-иммунопозитивных нейронов НКТд, и усиление этого градиента с возрастом; (2) нисходящий центропериферический градиент площади SMI-32-иммунопозитивных нейронов, и ослабление

этого градиента с возрастом; (3) меньший размер нейронов в представительстве низа поля зрения по вертикальному меридиану.

(1) Разница площади сомы SMI-32(+) нейронов в вентральном слое Cm, в дорзальном слое А, отмеченная нами ранее [18], усиливается с возрастом. Поскольку на момент рождения все нейроны НКТд гомогенны по размеру [27], крупным нейронам слоя Cm может потребоваться больше времени, чтобы достичь своего окончательного размера. Размер сомы предположительно связан с общим объемом поддерживаемых нейроном отростков, таких как дендритное древо и терминальное ветвление аксонов [30–33], что в свою очередь может коррелировать с размером рецептивного поля. Электрофизиологические данные указывают на разницу рецептивных полей в слоях НКТд: в слое А выявлены самые маленькие рецептивные поля, в слое А1 размер рецептивных полей больше, чем в А [34], а в слое Cm рецептивные поля самые крупные [35], что согласуется с послойным изменением площади сомы SMI-32(+) нейронов, показанным в данной работе. Кроме того, У нейроны слоя Cm имеют большую контрастную чувствительность [36], а также меньший латентный период и более сильную нелинейную составляющую ответа, чем У нейроны А-слоев [36–38].

(2) С возрастом происходит ослабление центропериферического градиента площади SMI-32(+) нейронов.

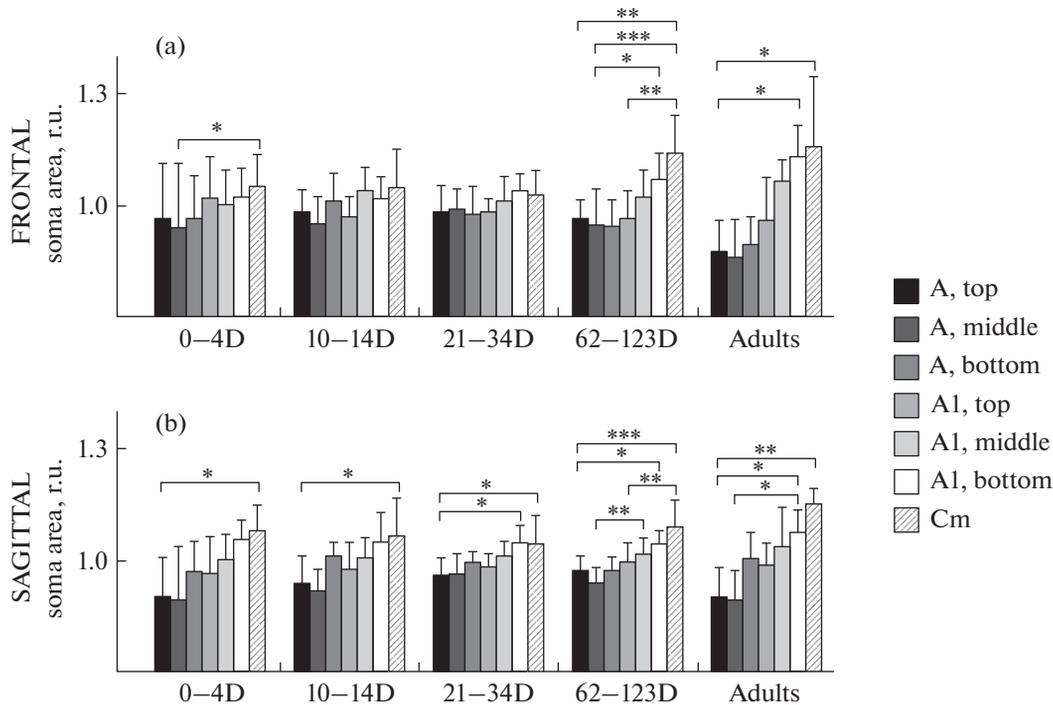


Рис. 3. Возрастная динамика относительной площади сомы SMI-32(+) нейронов в подслоях НКТд на фронтальных (а) и сагиттальных (б) срезах. г.у. – условные единицы; 0–123D, Adults – возрастные группы; средние значения \pm ст.откл., * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; post-hoc Tukey test.

нейронов вдоль горизонтального меридиана в слоях А и Cm, но не в слое А1, где он, наоборот, несколько усиливается. Ранее, при электрофизиологическом исследовании свойств рецептивных полей нейронов НКТд кошки, показали, что с возрастом происходит исчезновение различий между нейронами, локализующимися в представительстве центра и периферии поля зрения [39]. Складывается впечатление, что наши морфологические данные по развитию сомы нейронов лишь частично соответствуют физиологическим данным; однако отметим, что в обозреваемой работе популяции нейронов разных слоев НКТд не различали, таким образом, отличия между слоями могли ускользнуть от исследователей. Отличия между слоями А и А1, зачастую полагающимися гомологичными [10, 40–42] – один из объектов нашего интереса. Серия работ указывает на отличия между слоями А и А1: по распределению составляющих их клеточных популяций [8, 10], балансу организуемых синаптических контактов [43], распределению входящих кортикогеникулятных аксонов [9].

Нисходящий центропериферический градиент площади сомы, по-видимому, характерен для всех релейных клеток НКТд [27, 44]. В то же время, на первый взгляд, более крупная сома в представительстве центра поля зрения противоречит нашему предыдущему предположению о связи размера сомы с размером рецептивного поля, т.к. размер ре-

цептивных полей Y нейронов в центре поля зрения меньше, чем в периферии [45]. Однако следует помнить об усилении сжатия ретинотопического представительства при переходе от центра к периферии поля зрения (факторе магнификации) [46], следствием которого является тот факт, что половину бинокулярной части НКТ занимает лишь 5–10° поля зрения, в то время как по вертикали все поле зрения достигает 60°, а по горизонтали – 90°. Это означает, что даже при крупном дендритном древе, размер рецептивного поля в пределах представительства 5–10° может быть меньше, чем у нейрона с меньшим размером дендритного древа, но залегающим в представительстве периферии.

Обе предполагаемые закономерности: увеличение сомы нейронов за счет увеличения рецептивного поля в дорзовентральном направлении и уменьшение сомы нейронов за счет сжатия ретинотопических изолиний в медиолатеральном направлении – могут присутствовать в НКТд, формируя общие градиенты площади сомы нейронов.

(3) В представительстве низа поля зрения по вертикальному меридиану SMI-32(+) нейроны меньше, чем в представительстве центра поля зрения. Обработка информации от низа поля зрения имеет явные особенности на корковом уровне: выявлен существенный дефицит представительства этой области поля зрения в областях 19, 20a, 20b, 21a, 21b зрительной коры [47, 48]. В данной работе

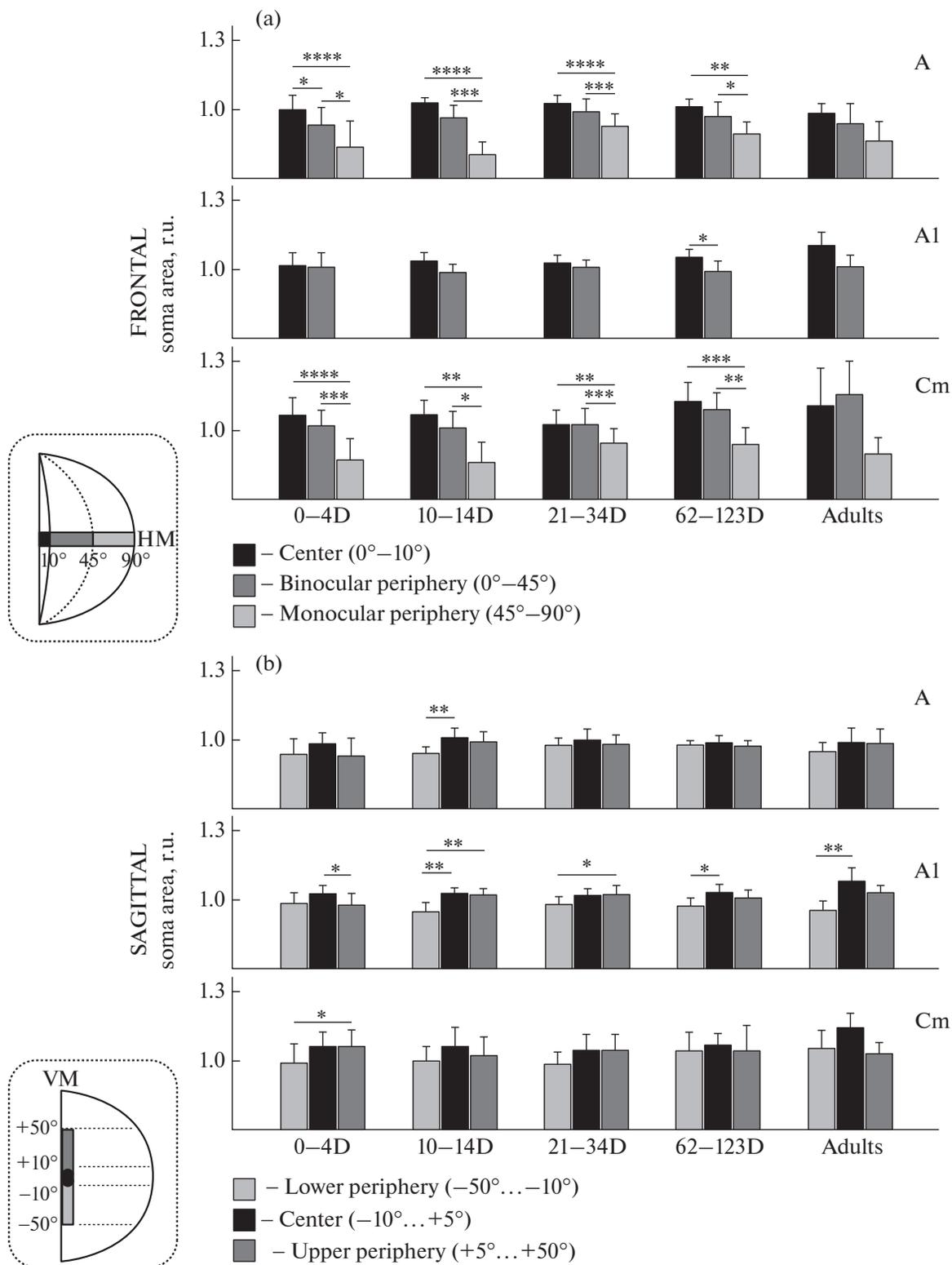


Рис. 4. Возрастная динамика относительной площади сомы SMI-32(+) нейронов в ретинотопических зонах НКТд. (а) – относительная площадь сомы на фронтальных срезах в представительствах центра (черный), бинокулярной периферии (темно-серый), монокулярной периферии (светло-серый). (б) – относительная площадь сомы на сагиттальных срезах в представительствах центра (черный), верхней периферии (темно-серый), нижней периферии (светло-серый). г.у. – условные единицы; 0–123D, adults – возрастные группы; ср. знач. ± ст.откл., * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$, post-hoc Tukey test. В левом нижнем углу показаны части поля зрения, представленные на графиках (те же цвета).

мы выявили особенности нейронов представления низа поля зрения и на таламическом уровне; полагаем, это может быть связано со значительно меньшим использованием низа поля зрения, по сравнению с верхом поля зрения, у низкорослых животных (в данном случае, кошки).

Кроме общего объема поддерживаемых отростков, с размером сомы также связывают толщину и скорость проведения аксона. Наиболее крупные нейроны имеют наибольший диаметр аксона и скорость проведения по нему импульса, что, вероятно, является общей закономерностью нервной ткани [49–51]. В зрительной системе хищных эта закономерность показана на уровне сетчатки [52]. Из этого следует интересный вывод: в центре поля зрения находятся самые быстропроводящие Y нейроны. Учитывая, что кошка является засадным хищником, скорость реакции на движение предполагаемой добычи, которая находится в зоне броска, а следовательно, в центре поля зрения, является критически важным эволюционным параметром.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ динамики роста сомы SMI-32(+) нейронов позволил выявить несколько особенностей внутренней организации слоев и ретинопических зон НКТд, указывающих на гетерогенность популяции Y нейронов и гетерохронность ее постнатального развития.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам лаборатории нейроморфологии за помощь при проведении исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы информируют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования: А.А.М., Н.С.М. Сбор и обработка материала: А.А.М., Н.И.Н. Статистическая обработка данных: А.А.М. Анализ и интерпретация данных: А.А.М., Н.С.М. Написание текста: А.А.М., Н.С.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brodman K* (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues, Barth JA. Leipzig.
2. *Al Ghamdi KS, Polgár E, Todd AJ* (2009) Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin 1 receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn. *Neuroscience* 164:1794–1804. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.071>
3. *Beebe NL, Young JW, Mellott JG, Schofield BR* (2016) Extracellular molecular markers and soma size of inhibitory neurons: evidence for four subtypes of GABAergic cells in the inferior colliculus. *J Neurosci* 36: 3988–3999. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0217-16.2016>
4. *Lingley AJ, Bowdridge JC, Farivar R, Duffy KR* (2018) Mapping of neuron soma size as an effective approach to delineate differences between neural populations. *J Neurosci Methods* 304: 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.04.018>
5. *Davis MR, Fernald RD* (1990) Social control of neuronal soma size. *J Neurobiol* 21: 1180–1188. <https://doi.org/10.1002/neu.480210804>
6. *Rabinowicz T, Petetot JM-C, Khoury JC, de Courten-Myers GM* (2009) Neocortical maturation during adolescence: Change in neuronal soma dimension. *Brain Cogn* 69: 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.08.005>
7. *Payne BR, Peters A* (2002) The Concept of Cat Primary Visual Cortex. In: Payne BR, Peters A (eds) *The Cat Primary Visual Cortex*. Elsevier, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1–129.
8. *Bowling DB, Caverhill JI* (1989) ON/OFF organization in the cat lateral geniculate nucleus: Sublaminae vs. columns. *J Comp Neurol* 283:161–168. <https://doi.org/10.1002/cne.902830114>
9. *Murphy PC, Duckett SG, Sillito AM* (2000) Comparison of the laminar distribution of input from areas 17 and 18 of the visual cortex to the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Neurosci* 20: 845–853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00845.2000>
10. *Bowling DB, Wieniawa-Narkiewicz E* (1986) The distribution of on- and off-centre X- and Y-like cells in the A layers of the cat's lateral geniculate nucleus. *J Physiol* 375: 561–572. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016133>
11. *Westland KW, Burke W* (2002) Patterns of X and Y optic nerve fibre terminations in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *Doc Ophthalmol* 105:129–149. <https://doi.org/10.1023/A:1020544802517>
12. *Mastrorade DN* (1987) Two classes of single-input X-cells in cat lateral geniculate nucleus. I. Receptive-field properties and classification of cells. *J Neurophysiol* 57: 357–380. <https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.2.357>
13. *Enroth-Cugell C, Robson JG* (1984) Functional characteristics and diversity of cat retinal ganglion cells. Basic characteristics and quantitative description. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:250–267.
14. *Saul AB* (2008) Lagged cells. *NeuroSignals* 16:209–225. <https://doi.org/10.1159/00011564>
15. *Bickford ME, Guido W, Godwin DW* (1998) Neurofilament proteins in Y-cells of the cat lateral geniculate nu-

- cleus: Normal expression and alteration with visual deprivation. *J Neurosci* 18: 6549–6557.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06549.1998>
16. *Duffy KR, Crowder NA, LeDue EE* (2012) Investigation of cytoskeleton proteins in neurons of the cat lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 520:186–199.
<https://doi.org/10.1002/cne.22727>
 17. *Hockfield S, Sur M* (1990) Monoclonal antibody Cat-301 identifies Y-cells in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 300: 320–330.
<https://doi.org/10.1002/cne.903000305>
 18. *Mikhalkin A, Nikitina N, Merkulyeva N* (2021) Heterochrony of postnatal accumulation of nonphosphorylated heavy-chain neurofilament by neurons of the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 529: 1430–1441.
<https://doi.org/10.1002/cne.25028>
 19. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Zykin P* (2018) Early postnatal development of the lamination in the lateral geniculate nucleus A-layers in cats. *Cell Mol Neurobiol* 38: 1137–1143.
<https://doi.org/10.1007/s10571-018-0585-6>
 20. *Merkulyeva NS, Veshchitskii A, Makarov F, Gerasimenko Y, Musienko P* (2016) Distribution of 28 kDa calbindin-immunopositive neurons in the cat spinal cord. *Front Neuroanat* 9:166.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00166>
 21. *Mikhalkin AA, Merkulyeva NS* (2021) Peculiarities of Age-Related Dynamics of Neurons in the Cat Lateral Geniculate Nucleus as Revealed in Frontal versus Sagittal Slices. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1001–1007.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021050021>
 22. *Sternberger LA, Sternberger NH* (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 6126–6130.
<https://doi.org/10.1073/pnas.80.19.6126>
 23. *Nurzynska K, Mikhalkin A, Piorkowski A* (2017) CAS: cell annotation software – research on neuronal tissue has never been so transparent. *Neuroinformatics* 15: 365–382.
<https://doi.org/10.1007/s12021-017-9340-2>
 24. *Quené H, Van Den Bergh H* (2004) On multi-level modeling of data from repeated measures designs: A tutorial. *Speech Commun* 43: 103–121.
<https://doi.org/10.1016/j.specom.2004.02.004>
 25. *Kutcher MR, Duffy KR* (2007) Cytoskeleton alteration correlates with gross structural plasticity in the cat lateral geniculate nucleus. *Vis Neurosci* 24: 775–785.
<https://doi.org/10.1017/S095252380707068X>
 26. *Van Der Gucht E, Vandesande F, Arckens L* (2001) Neurofilament protein: A selective marker for the architectonic parcellation of the visual cortex in adult cat brain. *J Comp Neurol* 441: 345–368.
<https://doi.org/10.1002/cne.1416>
 27. *Kalil R* (1978) Development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the cat. *J Comp Neurol* 182: 265–291.
<https://doi.org/10.1002/cne.901820206>
 28. *Hickey TL* (1980) Development of the dorsal lateral geniculate nucleus in normal and visually deprived cats. *J Comp Neurol* 189: 467–481.
<https://doi.org/10.1002/cne.901890304>
 29. *Carden WB, Guido W, Ziburkus J, Datskovskaia A, Godwin DW, Bickford ME* (2000) A novel means of Y cell identification in the developing lateral geniculate nucleus of the cat. *Neurosci Lett* 295: 5–8.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01581-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01581-0)
 30. *Ho KC, Gwozdz JT, Hause LL, Antuono PG* (1989) Correlation of neuronal cell body size in motor cortex and hippocampus with body height and body weight. *J Neuropathol Exp Neurol* 48: 361.
<https://doi.org/10.1097/00005072-198905000-00188>
 31. *Coleman LA, Friedlander MJ* (2002) Postnatal dendritic development of Y-like geniculocortical relay neurons. *Int J Dev Neurosci* 20: 137–159.
[https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(02\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(02)00018-7)
 32. *Humphrey AL, Sur M, Uhrlich DJ, Sherman SM* (1985) Projection patterns of individual X- and Y-cell axons from the lateral geniculate nucleus to cortical area 17 in the cat. *J Comp Neurol* 233: 159–89.
<https://doi.org/10.1002/cne.902330203>
 33. *Ling C, Hendrickson ML, Kalil RE* (2012) Morphology, classification, and distribution of the projection neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat. *PLoS One* 7: e49161.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049161>
 34. *Hoffmann K-P, Sireteanu R* (1977) Interlaminar differences in the effects of early and late monocular deprivation on the visual acuity of cells in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Neurosci Lett* 5: 171–175.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(77\)90042-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(77)90042-8)
 35. *Yeh C-I, Stoelzel CR, Alonso J-M* (2003) Two different types of Y cells in the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol* 90: 1852–1864.
<https://doi.org/10.1152/jn.00417.2003>
 36. *Lee D, Lee C, Malpeli JG* (1992) Acuity-sensitivity trade-offs of X and Y cells in the cat lateral geniculate complex: role of the medial interlaminar nucleus in scotopic vision. *J Neurophysiol* 68: 1235–1247.
<https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.4.1235>
 37. *Frascella J, Lehmkuhle S* (1984) A comparison between Y-cells in A-laminae and lamina C of cat dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol* 52: 911–920.
<https://doi.org/10.1152/jn.1984.52.5.911>
 38. *Yeh CI, Stoelzel CR, Weng C, Alonso JM* (2009) Functional consequences of neuronal divergence within the retinogeniculate pathway. *J Neurophysiol* 101: 2166–2185.
<https://doi.org/10.1152/jn.91088.2008>
 39. *Tootle JS, Friedlander MJ* (1986) Postnatal development of receptive field surround inhibition in kitten dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol* 56: 523–541.
<https://doi.org/10.1152/jn.1986.56.2.523>
 40. *Van Horn SC, Erişir A, Sherman SM* (2000) Relative distribution of synapses in the A-laminae of the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 416: 509–520.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000124\)416:4<509::AID-CNE7>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000124)416:4<509::AID-CNE7>3.0.CO;2-H)
 41. *Duffy KR, Fong MF, Mitchell DE, Bear MF* (2018) Recovery from the anatomical effects of long-term monocular deprivation in cat lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 526: 310–323.
<https://doi.org/10.1002/cne.24336>

42. *Lingley AJ, Mitchell DE, Crowder NA, Duffy KR* (2019) Modification of Peak Plasticity Induced by Brief Dark Exposure. *Neural Plast* 2019: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/3198285>
43. *Erişir A, Van Horn SC, Sherman SM, Erişir A, Van Horn SC, Sherman SM* (1998) Distribution of synapses in the lateral geniculate nucleus of the cat: Differences between laminae A and A1 and between relay cells and interneurons. *J Comp Neurol* 390:247–255. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980112\)390:2<247::AID-CNE7>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980112)390:2<247::AID-CNE7>3.0.CO;2-1)
44. *LeVay S, Ferster D* (1977) Relay cell classes in the lateral geniculate nucleus of the cat and the effects of visual deprivation. *J Comp Neurol* 172: 563–584. <https://doi.org/10.1002/cne.901720402>
45. *Lehmkuhle S, Kratz KE, Mangel SC, Sherman SM* (1980) Spatial and temporal sensitivity of X- and Y-cells in dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *J Neurophysiol* 43: 520–541. <https://doi.org/10.1152/jn.1980.43.2.520>
46. *Sanderson K* (1971) The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial interlaminar nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 143: 101–108. <https://doi.org/10.1002/cne.901430107>
47. *Tusa RJ, Rosenquist AC, Palmer LA* (1979) Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J Comp Neurol* 185: 657–678. <https://doi.org/10.1002/cne.901850405>
48. *Tusa RJ, Palmer LA* (1980) Retinotopic organization of areas 20 and 21 in the cat. *J Comp Neurol* 193: 147–164. <https://doi.org/10.1002/cne.901930110>
49. *Cullheim S* (1978) Relations between cell body size, axon diameter and axon conduction velocity of cat sciatic α -motoneurons stained with horseradish peroxidase. *Neurosci Lett* 8: 17–20. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(78\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(78)90090-3)
50. *Davis WJ* (1971) Functional significance of motoneuron size and soma position in swimmeret system of the lobster. *J Neurophysiol* 34: 274–288. <https://doi.org/10.1152/jn.1971.34.2.274>
51. *Kovac MP, Davis WJ, Matera E, Gillette R* (1982) Functional and structural correlates of cell size in paracerebral neurons of *Pleurobranchaea californica*. *J Neurophysiol* 47: 909–927. <https://doi.org/10.1152/jn.1982.47.5.909>
52. *Fitzgibbon T, Wingate RJ, Thompson ID* (1996) Soma and axon diameter distributions and central projections of ferret retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 13: 773–786. <https://doi.org/10.1017/S0952523800008646>

Age-Related Changes in Soma Size of Y Neurons in the Cat Dorsal Lateral Geniculate Nucleus: Dorsoventral and Centropreperipheral Gradients

A. A. Mikhalkin^a, N. I. Nikitina^a, and N. S. Merkulyeva^{a,#}

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

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

The postnatal developmental dynamics of neurons in the cat dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) was studied using a selective marker of Y neurons, the antibody SMI-32. The neuronal soma area was measured within various functional zones of the nucleus. The following three major facts reflecting internal organization peculiarities of the dLGN layers and retinotopic zones have been established: (1) ascending dorsoventral soma area gradient in SMI-32-immunopositive neurons, increasing with age; (2) descending centropreperipheral soma area gradient in SMI-32-immunopositive neurons, decreasing with age; (3) a smaller size of neurons located in the lower visual field representation along the vertical meridian. The obtained data indicate the heterogeneity of the neuronal population and the heterochronicity of their postnatal development.

Keywords: lateral geniculate nucleus, SMI-32, ontogenesis, Y visual pathway, morphometry