
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ ГЕНОМА КЛЕТОК ГИППОКАМПА
И КОСТНОГО МОЗГА САМЦОВ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ
ИММОБИЛИЗАЦИИ И ФЕРОМОНАЛЬНОГО СТРЕССОРА**

© 2023 г. В. Д. Щербинина^{1, 2}, Б. В. Бакулевский¹, Т. С. Глинин¹, Е. В. Даев^{1, 2, *}

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

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mouse_gene@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Стрессоры различной природы, воздействуя на клетки органов-мишеней, способны приводить к геномной нестабильности и даже дезинтеграции, что может играть роль в формировании постстрессорных патологий. На самцах лабораторных мышей различных линий (CD-1, CBA, C3H) цитогенетическими методами (щелочным кометным гель-электрофорезом, ана-телофазным анализом нарушений митоза и иммуноцитохимическим анализом фокусов γ H2AX) изучали влияние психоэмоциональных стрессоров (иммобилизации и феромона стресса – 2,5-диметилпиразина) на целостность ДНК клеток гиппокампа и костного мозга. Показано, что как классический стрессор мышей – иммобилизация, так и 2,5-диметилпиразин повреждают геном клеток обоих исследованных органов. Дестабилизация генома клеток различных органов рассматривается как необходимый этап развития стресс-реакции в попытке организма приспособиться к экстремальным воздействиям среды.

Ключевые слова: иммобилизационный и феромональный стресс, гиппокамп, костный мозг, дестабилизация генома, тест ДНК-комет, нарушения митоза, фокусы γ H2AX

DOI: 10.31857/S0869813923070129, **EDN:** XIJRPZ

ВВЕДЕНИЕ

Постоянная взаимосвязь “среда $\leftrightarrow$ генотип” позволяет геному живого организма реагировать на средовые изменения. Воздействия, выходящие за рамки нормы реакции конкретного генотипа, ведут к ненаправленным модификациям и перестройкам генома. Из всех возникающих внутриорганизменных изменений в результате естественного отбора сохраняются только нейтральные или повышающие приспособленность организма в новых средовых условиях. Именно длительный предшествующий отбор определяет адаптивную значимость ответных реакций ныне существующих живых организмов на действие тех или иных средовых факторов.

В многоклеточном организме клетки координированно отвечают на возникшее изменение в соответствии с дифференциальной активностью их геномов, определяющих специфические функции. Связь между клетками многоклеточного организма осуществляется клетками нервной системы: центральной и периферической. Именно клетки центральной нервной системы обеспечивают направленное

распределение сигналов об изменениях в окружающей среде по всем периферийным органам.

Одной из ключевых структур мозга, участвующих в формировании ответа многоклеточного организма на внешние стимулы, и в частности стрессоры, является гиппокамп [1, 2]. Гиппокамп играет важную роль в регуляции поведения животных, процессах запоминания и обучения, сборе и извлечении информации из памяти. Его активность модулируется состоянием как острого, так и хронического стресса [3, 4]. Последний вызывает атрофию дендритов у стрессированных крыс [5], структурные и функциональные изменения [6]. Гиппокамп — одна из уникальных структур мозга, где нейрогенез продолжается в течение всей жизни. Его активность модулируется стрессорами, от чего может зависеть чувствительность/устойчивость к внешним воздействиям [7]. Показано, что 30-минутная иммобилизация повышает уровень белка ТОВ (регулятора пролиферации клеток, активности с-Мус) в гиппокампе через три и пять часов после окончания стрессирования [3].

Недавние работы исследователей [8] на линиях лабораторных мышей демонстрируют вовлеченность костного мозга в ответ даже на краткосрочную иммобилизацию. Выявлено, что этот важный иммунокомпетентный орган теряет значительное количество эндогенных нейтрофилов, которые вместе с другими типами лейкоцитов перераспределяются по периферийным органам. Максимум ответа наблюдали после четырехчасового стрессирования. Показана также связь этого процесса с паравентрикулярным гипоталамусом и внутриклеточными глюкокортикоидными каскадами сигнальной трансдукции в клетках-мишенях. Стресс-индуцированный лейкоцитарный сдвиг связан с измененной восприимчивостью к заболеваниям [8]. Хронический стресс, вызванный иммобилизацией, у мышей приводит к угнетению репарации ДНК и активации путей биологического старения в лейкоцитах костного мозга, вероятно, опосредованно через активацию симпатических β -адренорецепторов [9].

Стрессы оказывают все большее влияние на здоровье человека. Многие стрессоры, с которыми сталкивается человек, имеют психоэмоциональную природу. Их появление часто коррелирует с перенаселенностью. Длительный стресс приводит к нарушению функционирования как нервной системы, так и периферических органов. Так, например, больше половины пациентов со стресс-индуцированной клинической депрессией страдают также от хронических системных заболеваний, что демонстрирует важность исследования двунаправленной связи между ЦНС и другими системами органов [10]. Стрессы, индуцированные различными факторами, вызывают расстройства памяти, посттравматическое стрессовое расстройство, изменение различных форм поведения, другие болезни, связанные с нарушением работы нейроэндокринной, иммунной и репродуктивной систем [10].

Нормальная жизнь организма сводится к постоянной адаптации к тем или иным изменениям (ежедневным, ежечасным, ежеминутным и т.д.) в окружающей его среде. **Стресс-реакцию** следует рассматривать как **попытку адаптации** организма к внешнему воздействию в случае, когда он не справляется с возникшими нагрузками “обычными”, “повседневными” средствами в рамках нормы реакции своего генотипа. Вовлечение неспецифических “реакций” на геномном уровне, таких как его функциональная и структурная перестройка, ведет к повышению мутабельности, усилению перемещений мобильных элементов генома, вплоть до его дезинтеграции в клетках-мишенях. В зависимости от силы и/или длительности стрессорных воздействий стресс-ответ может приводить к дисбалансу работы клеток-мишеней, их гибели или злокачественной трансформации, угнетению или отказу работы отдельных органов, иммуносупрессии, подавлению репродукции и снижению общей приспособленности организма.

Несмотря на важность и актуальность исследований в области формирования стресс-реакции, механизмы, определяющие ее краткосрочные и долгосрочные последствия в организме на геномном уровне в клетках ЦНС, недостаточно исследованы. Моделирование стресс-реакций у животных сводится, в основном, к использованию ограниченного числа стрессоров, таких как электрический ток, принудительное плавание, иммобилизация, звуковые и температурные раздражители, голодание и т.д. В то же время естественным, постоянно действующим в природе стрессорным воздействием биологического происхождения не уделяется достаточного внимания. Такими “природными” стрессорами у животных могут быть некоторые хемосигналы, выделяемые в окружающую среду. Условно разделяемые на сигнальные и праймер-феромоны эти вещества существенно влияют на поведение, физиологические, цитогенетические характеристики у животных-реципиентов [11, 12]. Так, показано, что плотностнозависимый праймер-феромон 2,5-диметилпиразин (ДМП) индуцирует хромосомные aberrации в клетках костного мозга и семенников лабораторных мышей. Это ведет к иммуносупрессии и снижению количества и качества потомства у стрессированных данным феромоном самцов [13]. Выявлено падение концентрации норадреналина в нервных окончаниях слизистой оболочки носа и сосудистой оболочки семенников после феромонального воздействия ДМП [13], нарушение стабильности генома соматических и половых клеток [14]. Индукция генетической изменчивости в мейотически делящихся клетках особенно важна, так как может отражаться не только на количестве, но и на качестве оставляемого потомства [13].

Таким образом, стресс-реакция, за счет влияния на дифференциальную выживаемость и генетическую изменчивость, является важным механизмом регуляции скорости и направленности эволюционного процесса. Дестабилизация генома клеток в гиппокампальном отделе ЦНС и жизненно важном органе иммунопоза — костном мозге, может рассматриваться как одна из причин формирования различных отдаленных последствий стресса, таких как неврологические и психические расстройства и иммуносупрессия.

Цель данного исследования состояла в изучении влияния двух разных стрессоров (естественного плотностнозависимого хемосигнала домового мыши — ДМП и искусственно создаваемого стрессора — иммобилизации) на целостность генома клеток гиппокампа и костного мозга, выявляемую различными цитогенетическими методами (щелочным кометным гель-электрофорезом, иммунохимическим анализом фокусов γ H2AX и ана-телофазным анализом нарушений митоза) у самцов лабораторных мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Материалом для исследования служили 67 самцов лабораторных мышей линии СВА, 18 самцов линии СЗН и 16 самцов линии CD-1. Возраст всех животных составлял 4–6 мес. Животные были получены из питомника лабораторных животных “Рапполово” и вивария СПбГУ. Животных не менее 10 дней выдерживали для адаптации к условиям лаборатории, содержали в стандартных клетках (20 × 30 × 10 см) по 5–6 особей при естественном световом дне, пище и воде *ad libitum*. В качестве подстилки использовали опилки. Общая схема экспериментов представлена на рис. 1.

Стрессорные воздействия

Ольфакторное воздействие ДМП осуществляли при помощи размещения на решетке клетки с мышами с внешней стороны перфорированной капсулы диаметром

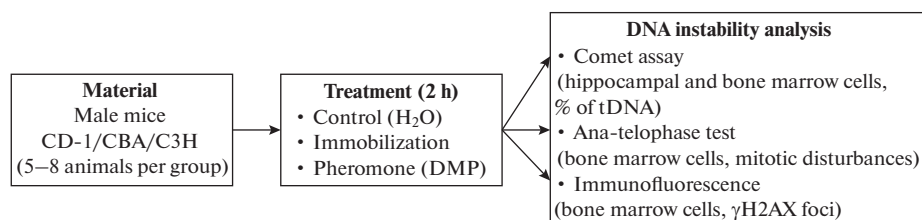


Рис. 1. Схема экспериментов по изучению влияния иммобилизации и феромонального стрессора на стабильность ДНК клеток гиппокампа и костного мозга самцов мышей трех линий (CD-1, CBA и C3H). DMP – 2,5-диметилпиразин; tDNA – tail DNA – ДНК в хвостах комет.

4.0 см с фильтровальной бумагой, содержащей 1.5 мл 0.01%-ного водного раствора ДМП (97%, Aldrich, США). Прямой контакт животных с веществом исключали. Время воздействия ДМП для животных всех линий составило два часа. Для иммобилизации использовали камеры, предварительно изготовленные из 50-миллиметровых пластиковых центрифужных пробирок с крышкой, с проделанными в них отверстиями для хвоста, а также для дыхания и вентиляции животного по ранее описанной методике с модификациями [15]. Каждое животное фиксировали в индивидуальной иммобилизационной камере, которую оставляли на два часа в той же клетке, где особей содержали до начала воздействия. В качестве контроля использовали соответственно капсулу с дистиллированной водой (в случае с ольфакторным воздействием), или подвижность животных не ограничивали (контроль для иммобилизационного воздействия).

Щелочной кометный гель-электрофорез

Для изучения влияния стресса на клетки гиппокампа (16 самцов линии CD-1) и костного мозга (15 самцов линии CBA) из животных каждой линии формировали группы по 5–6 животных, которых подвергали одному из стрессорных воздействий: ДМП или иммобилизации. Контрольные группы воздействиям не подвергали.

После окончания воздействия животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, извлекали гиппокамп (у самцов линии CD-1) или костный мозг (у самцов линии CBA) и готовили суспензию клеток с конечной концентрацией $(2-3) \times 10^5$ клеток/мл. Для оценки степени повреждения ДНК клеток гиппокампа использовали щелочной кометный гель-электрофорез по стандартной методике с небольшими модификациями [16]. Суспензию клеток (по 150 мкл на образец) смешивали с равным объемом 1%-ного раствора легкоплавкой агарозы ($T_{пл} < 42^\circ\text{C}$) в микроцентрифужных пробирках, помещенных в твердотельный термостат СН-100 (BioSan, Латвия) при 37°C . Полученную смесь наносили на заранее подготовленные стандартным методом предметные стекла, с подложкой из 1%-ного раствора универсальной агарозы ($T_{пл} < 65^\circ\text{C}$). Затем смесь накрывали покровным стеклом (24×24 мм), и предметные стекла на 10 мин помещали в холодильник ($t = 4^\circ\text{C}$) для затвердевания геля. Все последующие операции проводили в темноте или при свете зеленой лампы. На охлажденные препараты наносили по 150 мкл холодного лизирующего раствора, содержащего 10 mM TrisHCl, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂ (pH 10), 1% Triton X-100 (95%, Helicon, Россия). Далее накрывали микропрепарат полоской герметизирующей пленки (Parafilm, Pechiney Plastic Packaging Company, США) и оставляли не менее чем на 1 ч в холодильнике ($t = 4^\circ\text{C}$). После лизиса стекла отмывали в PBS от лизирующего раствора, помещали в камеру для электро-

фореза COMPAC-50 (Cleaver Scientific, Великобритания), добавляли щелочной буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA- Na_2 , pH > 13) так, чтобы высота раствора над стеклами составила 1–2 мм, и оставляли на 20 мин без напряжения (при $t = 4^\circ\text{C}$). Электрофорез проводили при $t = 4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин при напряжении поля ~ 0.9 В/см и силе тока 500 мА. Использовали источник питания EPS-600 (C.B.S Scientific, США). После электрофореза стекла отмывали в PBS, помещали в кювету и заливали раствором для фиксации (70%-ный раствор этилового спирта). Фиксацию проводили в течение 15 мин. Микропрепараты высушивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Готовили по два препарата от каждого животного. Препараты шифровали, окрашивали 0.1%-ным раствором SYBR Green I (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин, а затем фотографировали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой CCD-камеры QIClick с программой QCapture Pro 7 (QImaging, США). Полученные изображения анализировали с помощью программы TriTreck CometScore™ Freeware v1.5 (TriTek, США). Объем проанализированного материала составил не менее 403 ядер клеток гиппокампа на каждое животное ($M \pm SEM = 418 \pm 3.3$). Для костного мозга аналогичная величина составила не менее 128 ядер на животное. Низкое качество нескольких препаратов (для одного животного было проанализировано всего 91 ядро) увеличило вариабельность. Тем не менее среднее количество ядер костного мозга на одно животное составило 330 ± 54 . Общее количество проанализированных ядер составило 6694 (для клеток гиппокампа) и 5129 (для клеток костного мозга).

В качестве показателя степени поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвостах комет (% of tDNA).

Анализ нарушений митоза

Для изучения влияния стресса на делящиеся клетки костного мозга 33 самца линии СВА и 18 самцов линии СЗН разделили на три группы: одну контрольную и две экспериментальные, которые были подвергнуты двухчасовому воздействию ДМП или иммобилизации по описанным выше методикам. Самцов линии СВА (всего в двух повторностях эксперимента было 2 контрольных группы по 5 животных, 2 группы (5 и 6 животных соответственно), подвергнутых иммобилизации и 2 группы (по 5 и 7 животных соответственно), на которых воздействовали ДМП, и всех самцов линии СЗН (по 6 животных в каждой группе) через 22 ч после окончания воздействия умерщвляли методом цервикальной дислокации, извлекали костный мозг из бедренных костей и фиксировали в фиксаторе Кларка (3 части этанола : 1 часть ледяной уксусной кислоты).

В дальнейшем из этого материала готовили давленные препараты, окрашенные ацетоорсеином (2%), для цитогенетического анализа ана-телофазным методом. Анализировали частоту митотических нарушений (не менее 200 делящихся клеток на животное), в том числе структурные хромосомные aberrации и нарушения расхождения хромосом по описанной ранее методике [13].

Иммунофлуоресценция

Еще 19 самцов линии СВА разделили на три группы, две из которых подвергли двухчасовому воздействию ДМП или иммобилизации (8 и 5 животных соответственно), а одну (6 животных) оставили интактной. Животных умерщвляли сразу после окончания воздействия, извлекали костный мозг и готовили суспензию клеток, которую использовали для иммуноцитохимического окрашивания антителами к γH2AX гистону по стандартной методике с небольшими модификациями [17].

Клетки фиксировали в течение 5 мин 3%-ным параформальдегидом при комнатной температуре на предметных стеклах, пермеабилizировали 0.2%-ным Triton X-100 (Helicon, Россия) в течение 20 мин и блокировали 1%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA) (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 20 мин при 37°C во влажной инкубационной камере. Затем предметные стекла инкубировали с кроличьими антителами против фосфо-H2AX (Ser 139) (#9719, Cell Signaling Technology, США, 1 : 400) в 1%-ном BSA в PBS в течение 45 мин при 37°C в инкубационном боксе. После этого клетки окрашивали раствором, содержащим DAPI+antifade (Sigma-Aldrich, США), и визуализировали в микроскопе Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ частоты клеток с фокусами проводили в случайных областях с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Анализировали не менее 200 клеток на мышь.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ GraphPad Prism 9.1.0 для Windows. Результаты щелочного кометного гель-электрофореза (данные процентного содержания ДНК в хвосте комет) всех животных объединяли в пределах каждого варианта. Затем полученные данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова—Смирнова, после чего анализировали межгрупповые различия критерием Краскела—Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Дополнительно проводили анализ типа распределения данных, который дает более полное представление об изучаемой характеристике материала, чем оценка отдельных выборочных показателей. Для этого вычисляли частоты клеток с разной степенью поврежденности (от 0 до 100% ДНК в хвостах комет с шагом в 2%), а затем определяли кривую, которая наилучшим образом описывает полученное распределение. Для нелинейной регрессии использовали метод наименьших квадратов. Оценку соответствия данных полученной модели и сравнение кривых (а также отдельных их параметров) для разных групп проводили с помощью критерия Фишера (F-теста). Ана-телофазным методом оценивали также частоты нарушений митоза в клетках костного мозга самцов мышей в каждой группе животных каждой линии. Для линии СВА было проведено две повторности эксперимента, и, поскольку различий между ними выявлено не было, данные объединили. Различия между вариантами определяли с помощью таблиц сопряженности точным критерием Фишера. Данные иммуноцитохимического анализа частоты клеток с фокусами γ H2AX подсчитывали для каждого животного отдельно, а затем объединяли полученные значения (проценты клеток с фокусами от общего числа проанализированных клеток) в пределах группы. Далее проводили проверку полученных распределений на нормальность с помощью критерия Колмогорова—Смирнова, после чего анализировали межгрупповые различия методом ANOVA с апостериорным тестом Тьюки. Результаты приведены в виде медиан, 1-го и 3-го квартилей, минимальных и максимальных значений (Q1, Me, Q3; Range: Min to Max; рис. 2, 4 и 6), средних и стандартных ошибок среднего ($M \pm SEM$; табл. 1 и 2). Приведены модельные кривые распределений частот средних значений (M , 95% CI; рис. 3 и 5), соответствующие реальным распределениям (степень соответствия (R^2) > 0.95).

Ввиду малого объема выборки для графика частот клеток с фокусами γ H2AX дополнительно приведены все индивидуальные значения (рис. 6).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показано, что стрессоры как психогенной, так и зоосоциальной природы увеличивают степень повреждения ДНК клеток гиппокампа у самцов мышей линии CD-1

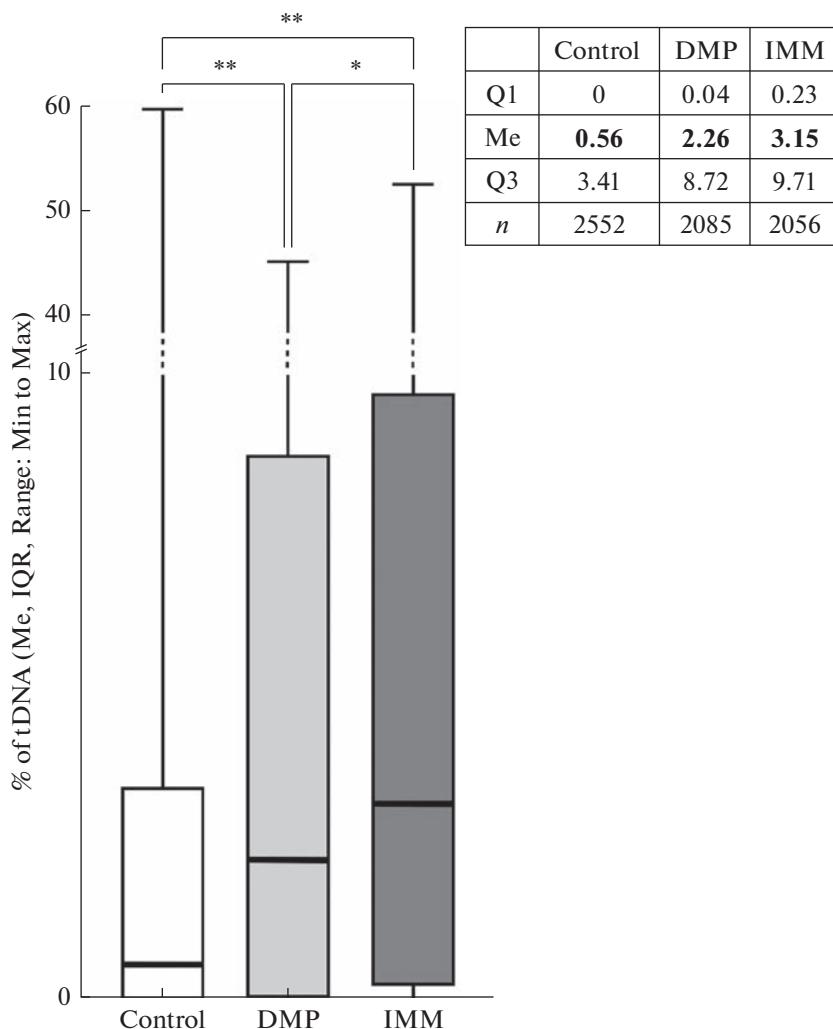


Рис. 2. Степень повреждения ДНК в клетках гиппокампа самцов мышей линии CD-1 после двухчасового воздействия: ольфакторного стрессора (DMP) или иммобилизации (IMM). Приведены точные значения медиан и границ второго и третьего квартилей. *n* — число проанализированных ядер; * и ** — различия достоверны (соответственно $p < 0.001$ или $p < 0.0001$, критерий Краскела—Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

(рис. 2). Так, двухчасовое воздействие ДМП увеличивает медианный уровень ДНК в хвостах комет в 4.1 раза, а двухчасовая иммобилизация в 5.7 раз (рис. 2).

Анализ типа распределения клеток гиппокампа по степени поврежденности выявил, что экспоненциальная кривая, описываемая уравнением $Y = (Y_0 - \text{Plateau})e^{(-KX)} + \text{Plateau}$, наилучшим образом подходит для данного распределения. Сравнение основных параметров экспоненциального распределения выявило достоверное уменьшение частоты неповрежденных клеток (Y_0) в обеих стрессированных группах по сравнению с контрольной (табл. 1). В то же время группа, подвергнутая иммобилизации,

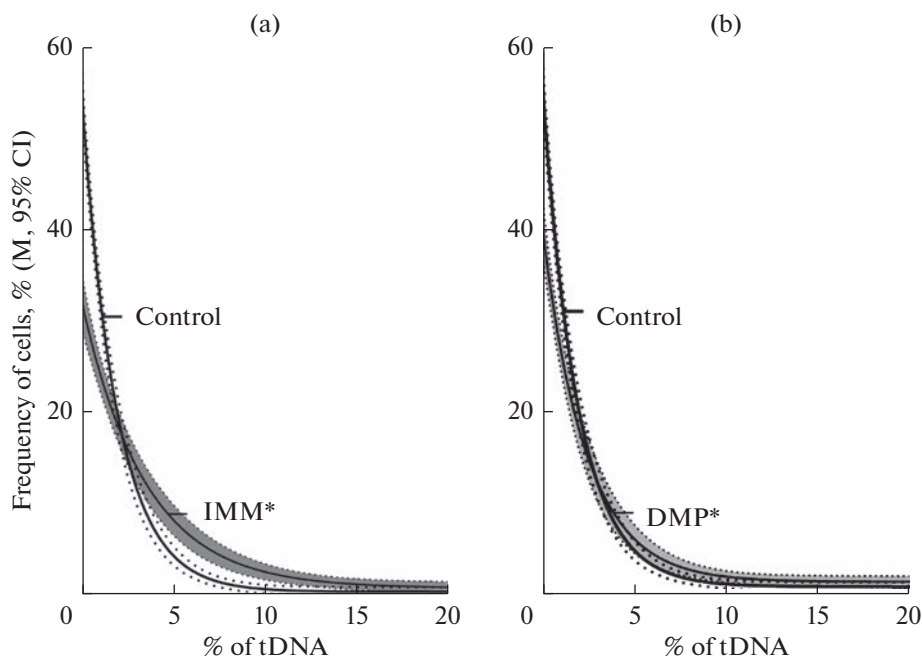


Рис. 3. Распределение частот клеток гиппокампа самцов мышей линии CD-1 после двухчасового воздействия: (а) – иммобилизации (IMM), (б) – ДМП (DMP). * – отличия от контроля достоверны ($p < 0.0001$, F-тест).

достоверно отличалась от группы, подвергнутой воздействию ДМП, не только по уменьшенному содержанию неповрежденных клеток (Y_0), но и по более медленной динамике падения частот клеток по мере возрастания уровня поврежденности (K , коэффициент наклона кривой) (табл. 1).

Визуальный анализ кривых демонстрирует, что частота неповрежденных клеток (с 0–2% ДНК в хвосте комет) меньше, а поврежденных клеток больше в группах, подвергнутых одному из типов стрессорного воздействия – иммобилизации (рис. 3а) или ДМП (рис. 3б).

Анализ цитогенетических нарушений в делящихся клетках костного мозга самцов мышей двух линий (СЗН и СВА) выявил увеличение частоты нарушений мито-

Таблица 1. Основные параметры экспоненциального распределения клеток гиппокампа самцов мышей линии CD-1 по степени содержания ДНК в хвостах комет после двухчасового стрессорного воздействия ДМП или иммобилизации (ИММ)

Вариант	Параметры распределения ($M \pm SEM$)		
	Y_0	Plateau	K
Контроль	55.5 ± 1.24	0.49 ± 0.24	0.52 ± 0.03
ДМП	39.8 ± 1.55^a	1.02 ± 0.31	0.42 ± 0.04
ИММ	$32.5 \pm 1.49^{a, б}$	0.89 ± 0.32	$0.29 \pm 0.03^{a, б}$

^a – отличие от контроля достоверно ($p < 0.0001$, F-тест), ^{б, в} – отличие от ДМП достоверно (^б – $p < 0.01$, ^в – $p < 0.05$, F-тест).

Таблица 2. Частота нарушений митоза (НМ) в клетках костного мозга самцов мышей линий СЗН и СВА после воздействия ДМП или иммобилизации (ИММ)

Вариант воздействия	<i>n</i>	Число проанализированных ана-телофаз:		Частота клеток с НМ (% , <i>M</i> ± <i>SEM</i>)	<i>p</i>
		нормальных	с НМ		
Линия СЗН					
Контроль	6	1200	32	2.60 ± 0.23	< 0.01*
ДМП	6	1200	60	4.76 ± 0.23	
ИММ	6	1200	54	4.31 ± 0.24	
Линия СВА					
Контроль	10	2000	61	2.96 ± 0.16	< 0.01*
ДМП	12	2400	114	4.53 ± 0.17	
ИММ	11	2200	102	4.43 ± 0.24	

* – точный критерий Фишера.

за через 22 ч после двухчасового стрессирования ДМП или иммобилизацией в 1.5–1.8 раз (табл. 2). Различий между разными типами воздействия и между мышами разных линий не выявлено.

Анализ ДНК-комет также показал двукратное увеличение степени поврежденности ДНК клеток костного мозга самцов мышей линии СВА после двухчасового стрессирования иммобилизацией или ДМП (рис. 4).

Анализ типа распределения клеток костного мозга по степени поврежденности ДНК выявил, что наилучшим образом кривые частот всех групп животных соответствуют распределению Лоренца, описываемого уравнением: $Y = \text{Amplitude} / (1 + ((X - \text{Center}) / \text{Width})^2)$.

Сопоставление основных параметров распределения клеток по степени поврежденности у стрессированных (как ДМП, так и иммобилизацией) животных показало их сходные отличия от контрольных показателей (табл. 3). Только Амплитуда была ниже у феромонально стрессированных животных, по сравнению с подвергнутыми иммобилизации. Это, по-видимому, связано с несколько более высокой частотой неповрежденных клеток у животных, стрессированных ДМП.

Визуальное сравнение полученных кривых демонстрирует у стрессированных групп животных уменьшение частоты неповрежденных клеток и возрастание частот поврежденных клеток на всех интервалах значений содержания ДНК в хвостах комет (рис. 5). Распределение данных повторности, проведенной ранее, лучше соответствовало другой модельной кривой [14]. Несколько большая разрушенность анализируемых клеток, по-видимому, связана с сезонными или иными различиями при проведении повторности через несколько лет. Тем не менее, выявленные и там, и там эффекты дестабилизации генома хорошо сопоставимы.

Также анализировали другой показатель повреждения ДНК в клетках костного мозга при стрессе – частоту клеток с фокусами γH2AX – маркера двунитевых разрывов (рис. 6).

Показано, что двухчасовое воздействие ДМП вызывает достоверное увеличение средней частоты клеток костного мозга с фокусами γH2AX гистонов в 1.7 раз, в то время как двухчасовая иммобилизация вызывает увеличение этого показателя

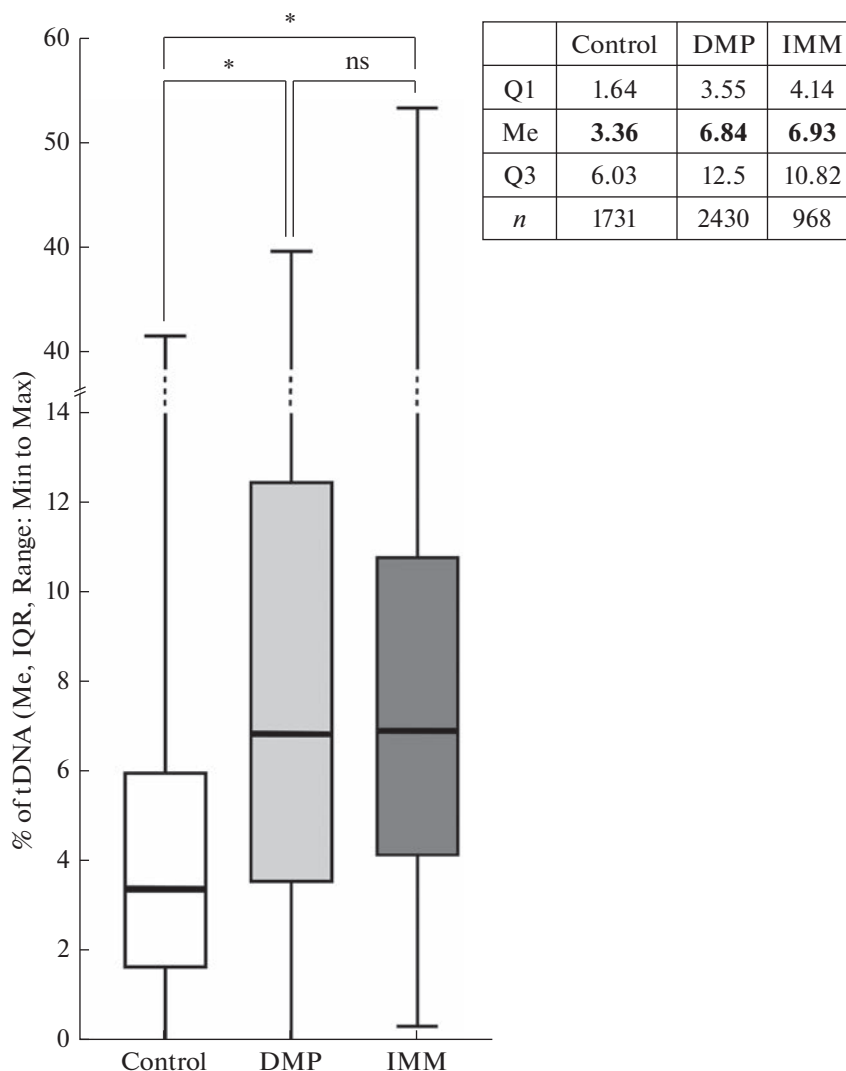


Рис. 4. Степень повреждения ДНК в клетках костного мозга самцов мышей линии СВА после двухчасового воздействия ольфакторного хемосигнала (DMP) или иммобилизации (IMM). Приведены точные значения медиан и границ второго и третьего квартилей. *n* – число проанализированных ядер; * – различия достоверны ($p < 0.0001$, критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна); ns – различия не достоверны (not significant, $p > 0.05$).

лишь в 1.2 раза, что оказалось недостаточно для достоверных отличий от контрольного уровня (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разные по своей природе воздействия вызывают дестабилизацию (и даже дезинтеграцию) генома клеток гиппокампа, костного мозга и, как было ранее показано, семенников [14]. Таким образом, повреждение ДНК является неспецифическим

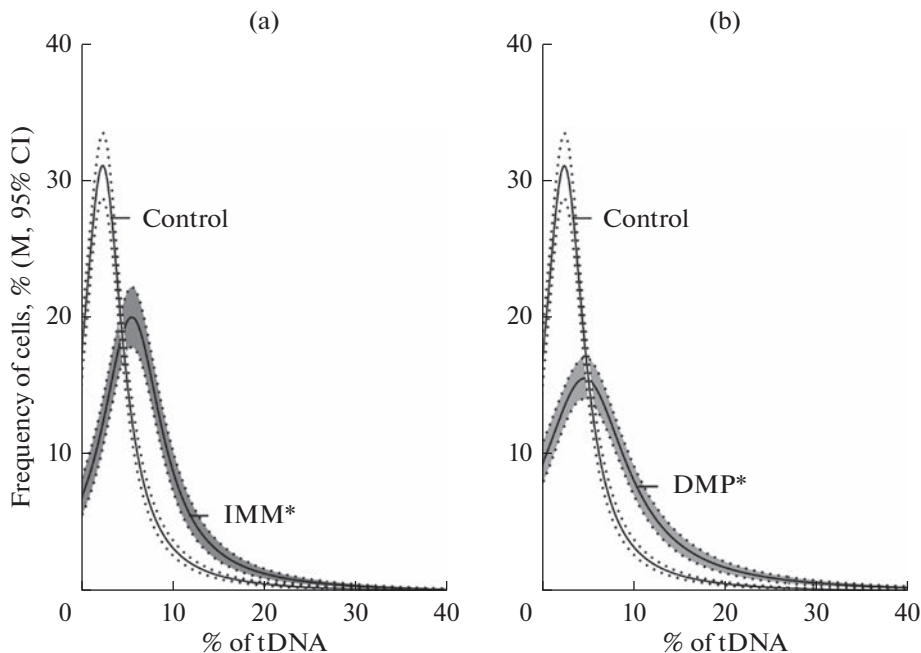


Рис. 5. Распределение частот клеток костного мозга самцов мышей линии СВА после двухчасового стрессорного воздействия: (а) — иммобилизации (ИММ), (б) — ДМП (ДМП). * — достоверные отличия от контроля ($p < 0.0001$, F-тест).

(как по отношению к природе стрессора, так и по отношению к типу клеток и органов-мишеней) и может служить маркером развития стресс-реакции. Гиппокамп участвует не только в формировании организменного ответа на стрессорное воздействие, но и сам является мишенью для стрессоров различной природы. Тем самым ЦНС не только воспринимает изменения факторов окружающей среды, но и позволяет разным клеткам многоклеточного организма согласованно реагировать на эти изменения и адаптироваться. Физиологическими путями, опосредующими действие стрессоров на периферийные органы, являются активация оси гипоталамус—гипофиз—надпочечники и секреция глюкокортикоидов и катехоламинов. По-

Таблица 3. Основные параметры распределения клеток костного мозга самцов мышей линии СВА (распределение Лоренца) по степени содержания ДНК в хвостах комет после двухчасового стрессорного воздействия ДМП или иммобилизации (ИММ)

Вариант	Параметры распределения ($M \pm SEM$)		
	амплитуда	центр	ширина
Контроль	31.2 ± 1.15	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.16
ДМП	15.7 ± 0.74^a	4.8 ± 0.29^a	5.7 ± 0.46^a
ИММ	$20.1 \pm 1.07^{a, б}$	5.8 ± 0.21^a	4.0 ± 0.33^a

^a — отличие от контроля достоверно ($p < 0.0001$, F-тест), ^б — отличие от ДМП достоверно ($p < 0.01$, F-тест).

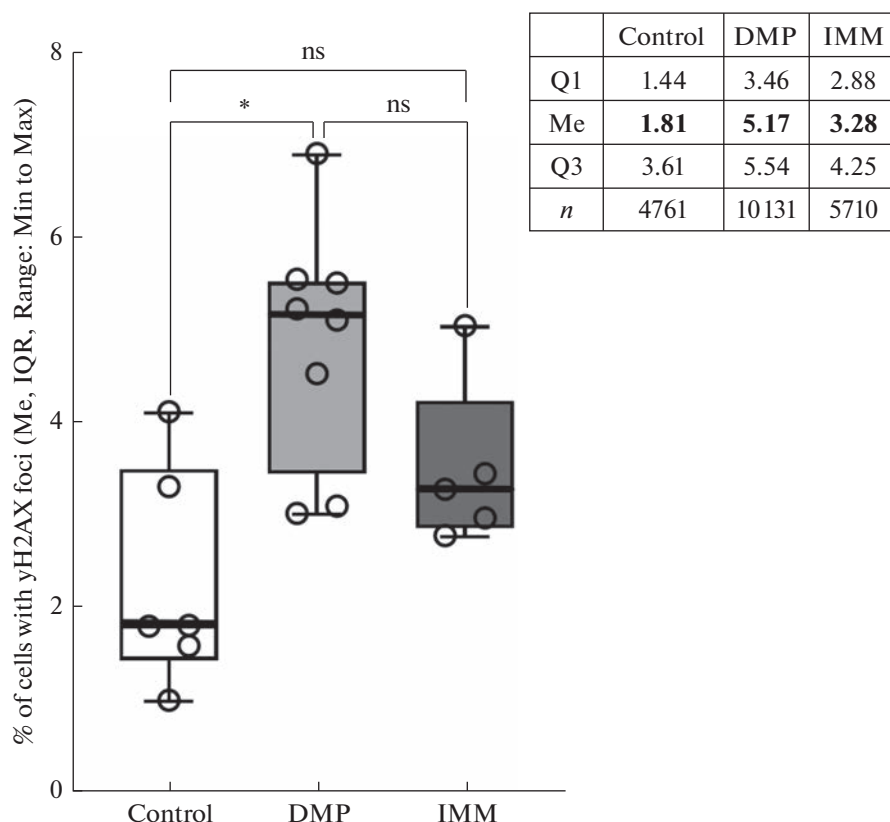


Рис. 6. Частоты клеток костного мозга с фокусами γ H2AX гистонов у самцов мышей линии СВА после двухчасового воздействия ДМП (DMP) или иммобилизации (IMM). Приведены индивидуальные значения частот γ H2AX-позитивных клеток для каждого животного, а также медианы и границы второго и третьего квартилей для каждой экспериментальной группы. *n* — число проанализированных ядер; * — отличия достоверны ($p < 0.01$, ANOVA с апостериорным тестом Тьюки); ns — not significant ($p > 0.05$).

казано, что применение блокаторов каждого из этих путей приводит к снижению частоты нарушений митоза в делящихся клетках костного мозга самцов мышей, индуцируемых как иммобилизацией, так и ДМП [18].

В статье Sannino и соавт. обсуждаются позитивные эффекты острого стресс-воздействия — одночасовой иммобилизации [19, 20]. Авторы говорят об усилении адаптивных форм поведения, улучшении памяти и иммунного ответа, повышении способности отвечать на внешние воздействия и других преимуществах. Правда, они говорят о кратковременности защиты выброса стресс-медиаторов. Транскриптомный анализ клеток гиппокампа показал, что кратковременная иммобилизация изменяет характер экспрессии генов уже через три часа после окончания стрессирования. Биоинформатический анализ (GO и ToppGene Suite) выявил насыщенность изменениями в канонических сигнальных путях нейрогенеза и когнитивных функций. Из полученных данных делается вывод об активации генов нейрогенеза и защиты от оксидативного стресса, противодействующих повреждению ДНК. Таким образом, исследование поддерживает гипотезу о позитивном влиянии краткосрочной иммобилизации на гиппокамп и на сохранение в

нем нейронов [19]. Однако в быстро эволюционирующей области гено-онтологического анализа некоторые авторы отмечают сильную предвзятость аннотаций и низкую согласованность результатов между ранними и более поздними версиями GO. Поэтому они призывают к особой осторожности при интерпретации получаемых результатов [21]. Именно в данном случае это кажется важным, так как необходимость любого живого организма использовать дополнительные неспецифические средства защиты от внешних стрессоров говорит о перерасходе ресурсов организма и, в конечном итоге, ведет к снижению жизнеспособности клетки, органа и всего организма.

Гиппокамп довольно сложная структура, представленная разными типами клеток. Транскриптомный анализ (RNA-seq) выявляет специфику экспрессии, связанную как с дифференцированностью клеток, так и с их расположением вдоль дорзо-вентральной оси. При этом специфика касается многих генов, контролируемых, в том числе, клеточную адгезию и направленность аксонального роста. Градиенты экспрессии этих генов могут определять план формирования нейронных сетей в процессе развития, а также позднее поддерживать региональную специфичность отделов гиппокампа [22]. Структурная нестабильность генома клеток гиппокампа, вызванная действием стрессоров у самцов домового мыши, не может не отразиться на его функциональной активности и процессах нейрогенеза, что приведет к многочисленным последствиям как на клеточном, так и на организменном, в том числе поведенческом, уровнях. Показано, что нарушение нейрогенеза в клетках гиппокампа ведет к нарушению долговременной потенциации, специфических форм обучения и памяти [23, 24].

Показано, что иммобилизационный стресс проявляется в изменении активности митохондриальных генов в гиппокампальных клетках крыс [25]. Митохондрии в клетках многоклеточного организма, отвечающих на действие стрессоров, являются одновременно и мишенями, и медиаторами развития патофизиологической стресс-реакции [26].

В работе Malvandi, Moghimi показано, что двухчасовая иммобилизация самцов мышей линии BALB/c приводит к более чем четырехкратному повышению винбластин-индуцированного образования микроядер в клетках костного мозга при фиксации через 24 ч после стрессирования по сравнению с эффектом только винбластиновой инъекции [27]. Влияния самой иммобилизации выявлено не было, хотя уровень микроядер в полихроматических эритроцитах был повышен в 1.7 раза. Обращает на себя внимание величина *SEM* ($\approx 60\%$ от величины среднего), которая в группе только стрессированных животных была почти в 8 раз выше, чем у контрольных животных. Это может свидетельствовать о выявлении скрытой фенотипической изменчивости после воздействия стрессора. В нашей работе наблюдали повышение частоты хромосомных aberrаций, выявляемых ана-телофазным методом, после двухчасовой иммобилизации в 1.7 раза, что хорошо согласуется с данными других исследователей [27].

Как в полевых, так и в лабораторных исследованиях на различных животных было показано, что увеличение плотности популяции позитивно коррелирует с уровнем глюкокортикоидов, и отрицательно коррелирует с размером тела, иммунной и репродуктивной функциями [28]. В нашем исследовании показано, что даже краткого ольфакторного воздействия на мышей феромоном, выделяемым самками только в условиях переуплотненного содержания, достаточно для дестабилизации генома клеток целого ряда органов, что не может не сказываться на их функционировании. ДМП, являясь аверсивным сигналом, неспецифично тормозит половое созревание молодых особей, влияет на гормональный статус реципиентов, повышает уровень хромосомных aberrаций в митотически и мейотически делящихся клетках [13]. При этом, дестабилизируя геном клеток-мишеней в стрессовых усло-

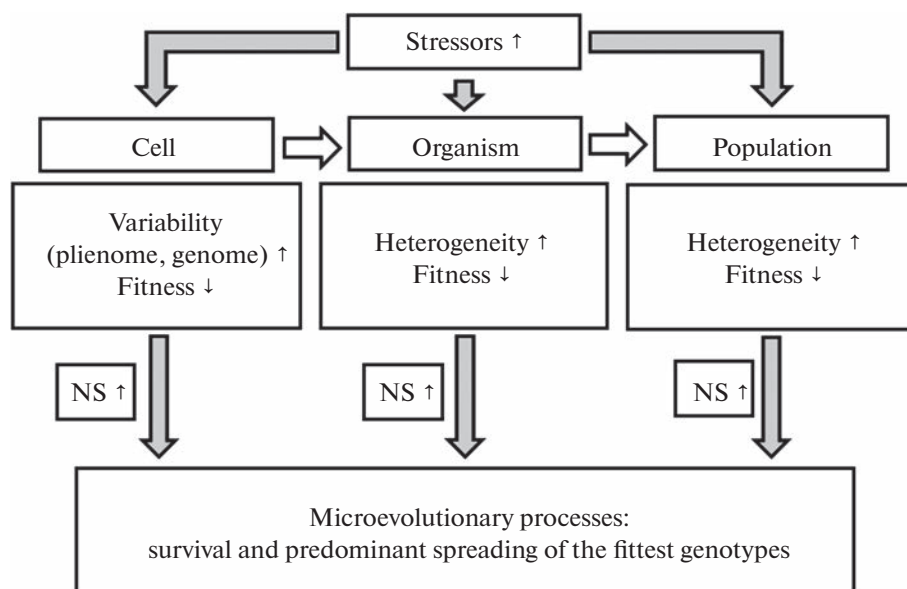


Рис. 7. Схематичное представление о роли стресса в регуляции микроэволюционных процессов. NS — natural selection (естественный отбор). Направление стрелок отмечает усиление или ослабление соответствующей характеристики.

виях, он, очевидно, снижает общую приспособленность реципиентов, но одновременно повышает генетическую гетерогенность как соматических, так и половых клеток [14]. Появление подобного стрессора при повышении плотности популяций можно рассматривать как один из естественных внутривидовых механизмов регуляции “волн жизни” в популяциях этого вида грызунов. При этом дестабилизация генома в половых клетках может вести к ускорению микроэволюционных преобразований за счет отбора наиболее приспособленных генотипов на фоне создаваемой стрессами генетической изменчивости. Хочется также отметить, что, если дестабилизирующее действие двух стрессоров (иммобилизации и ДМП) на геном клеток костного мозга практически одинаково, что показано здесь и ранее [14], то в клетках семенников эффект ДМП выражен сильнее [14]. Это согласуется с представлениями о феромональных механизмах регуляции репродукции у грызунов [29].

Таким образом, действие различных стрессоров часто сходится в “узловых” чувствительных точках, которые связаны с репликативным стрессом, структурной организацией хроматина и хромосомной нестабильностью [30]. Представления о влиянии стрессовых условий на структурные перестройки генома, опосредованные через активацию подвижных элементов генома, давно обсуждаются и продолжают обсуждаться исследователями [31, 32]. Еще в 1981 г., основываясь на данных своей лаборатории, Л.З. Кайданов писал: “... есть все основания полагать, что в некоторых ситуациях ...происходит адаптивное возрастание темпов мутационной изменчивости. Такое положение может складываться в ... популяциях, попадающих в экстремальные условия (*стрессовые* — прим. авторов). ... Можно допустить, что имеется связь этих процессов (*накопление мутаций* — прим. авторов) с неслучайным перемещением мобильных диспергированных генов (*по сути — транспозонов* (*transposable elements*) — прим. авторов) ...” [33].

Полученные в нашем исследовании данные хорошо согласуются с представлениями ряда исследователей о связи стресс-реакции организма с возрастанием генетической изменчивости и ее роли в микроэволюционных преобразованиях [34]. Краткосрочные стрессорные воздействия (иммобилизацией и феромоном) на самцов мышей показали, что геномы клеток гиппокампа и костного мозга являются мишенями стрессорных воздействий.

Сопоставляя результаты с полученными ранее данными [13], можно полагать, что стрессоры, действуя на различных уровнях (клеточном, организменном и даже популяционном), за счет нарушения работы и целостности генома клеток по крайней мере некоторых жизненно важных органов, приводят к возрастанию гетерогенности, но снижению выживаемости как отдельных организмов, так и целых групп. Это позволяет популяции адаптироваться к изменению условий окружающей среды за счет дифференциального выживания и размножения особей с наиболее приспособленными (в том числе возникшими *de novo*) генотипами (рис. 7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета СПбГУ по работе с лабораторными животными (заключение № 131-03-1 от 01.06.2017 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00678.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Авторы благодарны А.А. Бондаренко и другим студентам и сотрудникам кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, помогавшим в проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.В.Д.), сбор данных (В.Д.Ш., Б.В.Б., Т.С.Г.), анализ и обработка данных (В.Д.Ш., Б.В.Б.), написание и редактирование манускрипта (Е.В.Д., В.Д.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anand KS, Dhikav V (2012) Hippocampus in health and disease: An overview. Ann Indian Acad Neurol 15: 239–246.
<https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
2. Goldfarb EV, Rosenberg MD, Seo D, Constable RT, Sinha R (2020) Hippocampal seed connectome-based modeling predicts the feeling of stress. Nat Commun 11: 2650.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16492-2>
3. Youssef MM, Hamada HT, Lai ESK, Kiyama Y, El-Tabbal M, Kiyonari H, Nakano K, Kuhn B, Yamamoto T (2022) TOB is an effector of the hippocampus-mediated acute stress response. Transl Psychiatry 12: 302.
<https://doi.org/10.1038/s41398-022-02078-7>

4. Love J, Zelikowsky M (2020) Stress Varies Along the Social Density Continuum. *Front Syst Neurosci* 14: 582985.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.582985>
5. Conrad CD, Magariños AM, LeDoux JE, McEwen BS (1999) Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci* 113: 902–913.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.5.902>
6. Ortiz JB, Conrad CD (2018) The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? *Front Neuroendocrinol* 49: 114–123.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.005>
7. Levone BR, Cryan JF, O’Leary OF (2015) Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiol Stress* 1: 147–155.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.003>
8. Poller WC, Downey J, Mooslechner AA, Khan N, Li L, Chan CT, McAlpine CS, Xu C, Kahles F, He S, Janssen H, Mindur JE, Singh S, Kiss MG, Alonso-Herranz L, Iwamoto Y, Kohler RH, Wong LP, Chetal K, Russo SJ, Sadreyev RI, Weissleder R, Nahrendorf M, Frenette PS, Divangahi M, Swirski FK (2022) Brain motor and fear circuits regulate leukocytes during acute stress. *Nature* 607: 578–584.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04890-z>
9. Rentscher KE, Carroll JE, Polsky LR, Lamkin DM (2022) Chronic stress increases transcriptomic indicators of biological aging in mouse bone marrow leukocytes. *BBI – Health* 22: 100461.
<https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100461>
10. Duric V, Clayton S, Leong ML, Yuan LL (2016) Comorbidity Factors and Brain Mechanisms Linking Chronic Stress and Systemic Illness. *Neural Plast* 2016: 5460732.
<https://doi.org/10.1155/2016/5460732>. Epub 2016 Feb 8
11. Novotny MV, Ma W, Zidek L, Daev E (1999) Recent Biochemical Insights into Puberty Acceleration, Estrus Induction, and Puberty Delay in the House Mouse. In: Johnston RE, Müller-Schwarze D, Sorensen PW (eds) *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. Springer. Boston. MA.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4733-4_7
12. Koyama S (2004) Primer effects by conspecific odors in house mice: a new perspective in the study of primer effects on reproductive activities. *Hormones and Behavior* 46: 303–310.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.002>
13. Даев ЕВ (2011) Генетические эффекты ольфакторного стресса: исследования на домашней мыши. Saarbrücken. Germany: Lambert Acad Publ. [Daev EV (2011) Genetic effects of olfactory stress: house mouse studies. Lambert Acad Publ. Saarbrücken. Germany. (In Russ)].
14. Shcherbinina VD, Petrova MV, Glinin TS, Daev EV (2021) Genotoxic effect of restraint and stress pheromone on somatic and germ cells of mouse males *Mus musculus* L. *Ecol Genetics* 19: 169–179.
<https://doi.org/10.17816/ecogen65208>
15. Higashimoto M, Isoyama N, Ishibashi S, Ogawa N, Takiguchi M, Suzuki S, Ohnishi Y, Sato M (2013) Preventive effects of metallothionein against DNA and lipid metabolic damages in dyslipidemic mice under repeated mild stress. *J Med Invest* 60: 240–248.
<https://doi.org/10.2152/jmi.60.240>
16. Дурнев АД, Жанатаев АК, Анисина ЕА, Сиднева ЕС, Никитина ВА, Оганесянц ЛА, Середин СБ, Бекиш ВЯ, Чернуха ИМ (2006) Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Метод рекомендации. Москва. [Durnev AD, Zhanataev AK, Anisina EA, Sidneva ES, Nikitina VA, Oganesyants LA, Seredin SB, Bekish VYA, Chernukha IM (2006) Application of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds: Guidelines. Moscow. (In Russ)].
17. Dhawan A, Bajpayee M (eds.) (2019) *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols MIMB* 2031.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9>
18. Глинин ТС (2018) Пути стабилизации и дестабилизации генома клеток костного мозга мыши при действии ольфакторных хемосигналов. Дис. ... канд. биол. наук, СПбГУ, Санкт-Петербург [Glynin TS (2018) Pathways of stabilization and destabilization of bone marrow cell genome under olfactory chemosignals action in mice. PhD thesis in Biology, SPBU, Saint-Petersburg. (In Russ)].
19. Sannino G, Pasqualini L, Ricciardelli E, Montilla P, Soverchia L, Ruggeri B, Falcinelli S, Renzi A, Ludka C, Kirchner T, Grünwald TG, Ciccocioppo R, Ubaldi M, Hardiman G (2016) Acute stress enhances the expression of neuroprotection- and neurogenesis-associated genes in the hippocampus of a mouse restraint model. *Oncotarget* 7: 8455–8465.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7225>

20. Ubaldi M, Ricciardelli E, Pasqualini L, Sannino G, Soverchia L, Ruggeri B, Falcinelli S, Renzi A, Ludka C, Ciccocioppo R, Hardiman G (2015) Biomarkers of hippocampal gene expression in a mouse restraint chronic stress model. *Pharmacogenomics* 16: 471–482.
<https://doi.org/10.2217/pgs.15.3>
21. Tomczak A, Mortensen JM, Winnenburger R, Liu C, Alessi DT, Swamy V, Vallania F, Lofgren S, Haynes W, Shah NH, Musen MA, Khatri P (2018) Interpretation of biological experiments changes with evolution of the Gene Ontology and its annotations. *Sci Rep* 8: 5115.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23395-2>
22. Cembrowski MS, Wang L, Sugino K, Shields BC, Spruston N (2016) Hipposeq: a comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons. *eLife* 5: e14997.
<https://doi.org/10.7554/eLife.14997>
23. Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17501–17506.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607207103>
24. Leuner B, Gould E (2010) Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annu Rev Psychol* 61: 111–140.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100359>
25. Hunter RG, Seligsohn M, Rubin TG, Griffiths BB, Ozdemir Y, Pfaff DW, Datson NA, McEwen BS (2016) Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene expression via the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 9099–9104.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1602185113>
26. Picard M, McEwen BS (2018) Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. *Psychosom Med* 80: 141–153.
<https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000545>
27. Malvandi AM, Haddad F, Moghimi A (2010) Acute restraint stress increases the frequency of vinblastine-induced micronuclei in mouse bone marrow cells. *Stress* 13: 276–280.
<https://doi.org/10.3109/10253890903296710>
28. Newman AEM, Edmunds NB, Ferraro S, Heffell Q, Merritt GM, Pakkala JJ, Schilling CR, Schorino S (2015). Using ecology to inform physiology studies: implications of high population density in the laboratory. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R449–R454.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00328.2014>
29. Bronson FH (1979) The reproductive ecology of the house mouse. *Q Rev Biol* 54: 265–299.
<https://doi.org/10.1086/411295>
30. Wilhelm T, Said M, Naim V (2020) DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. *Genes (Basel)* 11: 642.
<https://doi.org/10.3390/genes11060642>
31. Maldung A, Comai L (2004) The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure. *Ann Bot* 94: 481–495.
<https://doi.org/10.1093/aob/mch172>
32. Dumoulin O (2021) The Role of Stress in the Spread of Transposable Elements. *MSURJ* 16: 67–73.
<https://doi.org/10.26443/msurj.v16i1.63>
33. Кайданов ЛЗ (1981) Об адаптивном значении скорости мутационного процесса. Исследования по генетике. 9: 105–112. [Kaidanov LZ (1981) On the adaptive value of the rate of the mutation process. *Res Genet* 9: 105–112. (In Russ)].
34. Hoffmann AA, Hercus MJ (2000) Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* 50: 217–226.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0217:esaef\]2.3.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0217:esaef]2.3.co;2)

Genome Instability of Hippocampal and Bone Marrow Cells in Male Mice after the Action of Immobilization and Pheromonal Stressor

V. D. Shcherbinina^{a, b}, B. V. Bakulevskiy^a, T. S. Glinin^a, and E. V. Daev^{a, b, *}

^aSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

^bPavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: mouse_gene@mail.ru

Different stressors, affecting the cells of target organs, can lead to genomic instability and even disintegration, which can play a role in the formation of post-stress pathologies. We studied the effect of psycho-emotional stressors (immobilization and mouse

stress pheromone – 2,5-dimethylpyrazine) on the DNA integrity of hippocampal and bone marrow cell in male mice of CD1, CBA and C3H strains. Cytogenetic and immunocytochemical methods (alkaline comet assay, ana-telophase analysis of mitotic disturbances and analysis of γ H2AX foci) were used. It is shown that the classic mouse stressor (immobilization or restraint), similar as 2,5-dimethylpyrazine, damages the genome of the cells of both organs studied. The destabilization of the cell genome of various organs is considered as an essential stage in the development of a stress response, which is an attempt of the organism to adapt to extreme environmental influences.

Keywords: restraint and pheromonal stress, hippocampus, bone marrow, genome instability, comet assay, mitotic abnormalities, γ H2AX foci