

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 3
март
2023



СО Д Е Р Ж А Н И Е

Обзорные и проблемные статьи

Ожирение и старение. Общие аспекты

Ю. А. Дылева, Е. В. Белик, О. В. Груздева

267

Экспериментальные статьи

Нейрофизиологические предпосылки временного анализа звука нейронами слухового центра среднего мозга мыши (*Mus musculus*)

Г. Д. Хорунжий, М. А. Егорова

283

Аргининдеминаза пиогенного стрептококка М49-16 нарушает структуру актинового цитоскелета и конфлюэнтность монослоя в культуре эндотелиальных клеток

*Дж. Т. Маммедова, А. Б. Карасева, Л. А. Бурова, А. В. Соколов,
Д. А. Переплетчикова, А. Б. Малашичева, Э. А. Старикова*

300

Эффекты вспомогательных репродуктивных технологий на социальное поведение мышей линии ВТВР – модели расстройств аутистического спектра

*И. Н. Рожкова, С. В. Окотруб, Е. Ю. Брусенцев, Т. Н. Игонина,
Т. А. Рахманова, Д. А. Лебедева, Т. А. Яцук, В. С. Козенева,
В. А. Напримеров, С. Я. Амстиславский*

315

Роль супероксидного радикала в регуляции функции K_v -каналов коронарных сосудов при посттравматическом стрессовом расстройстве

С. С. Лазуко, Л. Е. Беляева, О. П. Кужель

334

Нейробиологические эффекты комбинированного действия антиортостатического вывешивания, квазихронического гамма-излучения и ионов углерода у крыс

*А. А. Перевезенцев, К. Б. Лебедева-Георгиевская, О. С. Кузнецова,
В. С. Кудрин, В. А. Пикалов, А. С. Штемберг*

348

Влияние глюкозы на транспорт воды в клетках перитонеального мезотелия крыс

Г. С. Батурина, Л. Е. Каткова, Е. И. Соленов

366

Иммунный ответ на введение фибриллогенного белка $\beta 2$ -микроглобулина, конъюгированного с различными типами полимерных частиц

*Р. Г. Сахабеев, Д. С. Поляков, Е. С. Сеницына, Е. Г. Коржикова-Влах,
В. А. Коржигов-Влах, М. М. Шавловский*

375

Анализ элементного состав гонад, половых продуктов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* в период нереста

Л. Л. Капанова, В. И. Рябушко, С. В. Капанов

386

CONTENTS

Reviews

- Obesity and Aging. General Aspects
Yu. A. Dyleva, E. V. Belik, and O. V. Gruzdeva 267
-

Experimental Articles

- Neurophysiological Approaches for Temporal Sound Analysis in the Mouse Auditory Midbrain Neurons
G. D. Khorunzhii and M. A. Egorova 283
- Arginine Deiminase of *Streptococcus pyogenes* M49-16 Disrupts the Confluence of the Monolayer and the Structure of the Actin Cytoskeleton of Endothelial Cells *In Vitro*
J. T. Mammedova, A. B. Karaseva, L. A. Burova, A. V. Sokolov, D. A. Perepletchikova, A. B. Malashicheva, and E. A. Starikova 300
- Effects of Assisted Reproductive Technologies on Social Behavior of BTBR Mice – A Model of Autism Spectrum Disorder
I. N. Rozhkova, S. V. Okotrub, E. Yu. Brusentsev, T. N. Igonina, T. A. Rakhmanova, D. A. Lebedeva, T. A. Yatsuk, V. S. Kozeneva, V. A. Naprimerov, and S. Ya. Amstislavsky 315
- The Role of the Superoxide Radical in the Regulation of the K_V -Channels Function in the Coronary Vessels Following Posttraumatic Stress Disorder
S. S. Lazuko, L. E. Belyaeva, and O. P. Kuzhel 334
- Neurobiological Effects of Combined Exposure to Antiorthostatic Suspension, Quasi-Chronic Gamma Irradiation and Heavy Ion Irradiation in Rats
A. A. Perevezentsev, K. B. Lebedeva-Georgievskaya, O. S. Kuznetsova, V. S. Kudrin, V. A. Pikalov, and A. S. Shtemberg 348
- Effect of Glucose on Water Transport in Rat Peritoneal Mesothelium Cells
G. S. Baturina, L. E. Katkova, and E. I. Solenov 366
- Immune Response to the Introduction of Fibrillogenic β 2-Microglobulin Protein Conjugated with Different Types of Polymer Particles
R. G. Sakhabeev, D. S. Polyakov, E. S. Sinitsyna, E. G. Korzhikova-Vlakh, V. A. Korzhikov-Vlakh, and M. M. Shavlovsky 375
- Analysis of the Elemental Composition of Gonads, Gametes and Larvae of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Spawning Period
L. L. Kapranova, V. I. Ryabushko, and S. V. Kapranov 386
-
-

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ
СТАТЬИ

ОЖИРЕНИЕ И СТАРЕНИЕ. ОБЩИЕ АСПЕКТЫ

© 2023 г. Ю. А. Дылева¹, *, Е. В. Белик¹, О. В. Груздева¹

¹Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, Россия

*E-mail: dyleva87@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.

После доработки 25.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Ожирение связано с повышенным риском развития острых и хронических заболеваний, включая гипертонию, инсульт, инфаркт миокарда, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, рак, и сокращает продолжительность жизни на срок до 20 лет, увеличивая риск преждевременной смерти. Показано, что метаболические изменения, связанные с ожирением, аналогичны наблюдаемым при старении. Так, ожирение и старение имеют сходный спектр фенотипов, таких как нарушение целостности генома, функции митохондрий, накопление внутриклеточных макромолекул, ослабление иммунитета, системное воспаление. Общность механизмов может лежать в основе ускорения процессов старения как на молекулярном, так и системном уровнях. Таким образом, понимание механизмов дисфункции жировой ткани при ожирении может дать представление о процессах, которые способствуют метаболической дисфункции, связанной с процессом старения. В данном обзоре будут рассмотрены молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе ожирения и старения, а также как ожирение способно активировать процессы старения, инициируя раннее начало хронических заболеваний, ассоциированных со старением.

Ключевые слова: старение, ожирение, жировая ткань

DOI: 10.31857/S0869813923030020, EDN: FSFIKC

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение и старение представляют собой две самые серьезные глобальные проблемы здравоохранения нашего времени. В настоящее время ожирением страдает более трети населения мира. Распространенность ожирения в 2017–2018 гг. среди лиц молодого возраста (20–39 лет), среднего возраста (40–59 лет) и пожилых людей (60 лет и старше) составила 40.0, 44.8 и 42.8% соответственно [1]. Ожидается, что к 2030 г. 57.8% взрослого населения планеты в возрасте ≥ 65 лет будут иметь избыточный вес или ожирение [2].

Как известно, ожирение ассоциировано с заболеваниями, манифестация которых сопряжена со старением. Лица с ожирением подвержены более высокому риску сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), артериальной гипертензии, сахарного диабета 2-го типа (СД2), онкопатологии. Вследствие этого ожирение ассоциировано со снижением ожидаемой продолжительности жизни. Так, по меньшей мере 2.8 миллиона человек ежегодно умирают от осложнений, связанных с ожирением [3]. Точно так же и дети с ожирением подвержены более высокому риску заболеваний, которые ранее наблюдались исключительно у взрослых. Учитывая, что ожирение

сокращает продолжительность жизни, а заболевания и состояния, связанные с ожирением, аналогичны наблюдаемым при старении, предполагается, что ожирение ускоряет процессы старения [2]. С точки зрения клеточной биологии ожирение связано с укорочением длины теломер на 240 теломерных повторов, что соответствует 8.8 годам старения. Кроме того, ожирение связано с ускорением процессов старения в различных тканях (ускорением эпигенетических часов) [4]. Таким образом, на сегодняшний день, очевидно, что заболевания, связанные с ожирением, сопряжены с ускоренными клеточными процессами, наблюдаемыми при нормальном старении.

В процессах старения и возрастной метаболической дисфункции жировая ткань (ЖТ) приобретает все большее значение. С возрастом ЖТ претерпевает значимые изменения с точки зрения распределения и состава ЖТ. Показано, что до 65 лет увеличивается общее содержание ЖТ и ее висцерального компонента (ВЖТ), а также эктопическое отложение ЖТ и снижение количества подкожной ЖТ (ПЖТ) [5]. С возрастом происходят и качественные изменения в ЖТ: снижается объем бурой ЖТ. Однако потенциальная роль структурно-функциональных изменений в ЖТ с возрастом до сих пор полностью не изучена. В то же время прогрессирующая дисфункция ЖТ может представлять собой важный признак процесса старения, поскольку ассоциирована с метаболическими изменениями, полиорганными повреждениями и системным воспалением, типичным для самого старения [6].

Ожирение и старение имеют сходный спектр патологических фенотипов — окислительно-восстановительный дисбаланс, митохондриальная дисфункция, накопление макромолекул, ослабленный иммунитет и системное воспаление, а ожирение, вероятно, ускоряет процессы старения на клеточном и системном уровне. В этой обзорной статье рассмотрены общие аспекты ожирения и старения с акцентом на механизмы, обуславливающие раннюю манифестацию хронических заболеваний при ожирении.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИРОВОЙ ТКАНИ. ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ОЖИРЕНИИ И СТАРЕНИИ

ЖТ организована в несколько депо, локализующихся в двух основных компартаментах: подкожное (ПЖТ) и висцеральное (ВЖТ), с различным клеточным составом и функциями, липолитической активностью, васкуляризацией и иннервацией. ЖТ состоит в основном из зрелых адипоцитов, хотя все жировые депо достаточно гетерогенны по клеточному составу. Помимо адипоцитов и преадипоцитов, популяция клеток представлена пероцитами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками, фибробластами, гемопоэтическими клетками-предшественниками, зрелыми иммунными клетками (В- и Т-лимфоциты, макрофаги, миелоидные клетки), а также мезенхимальными стволовыми клетками ЖТ. Все клетки составляют коммуникационную сеть, регулирующую функциональную активность ЖТ [7].

Адипоциты в свою очередь представлены белыми и коричневыми (или бурыми) адипоцитами, различающимися морфологически, что определяет их функции. Белые адипоциты более крупные с одной липидной каплей и меньшим количеством митохондрий. Эта морфология придает белым адипоцитам способность к накоплению и хранению липидов в форме триглицеридов и высвобождению свободных жирных кислот (СЖК) в периоды потребности организма в энергии. Белые адипоциты также синтезируют и секретируют адипокины, которые регулируют метаболический гомеостаз ЖТ [8]. Бурые (коричневые) адипоциты в основном характеризуются множественными липидными каплями и большим количеством митохондрий [8]. Основная их функция — термогенез (выделение тепла за счет рассеяния

свободной энергии при нефосфорилирующем (термогенном) окислении), при котором энергия не аккумулируется, а высвобождается в виде тепла. Этот механизм опосредуется термогенином (разобщающим белком-1, thermogenin, uncoupling protein 1, UCP-1), присутствующим во внутренней мембране митохондрий [9].

Белая ЖТ распределена в двух основных депо: белая висцеральная ЖТ (бВЖТ), которая включает сальниковую, мезентериальную, забрюшинную, гонадную, перикардальную белую ЖТ и белая подкожная ЖТ (бПЖТ). Однако каждое депо имеет свои особенности и метаболические функции [10]. В исследованиях *in vitro* показано, что адипоциты, выделенные из ВЖТ, имеют более высокий уровень синтеза липидов и липолиза по сравнению с адипоцитами ПЖТ. Преадипоциты ПЖТ и периваскулярные преадипоциты демонстрируют разный уровень экспрессии множества так называемых “генов развития”, участвующих в эмбриогенезе, образовании тканей и органов и путях дифференцировки, что подтверждает уникальную роль каждого депо в биологии ЖТ [11]. Увеличение размеров висцерального депо ЖТ ассоциировано с плохим прогнозом при метаболических заболеваниях [12]. С другой стороны, согласно результатам некоторых исследований, увеличение массы ПЖТ играет защитную роль и обратно пропорционально связано с инсулинорезистентностью и риском СД2 [13]. Однако фактически снижение накопления триглицеридов в ПЖТ приводит к увеличению отложения липидов в ВЖТ, что приводит к метаболическим осложнениям.

Локализация и количество бурой ЖТ (БЖТ) меняется на разных этапах жизни. БЖТ начинает формироваться во время гестации и играет решающую роль в терморегуляции на первых этапах жизни человека. У детей с первых дней жизни и до малолетнего возраста БЖТ преимущественно локализуется в шейно-надключичной области, периаортально в области грудной клетки и брюшной полости, в окологпочечной жировой клетчатке. У подростков и взрослых БЖТ располагается в основном в шейно-надключичной области, в подмышечной, медиастинальной, паравертебральной, эпикардальной и абдоминальной областях [14]. Однако метаболически активная БЖТ обнаруживается только примерно у половины подростков. Далее с возрастом количество БЖТ прогрессивно уменьшается. Периферические депо, такие как межлопаточное, первыми теряют объемы БЖТ с возрастом, в то время как более глубокие депо БЖТ, в частности периваскулярные или окологпочечные, уменьшаются на более поздних этапах жизни [15]. Кроме того, показано, что БЖТ в окологлопаточной области как у крыс, так и у людей с возрастом инфильтрируется белыми адипоцитами, а уровень белка UCP1 снижается [15, 16].

Третий тип адипоцитов, называемый бежевыми (коричнево-подобными белыми) или “индуцируемыми коричневыми” адипоцитами с промежуточной морфологией между белыми и коричневыми адипоцитами, впервые был описан в белой ЖТ мышцей, а затем обнаружены в различных депо белой ЖТ человека. Несмотря на сходство с коричневыми адипоцитами, бежевые адипоциты могут иметь термогенный фенотип или фенотип запасаения и хранения энергии в зависимости от условий окружающей среды [14].

Таким образом, каждое жировое депо играет свою уникальную роль в биологии ЖТ, а изменения в распределении ЖТ имеют важное значение в развитии метаболических нарушений.

В свою очередь, ожирение, как и старение, характеризуется увеличением массы ЖТ, в частности ВЖТ и является основным фактором нарушения обмена веществ и ассоциировано с развитием таких патологических состояний как ИР, СД2 и метаболический синдром [17, 18]. Пожилой возраст обычно сопровождается висцеральным ожирением, при котором клетки-предшественники адипоцитов (преадипоциты) имеют тенденцию терять свои специализированные характеристики, подвергаясь дедифференцировке и приобретают стареющий провоспалительный

фенотип, что приводит к увеличению продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и индукции воспаления ВЖТ [19].

Разрастание ЖТ при ожирении характеризуется гиперплазией адипоцитов (увеличение числа клеток) и гипертрофией (увеличением размера клеток), что приводит к развитию гипоксии в адипоцитах, нарушению регуляции обмена жирных кислот, увеличению секреции хемокинов, гибели адипоцитов и миграции провоспалительных клеток. Высвобождение провоспалительных цитокинов, опосредованное иммунными клетками, индуцирует сериновое фосфорилирование субстрата рецептора инсулина-1 (IRS-1), приводя к локальной и системной инсулинорезистентности, способствующей нарушению регуляции обмена глюкозы и жирных кислот [20]. Кроме того, ЖТ при ожирении может проявлять профиброзный фенотип, характеризующийся повышенной экспрессией белков внеклеточного матрикса, таких как коллаген, что также нарушает гомеостаз глюкозы и предрасполагает к метаболическим заболеваниям [10].

Показано, что снижение количества ВЖТ увеличивает продолжительность жизни. Так, например, хирургическое удаление ВЖТ у крыс повышает толерантность к глюкозе, снижает уровень триглицеридов в печени, увеличивает продолжительность жизни. Это говорит о том, что увеличение размеров ВЖТ является одним из основных факторов снижения ожидаемой продолжительности жизни при старении [21].

С возрастом происходит не только увеличение общего объема ЖТ и ее висцерального компонента, но и снижение количества подкожного жира за счет смещения накопления липидов из ПЖТ в ВЖТ [10]. Кроме того, ЖТ характеризуется эктопическим отложением в ключевых органах-мишенях, участвующих в нарушении функционирования сердечно-сосудистой системы. Одним из таких жировых депо является эпикардальная ЖТ (ЭЖТ) [22]. ЭЖТ представляет собой висцеральное депо, расположенное субэпикардиально вокруг обоих желудочков сердца, с различной протяженностью и характером распределения. Согласно многочисленным исследованиям, увеличение объема и толщины ЭЖТ является фактором риска ССЗ [24]. Отсутствие фасции между ЭЖТ и миокардом опосредует прямое воздействие факторов, продуцируемых адипоцитами и/или макрофагами, инфильтрирующими ЖТ на соседние кардиомиоциты посредством паракринного действия. Объем ЭЖТ, измеренный с помощью ультразвукового исследования, ассоциирован с количеством внутрибрюшной ВЖТ и признаками метаболического синдрома [23, 24]. Анализ толщины ЭЖТ среди лиц с общими сердечно-сосудистыми факторами риска показал, что толщина ЭЖТ у лиц пожилого возраста (76.1 ± 7.3 лет) значительно превышает показатели лиц молодого и среднего возраста (45.9 ± 10.3 лет). Результаты линейного регрессионного анализа свидетельствуют о статистически значимой ассоциации толщины ЭЖТ с возрастом, ожирением, дислипидемией, артериальной гипертензией и мужским полом [25]. Аналогично в других исследованиях показано, что ЭЖТ значительно увеличена у пациентов с ишемической болезнью сердца, и ее толщина коррелирует со стадией заболевания, возрастом, окружностью талии по данным множественной регрессии [26], а также ассоциирована с дисфункциональными изменениями адипоцитов этой локализации, характеризующимися повышенной экспрессией и секрецией проатерогенных адипоцитокинов (лептин, IL-6) и снижением антиатерогенного адипонектина [27].

Другое место депонирования ВЖТ – периваскулярная жировая ткань (ПВЖТ), окружающая сосуды различного диаметра (кроме капилляров, легочных и мозговых сосудов). ПВЖТ – уникальное жировое депо, отличающееся от других депо филогенетически. Адипоциты ПВЖТ имеют общее генетическое происхождение с гладкомышечными клетками, помимо этого могут дифференцироваться из таких предшественников, как клетки нервного гребня и других неидентифицированных

клеточных линий. Данная особенность объясняет фенотипические различия и гетерогенность ПВЖТ вдоль сосудистого дерева [28].

В настоящее время общепризнано, что ПВЖТ не просто выполняет функцию анатомической поддержки сосуда, но и благодаря своим пара- и эндокринным свойствам регулирует гомеостаз и функцию сосудов, оказывая как защитное, так и патологическое воздействие в зависимости от патофизиологической среды [29]. ПВЖТ обеспечивает паракринный обмен различными факторами с прилегающей сосудистой стенкой посредством передачи сигналов снаружи внутрь, модулируя таким образом тонус гладкомышечных клеток сосудов, пролиферацию и миграцию клеток. В норме ПВЖТ осуществляет антиконтрактильный эффект благодаря высвобождению расслабляющих факторов, таких как адипонектин, ангиотензин, H_2S , оксид азота (NO) и метиловые эфиры пальмитиновой кислоты [30]. Кроме того, адипоцитокины ПВЖТ (адипонектин, лептин, висфатин, оментин, хемерин и резистин) также оказывают влияние на тонус сосудов [31]. С возрастом, как и при ожирении, снижается антиконтрактильный эффект ПВЖТ, что способствует развитию сосудистой дисфункции при артериальной гипертензии. Воздействие провоспалительных и окислительных стимулов индуцирует дисфункциональные изменения в ЖТ, в результате чего ЖТ теряет свои вазопротекторные эффекты, меняя секреторный профиль на патологический с преобладанием продукции сократительных факторов и провоспалительных цитокинов и хемокинов [32]. ПВЖТ имеет структурные особенности в зависимости от локализации и неоднородна по соотношению белых и коричневых адипоцитов. Так, например, у грызунов грудная аорта окружена коричневыми адипоцитами, необходимыми для поддержания сосудистого гомеостаза и регуляции внутрисосудистой температуры, в то время как брюшная аорта как у грызунов, так и у человека содержит в основном белые адипоциты и меньшее количество коричневых адипоцитов [33].

Процессы ожирения и старения ассоциированы с морфологическими изменениями и функциональной активностью ПВЖТ. При ожирении объем ПВЖТ значительно увеличивается за счет гиперплазии и гипертрофии адипоцитов, меняется секреторный потенциал и фенотип адипоцитов на провоспалительный и прооксидантный [34]. У лиц с ожирением и метаболическим синдромом общая масса ПВЖТ вокруг мелких артерий увеличена, при этом ее антиконтрактильный эффект полностью утрачен, и в этом компартменте выявляются маркеры гипоксии и воспаления [32]. ПВЖТ старых крыс линии Вистар, получавших диету с высоким содержанием жиров, характеризуется высокой экспрессией хемокинов и провоспалительных адипокинов, что ассоциировано с эндотелиальной дисфункцией [32]. Более того, ожирение способствует “отбеливанию БЖТ”. Фенотип адипоцитов меняется от коричневого к белому, что является триггерным фактором в развитии ССЗ. С возрастом также снижается способность к коричневой адипогенной дифференцировке. В свою очередь, восстановление коричневого фенотипа адипоцитов может быть потенциальной целью в восстановлении сосудистой функции при возрастных сосудистых заболеваниях [36].

Таким образом, перераспределение, количественные и качественные изменения в ЖТ могут быть факторами, усугубляющими метаболический статус пожилых людей в сравнении с лицами более молодого возраста.

ОБЩИЕ АСПЕКТЫ ОЖИРЕНИЯ И СТАРЕНИЯ

Согласно данным исследований, ожирение и старение ассоциированы со снижением продолжительности жизни, метаболическим дисбалансом, нарушением клеточных процессов. Лица пожилого возраста, так же как и лица с ожирением, демонстрируют поразительно схожие дисфункциональные изменения в ЖТ, иммунологические

профили, нарушения клеточного гомеостаза и окислительно-восстановительного баланса, что свидетельствует об общих механизмах процессов старения и ожирения. В данном разделе статьи представлены общие патофизиологические аспекты, характерные как для ожирения, так и для старения, на молекулярном и системном уровнях.

Клеточный состав жировой ткани

Адиipoциты образуются из пула мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (adipose-derived mesenchymal stem cell, ADMSC) с последующей дифференцировкой в зрелые адиipoциты. ADMSC характеризуются способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток, включая адиipoциты, остеобласты и миоциты. Кроме адиipoцитов ЖТ представлена клеточной популяцией стромальной сосудистой фракции: неадиipoцитарными клетками, включая лейкоциты, клетки-предшественники и иммунные клетки [37]. ADMSC в большом количестве присутствуют в ВЖТ, обеспечивая высокую пластичность этой ткани. С возрастом молекулярно-клеточный состав ЖТ меняется [10]. Имеются данные, свидетельствующие о снижении количества и качества ADMSC с возрастом и потенциала к пролиферации и дифференцировке как *in vitro*, так и *in vivo*, а также регенеративной способности стволовых клеток [38]. Аналогично ожирение, наряду с хроническим воспалением, активацией окислительного стресса ограничивает регенеративную, пролиферативную функции ADMSC и способность к миграции к местам повреждений [39]. Так, в исследовании на животных показано, что ожирение ухудшает функциональную активность ADMSC, снижая их пролиферативную активность, экспрессию гена адиipoгенного фактора транскрипции PPAR γ , что свидетельствует об ингибировании процессов адиipoгенеза [40].

При этом ожирение и старение ассоциированы с повышением пула стареющих адиipoцитов и изменением фенотипа преадиipoцитов в стареющие бурые адиipoциты, что приводит к повышению экспрессии и секреции хемокинов, провоспалительных цитокинов и модификаторов внеклеточного матрикса, которые активируют воспаление в ЖТ. Так, на мышцах с ожирением показана индукция клеточного старения преадиipoцитов. Следовательно, активация повреждающих путей может усугубляться снижением способности к восстановлению. Результаты исследований подтверждают, что микросреда способна ограничивать жизнеспособность и активность стволовых клеток, это объясняет повышенную склонность к повреждению тканей и органов, наблюдаемую при ожирении и старении [41].

Наблюдаемое увеличение количества инфильтрирующих макрофагов и ADMSC, дифференцирующихся в клетки-предшественники или регуляторные Т-клетки (Treg), оказывает патологические эффекты, лежащие в основе наблюдаемых изменений, как при старении, так и при ожирении. Показано, что резидентные макрофаги меняют свой фенотип на провоспалительный и их накопление в ВЖТ, согласно данным исследований на мышцах и людях, прямо пропорционально ожирению и старению [42]. При этом противовоспалительные макрофаги M2 имеют тенденцию к снижению в ВЖТ, а провоспалительные M1, напротив, повышаются. Увеличению провоспалительных макрофагов предшествует присутствие популяции CD8⁺ Т-клеток в ЖТ, которые запускают каскад макрофаг-зависимого воспаления в ВЖТ [43]. Другая популяция регуляторных Т-клеток, обнаруженная в ВЖТ, значительно отличается, особенно в отношении генетического профиля и Т-рецепторов [44]. Показано, что в течение жизни эти клетки накапливаются преимущественно в висцеральном, а не в подкожном жире [43]. В исследованиях на мышцах ob/ob обнаружено, что ожирение и возраст ассоциированы со снижением уровня

Treg в ВЖТ, в то время как при малом количестве ВЖТ в организме уровень Treg, напротив, увеличивается [45].

Таким образом, баланс клеточной популяции ЖТ играет важную роль в обеспечении эндокринной и регуляторной функции ЖТ. Однако клеточная популяция ЖТ не является статичной. На изменения ее состава могут оказывать влияние как ожирение, так и старение. В свою очередь, изменения клеточного состава ассоциированы с воспалением ЖТ и метаболическими изменениями. С возрастом, в особенности у лиц с ожирением, наблюдается сдвиг в сторону увеличения популяций воспалительных макрофагов и уменьшения регуляторных Т-клеток. Хроническое воспаление ЖТ снижает способность к самообновлению мезенхимальных стволовых клеток, ухудшению адипогенеза, клеточному стрессу в адипоцитах. Все эти патологические изменения способствуют метаболическим нарушениям, включая инсулинорезистентность, ведущую к СД 2.

Клеточное старение

Клеточное старение представляет собой процесс реакции на стресс, при котором поврежденные клетки навсегда выходят из клеточного цикла. Стареющие клетки накапливаются с возрастом во многих органах и тканях, однако в ЖТ эти клетки связаны как с локальной, так и с системной дисфункцией [46]. Секреторный фенотип клеток, ассоциированный со старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP), представлен набором провоспалительных цитокинов, хемокинов, протеаз, факторов роста и факторами ремоделирования клеточного матрикса, связанных с атеросклерозом и другими возрастными заболеваниями [47].

На грызунах показано, что стареющие клетки в ЖТ могут подавлять ключевые факторы транскрипции, снижать адипогенез и способствовать атрофии адипоцитов [48]. У пожилых людей адипоциты и иммунные стареющие клетки могут проникать в скелетные мышцы, оказывая патологические эффекты на мышечные волокна [49]. Поврежденные клетки вступают в обратимую остановку клеточного цикла, останавливая пролиферацию, чтобы затем восстановить клеточный цикл посредством p53-опосредованной реакции. В случае, если репарация невозможна, клетка вступает в необратимое клеточное старение и навсегда выходит из клеточного цикла, что требует экспрессии ингибиторов циклинзависимой киназы и белка-супрессора опухоли p16 [50]. Это высокометаболически активное состояние постоянной задержки роста дополнительно усиливается за счет гетерохроматинизации генов клеточного цикла и установления секреторного фенотипа, ассоциированного со старением SASP. Ожирение также сопряжено с повышенной экспрессией белков p16, p53 и секреторным фенотипом SASP, что само по себе ассоциировано со старением. Передача сигналов SASP должна инициировать иммунный ответ, что приводит к удалению необратимо поврежденных клеток [51]. Однако стареющие клетки обладают высокой устойчивостью к апоптозу и избегают иммунного клиренса, что со временем способствует увеличению накопления стареющих клеток *in vivo*. Кроме того, факторы SASP могут действовать паракринным образом, вызывая активацию воспаления, запуская программу старения в соседних клетках (так называемое “вторичное старение” или “старение свидетелей”) [52]. Однако важно учитывать, что стареющие клетки играют не только отрицательную, но и положительную роль, участвуя в эмбриогенезе и нейтрализации онкогенных клеток и других физиологических процессах.

Аутофагия и митофагия

Аутофагия — эволюционно запрограммированный механизм деградации цитозольных компонентов клетки с целью регулирования функциональной активности

внутриклеточных органелл для защиты клеток от стресса. Именно поэтому аутофагия считается одним из факторов долголетия [53]. При ожирении нарушается способность клеток к аутофагии, в результате чего внутри клетки накапливаются неправильно функционирующие органеллы [54]. Еще одним незаменимым адаптационным механизмом в условиях патологических воздействий является митофагия – процесс селективного удаления поврежденных и дисфункциональных митохондрий путем аутофагии, которая необходима для поддержания оптимального функционирования различных тканей организма. Нарушение процессов митофагии связано со старческой астенией, сердечно-сосудистыми, нейродегенеративными и метаболическими заболеваниями как при ожирении, так и старении [55].

Недавние исследования показали, что нарушение митофагии особенно выражено в макрофагах, что имеет решающее значение для возрастных патологических состояний и хронического воспаления при ожирении [56]. Накопление поврежденных митохондрий в макрофагах активированной секреции IL-1 β , что индуцирует гибель макрофагов и блокирует опосредованный макрофагами иммунитет, восстановление поврежденных тканей. Антиоксидантная терапия, уменьшение количества митохондриальной ДНК (мтДНК) бромистым этидием, ингибирование синтеза митохондриального белка хлорамфениколом и увеличение клиренса поврежденных митохондрий с помощью p62 ослабляют избыточное высвобождение IL-1 β и предотвращают активацию каспазы-1 и последующую гибель макрофагов человека [57]. Эти результаты подтверждают тот факт, что удаленные поврежденные митохондрии, например, при нарушении митофагии при ожирении и старении, могут быть основными активаторами хронического воспаления и гибели клеток.

IL-10, напротив, способствует митофагии, устраняя поврежденные активными формами кислорода (АФК) митохондрии макрофагов посредством подавления белка mTOR, регулирующего трансляцию многих белков, в том числе связанных с ростом клетки и ее размножением. Однако при метаболическом синдроме, дислипидемии и ожирении уровень IL-10 снижается, что инициирует активацию mTOR. Хроническая активация mTOR приводит к неконтрольному делению клеток, подавляет аутофагию, приводя к воспалению и нарушению регуляции поляризации M1/M2 макрофагов в ЖТ. Подобные эффекты наблюдаются и при старении [56].

Помимо ингибирования аутофагии и митофагии ожирение и адипоцитарные факторы приводят к стрессу эндоплазматического ретикулаума в ЖТ, что также ассоциировано и со старением. Убиквитин-протеасомная система, являющаяся механизмом деградации неправильно свернутых белков, аномально активируется у людей с ожирением, что приводит к агрегации макромолекул в различных тканях, в том числе в ЖТ [58]. Белковые агрегаты накапливаются с возрастом, но вызванное ожирением накопление белковых макромолекул, ингибирование аутофагии и убиквитин-протеасомной системы деградации белков в ядрах и цитоплазме клеток могут ускорять клеточное старение и преждевременный апоптоз клеток вследствие нарушения регуляции белкового гомеостаза.

Таким образом, данные исследований свидетельствуют о том, что клеточное старение, дисфункциональные изменения, хроническое воспаление, апоптоз при ожирении и старении отчасти опосредованы нарушением митохондриальной функции и недостаточной аутофагией.

Гибель клеток

С возрастом СК, зрелые адипоциты и другие типы клеток в ЖТ (иммунные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты и др.) могут подвергаться необратимой остановке клеточной пролиферации и последующей гибели путем апоптоза

или некроза. Апоптоз представляет собой регулируемый и контролируемый процесс, обычно возникающий в ответ на инфекционные процессы. При ожирении к активации апоптоза приводят повреждения мтДНК, вызванные окислительным стрессом, вследствие митохондриальной дисфункции и повышенного уровня цитохрома С и активности каспазы 3 в цитоплазме [59].

Некроз характеризуется пассивной, случайной гибелью клеток в результате действия факторов окружающей среды (цитотоксичность, воспаление и др.). В адипоцитах как некроз, так и апоптоз сопровождается разрывом плазматической мембраны адипоцитов, дилатацией эндоплазматического ретикулума и выбросом клеточного содержимого во внеклеточное пространство и инфильтрацию макрофагов с образованием короноподобных структур (CLS) [60], в результате чего происходит активация ядерного фактора транскрипции каппа В (nuclear factor каппа В, NF-κВ) и секреция большого количества факторов воспаления. Следовательно, гибель адипоцитов связана с высвобождением провоспалительных факторов, нарушающих функциональную активность клеток, способность к восстановлению и самообновлению ЖТ [61]. Неспособность рекрутировать клетки-предшественники в адипогенную линию (функция самообновления) для расширения ЖТ за счет гиперплазии может привести к гипертрофии адипоцитов, что само по себе связано с нарушением метаболической активности клеток, воспалением, некрозом (наличие короноподобных структур) и нарушением секреторной активности клеток.

Кроме того, старение и увеличение экспрессии генов, связанных со старением, также способствуют снижению пролиферативной активности клеток ЖТ. Лица пожилого возраста (~71 г.) демонстрируют *ex vivo* более низкую способность СК к самообновлению и дифференцировке в адипоциты по сравнению с лицами более молодого возраста (~27 лет) [62]. Также для возрастных пациентов характерна более высокая экспрессия маркера старения p16 INK4A в СК, антиапоптотического гена белка BCL2 и проапоптотического гена белка BAX (белок X, ассоциированный с BCL2), высокая активность ядерного фактора транскрипции NFκB, повышенная экспрессия TNF-α и генов их рецепторов по сравнению с условно здоровыми добровольцами молодого и среднего возраста. Наравне с этим, наблюдается подавление генов, связанных со способностью к обновлению тканей, таких как фактор транскрипции p53, каспазы 3, 8 и 9, что указывает на ингибирование пролиферативной и дифференцирующей функций и нарушение способности к самообновлению и восстановлению с возрастом [63].

Окислительно-восстановительный гомеостаз

Активные формы кислорода (АФК), образующиеся в результате нормального клеточного метаболизма, в основном продуцируются в митохондриях. В ходе цикла Кребса вырабатываются НАДН и ФАДН₂ и переносятся в электрон-транспортную цепь, где трансмембранный электрохимический протонный градиент управляет синтезом АТФ. Электроны, переносимые по электрон-транспортной цепи, обладают достаточной свободной энергией для восстановления молекулярного кислорода и неизбежного образования АФК. Функции АФК заключаются в окислении ДНК и липидов, изменении активности белков и повреждении клеточных структур. Кроме того, АФК являются сигнальными молекулами и играют важную роль в поддержании гомеостаза. Оптимальный уровень АФК опосредует нейроэндокринный контроль метаболизма (питание и расход энергии), регулирует функцию сосудов и поддерживают термогенез ЖТ [64]. Перекись водорода инактивирует фосфатазы, отвечает за окислительно-восстановительные модификации, которые изменяют структуру и функцию белков. Таким образом, АФК воздействуют на ши-

рокий спектр клеточных процессов, таких как пролиферация, активация антиоксидантных генов и ответ на повреждение ДНК [65]. Если производство АФК превышает антиоксидантную способность, возникает окислительно-восстановительный дисбаланс. АФК, накапливаясь в гемопоэтических стволовых клетках, гемопоэтических клетках-предшественниках, клетках скелетных мышц и адипоцитах, приводят к повреждению клеток и повышают риск заболеваний ассоциированных с возрастом. Неконтролируемое образование АФК дополнительно влияет на клеточный цикл, вызывая глубокое старение за счет активации белков p53, p21 и других транскрипционных факторов [66].

Окислительный стресс, вызванный ожирением, вызывает повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК), митохондриальную дисфункцию, повышает уровень цитохрома С и активность каспазы 3 в цитоплазме, что приводит к активации апоптоза [59]. Исследования на мышах также показали, что апоптоз, вызванный ожирением, может наблюдаться в сердце [67]. Избыточное присутствие АФК при ожирении увеличивает экспрессию фактора транскрипции Gfi1, что ассоциировано со старением СК и снижением их функциональной активности. Подобные нарушения регуляции СК наблюдаются и с возрастом [68]. Высокий уровень АФК в СК усиливает передачу сигналов инсулина за счет увеличения количества рецепторов инсулина и лептина. Последующее увеличение окислительного фосфорилирования глюкозы приводит к окислительно-восстановительному дисбалансу с истощением пула СК и ускоренным старением микроокружения. Кроме того, высокий уровень АФК при ожирении способствует эктопическому накоплению липидов и снижает чувствительность к инсулину [69].

Основным внутриклеточным источником и мишенью АФК являются митохондрии, которые тесно связаны с процессом старения. АФК способны повреждать многие компоненты митохондрий, включая мтДНК [70]. В фибробластах человека было показано, что повреждение мтДНК является еще более обширным и стойким по сравнению с повреждением ядерной ДНК (ядДНК), поскольку она физически расположена близко к электрон-транспортной цепи и не защищена гистонами и хроматином [71]. В целом, неконтролируемое образование АФК способствует быстрой деполяризации потенциала внутренней митохондриальной мембраны, нарушая тем самым окислительное фосфорилирование. Прогрессирующее накопление мутаций в мтДНК, индуцированное АФК, в свою очередь способствует нарушению функционирования электрон-транспортной цепи и дальнейшей продукции АФК. Вследствие этого нарушается способность клеток поддерживать энергетический баланс на должном уровне, что приводит к снижению функциональной активности клетки и ее гибели, тем самым формируя фенотип, предрасполагающий к заболеваниям, ассоциированным с возрастом (деменция, сердечно-сосудистые заболевания, диабет и др.) [72].

С возрастом уменьшается и размер митохондрий. Точно так же ожирение связано с уменьшением площади митохондрий в продольном и поперечном направлениях в скелетных мышцах человека (примерно на 30%), что свидетельствует о подавлении митохондриального биогенеза и уменьшении их общего количества. Также было показано, что дисфункция митохондрий ассоциирована с ингибированием адипогенеза под действием ряда SASP [63].

В совокупности данные исследований свидетельствуют о том, что клеточное старение, апоптоз, дисфункциональные нарушения в ЖТ и хроническое воспаление при старении и ожирении отчасти опосредованы функциональными нарушениями в митохондриях, недостаточной аутофагией и окислительно-восстановительным дисбалансом, что в целом может являться пусковым фактором в нарушении местного и системного гомеостаза при ожирении и старении.

Таблица 1. Общие аспекты ожирения и старения с акцентом на жировую ткань

Морфологические изменения в ЖТ Перераспределение ЖТ, количественные и качественные изменения		
Увеличение общего объема ЖТ и ее висцерального компонента [10, 17–20]	}	<ul style="list-style-type: none"> • Инсулинорезистентность • Сахарный диабет • Метаболический синдром • Гипоксия в адипоцитах • Дисфункция ЖТ
Гиперплазия, гипертрофия адипоцитов [20]		
Эктопическое отложение ЖТ в ключевых органах-мишенях [22]		
Изменение клеточного состава и фенотипа клеток		
Клетки ЖТ приобретают провоспалительный, профибротный, прооксидантный фенотип [10, 32, 34]	→	<ul style="list-style-type: none"> • Дисфункциональные изменения в ЖТ • Эндотелиальная дисфункция • Снижение антиконтрактильного эффекта ПВЖТ
Смена фенотипа коричневых адипоцитов к белым адипоцитам (нарушение “коричневой” адипогенной дифференцировки) [32]	→	Триггерный фактор в развитии ССЗ
Увеличение количества провоспалительных макрофагов (M1) в ЖТ	→	Воспаление ЖТ
ADMSC: – уменьшение количества и качества клеток – нарушение пролиферативной и дифференцирующей, регенеративной способности – снижение жизнеспособности [37–39, 41]	← →	<ul style="list-style-type: none"> • Воспаление ЖТ • Метаболические изменения
Клетки приобретают секреторный фенотип стареющих клеток, ассоциированный со старением [46, 47, 52]	→	<ul style="list-style-type: none"> • Активация программы старения • Воспаление ткани
Нарушение адаптационных механизмов клеток		
Ингибирование способности клеток к аутофагии и митофагии [53, 54, 56]	→	<ul style="list-style-type: none"> • Накапление неправильно функционирующих органелл • Дисфункциональные изменения в клетках • Гибель клеток • Воспаление
Стресс эндоплазматического ретикулума [58]	→	<ul style="list-style-type: none"> • Активация клеточного старения • Апоптоз клеток
Нарушение окислительно-восстановительного баланса [66, 68, 70, 71]	→	<ul style="list-style-type: none"> • Окислительный стресс • Активация факторов, ассоциированных со старением • Накопление мутаций в мтДНК • Нарушение функциональной активности клетки и ее гибель • Истощение пула стволовых клеток в ЖТ

ЖТ – жировая ткань, ПВЖТ – периваскулярная жировая ткань, ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания, ADMSC – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ожирение аналогично патологии старения на многих уровнях от молекулярного до системного. Общие аспекты ожирения и старения кратко представлены в табл. 1.

На молекулярном уровне как ожирение, так и старение способствуют клеточному старению, воспалению и митохондриальной дисфункции вследствие окислительно-восстановительного дисбаланса и недостаточной аутофагии. Накопление поврежденных митохондрий приводит к хроническому воспалению, которое уси-

ливают связанные со старением иммунологические фенотипы. Ингибирование аутофагии приводит к дальнейшей агрегации неправильно свернутых белков.

Таким образом, молекулярные и клеточные изменения, которые являются следствием как ожирения, так и старения, оказывают глубокое влияние на здоровье человека. Учитывая этиологическое и патогенетическое сходство между ожирением и старением, можно предположить, что ожирение способно ускорять процессы старения и инициировать возрастные заболевания на более ранних этапах жизни.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена в рамках проекта фундаментальных исследований НИИ КПССЗ № 0419-2022-0002 “Разработка инновационных моделей управления факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и сопутствующими заболеваниями на основе изучения фундаментальных, клинико-эпидемиологических механизмов и методов управления здравоохранением в условиях промышленный район Сибири”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (Д.Ю.А. и Г.О.В), подготовка черновика статьи (Д.Ю.А., Б.Е.В., Г.О.В), редактирование и подготовка финальной версии обзора (Д.Ю.А. и Г.О.В).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. CDC (2020) Obesity Is a Common, Serious, and Costly Disease. <https://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html>
2. *Hruby A, Hu FB* (2015) The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics* 33: 673–689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>
3. *Yazdi FT, Clee SM, Meyre D* (2015) Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *Peer J* 3: e856. <https://doi.org/10.7717/peerj.856>
4. *Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD* (2005) Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366 (9486): 662–664. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66630-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66630-5)
5. *Palmer AK, Kirkland JL* (2016) Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. *Exp Gerontol* 86: 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.02.013>
6. *Rosen ED, Spiegelman BM* (2014) What we talk when we talk about fat. *Cell* 156: 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
7. *Bunnell BA* (2021) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 10 (12): 3433. <https://doi.org/10.3390/cells10123433>
8. *Van Marken Lichtenbelt W* (2012) Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15 (6): 547–552. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283599184>
9. *Cinti S* (2017) UCP1 protein: the molecular hub of adipose organ plasticity. *Biochimie* 134: 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.09.008>
10. *Khan S, Chan YT, Revelo XS, Winer DA* (2020) The immune landscape of visceral adipose tissue during obesity and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 267. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00267>
11. *Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR* (2006) Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribu-

- tion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (17): 6676–6681.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601752103>
12. *Ritchie SA, Connell JM* (2007) The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17 (4): 319–326.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.07.005>
 13. *Philipsen ME, Jorgensen D, Vistisen A, Sandbaek TP, Almdal JS, Christiansen T, Lauritzen DR* (2015) Witte Associations between ultrasound measures of abdominal fat distribution and indices of glucose metabolism in a population at high risk of type 2 diabetes: the ADDITION-PRO study. *PLoS One* 10 (4): e0123062.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123062>
 14. *Zoico E, Rubele S, De Caro A, Nori N, Mazzali G, Fantin F, Rossi A, Zamboni M* (2019) Brown and beige adipose tissue and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 20 (10): 368.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00368>
 15. *Rogers NH* (2014) Brown adipose tissue during puberty and with aging. *Ann Med* 47: 142–149.
<https://doi.org/10.3109/07853890.2014.914807>
 16. *Lecoultre V, Ravussin E* (2011) Brown adipose tissue and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14: 1–6.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328341221e>
 17. *Chait A, den Hartigh LJ* (2020) Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* 25(7): 22.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
 18. *Кокков АН, Брель НК, Масенко ВЛ, Груздева ОВ, Каретникова ВН, Каушалан ВВ, Барбараш ОЛ* (2017) Количественная оценка висцерального жирового депо у больных ишемической болезнью сердца с использованием современных томографических методик. *Комплексн пробл сердечно-сосуд заболев* 3: 113–119. [*Kokov AN, Brel NK, Masenko VL, Gruzdeva OV, Karetnikova VN, Kashtalap VV, Barbarash OL* (2017) Quantitative assessment of visceral fat depot in patients with coronary heart disease using modern tomographic techniques. *Complex Probl Cardiovasc Diseases* 3: 113–119. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-6-3-113-119>
 19. *Conte M, Martucci M, Sandri M, Franceschi C, Salvioli S* (2019) The dual role of the pervasive “fattish” tissue remodeling with age. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 114.
[https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00114.10\(114\)](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00114.10(114))
 20. *Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F* (2012) Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol* 3: 181.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00181>
 21. *Foster MT, Shi H, Seeley RJ, Woods SC* (2011) Removal of intra-abdominal visceral adipose tissue improves glucose tolerance in rats: role of hepatic triglyceride storage. *Physiol Behav* 104 (5): 845–854.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.064>
 22. *Silaghi A, Piercecchi-Marti M-D, Grino M, Leonetti G, Alessi M.C, Clement K, Dadoun F, Dutour A* (2008) Epicardial Adipose Tissue Extent: Relationship With Age, Body Fat Distribution, and Coronaropathy. *Obesity* 16: 2424–2430.
<https://doi.org/10.1038/oby.2008.379>
 23. *Lacobellis G, Leonetti F* (2005) Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6300–6302.
<https://doi.org/10.1210/jc.2005-1087>
 24. *Kankaanpa M, Lehto H-R, Parkka JP, Komu M, Viljanen A, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P, Parkkola R, Iozzo P* (2006) Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4689–4695.
<https://doi.org/10.1210/jc.2006-0584>
 25. *Mazzoccoli G, Dagoistino MP, Greco A* (2012) Age-related changes of epicardial fat thickness. *Biomed Prevent Nutr* 2 (1): 38–41.
<https://doi.org/10.1016/j.bionut.2011.06.024>
 26. *Silaghi A, Piercecchi-Marti M, Grino M, Leonetti G, Alessi MC, Clement K, Dadoun F, Dutour A* (2008) Epicardial Adipose Tissue Extent: Relationship With Age, Body Fat Distribution, and Coronaropathy. *Obesity* 16: 2424–2430.
<https://doi.org/10.1038/oby.2008.379>
 27. *Gruzdeva OV, Dyleva YA, Belik EV, Sinitsky MY, Stasev AN, Kokov AN, Brel NK, Krivkina EO, Bychkova EE, Tarasov RS, Barbarash OL* (2022) Relationship between Epicardial and Coronary Adipose Tissue and the Expression of Adiponectin, Leptin, and Interleukin 6 in Patients with Coronary Artery Disease. *J Pers Med* 12: 129.
<https://doi.org/10.3390/jpm12020129>
 28. *Fu M, Xu L, Chen X, Han W, Ruan C, Li J, Cai C, Ye M, Gao P* (2019) Neural crest cells differentiate into brown adipocytes and contribute to periaortic arch adipose tissue formation. *Arte-*

- rioscler Thromb Vasc Biol 39: 1629–1644.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312838>
29. Kim HW, Belin de Chantemèle EJ, Weintraub NL (2019) Perivascular adipocytes in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 2220–2227.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312304>
 30. Szasz T, Webb RC (2012) Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci* 122: 1–12.
<https://doi.org/10.1042/CS20110151>
 31. Mattu HS, Randeva HS (2013) Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol* 216: T17–T36.
<https://doi.org/10.1530/JOE-12-0232>
 32. Zemancikova A, Torok J (2019) Influence of Age on Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue in Normotensive and Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev* 9314260.
<https://doi.org/10.1155/2019/9314260>
 33. Chang L, Xiong W, Zhao X, Fan Y, Guo Y, Garcia-Barrio M, Zhang J, Jiang Z, Lin JD, Chen YE (2018) Bmal1 in perivascular adipose tissue regulates resting-phase blood pressure through transcriptional regulation of angiotensinogen. *Circulation* 138: 67–79.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029972>
 34. Saxton SN, Clark BJ, Withers SB, Eringa EC, Heagerty AM (2019) Mechanistic links between obesity, diabetes, and blood pressure: role of perivascular adipose tissue. *Physiol Rev* 99: 1701–1763.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2018>
 35. Sena CM, Pereira A, Fernandes R, Letra L, Seiça RM (2017) Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol* 174: 3514–3526.
<https://doi.org/10.1111/bph.13756>
 36. Pan XX, Ruan CC, Liu XY, Kong LR, Ma Y, Wu QH, Li HQ, Sun YJ, Chen AQ, Zhao Q, Wu F, Wang XJ, Zhang JG, Zhu DL, Gao PJ (2019) Perivascular adipose tissue-derived stromal cells contribute to vascular remodeling during aging. *Aging Cell* 18: e12969.
<https://doi.org/10.1111/acer.12969>
 37. Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T, Schrier D, Falb D, Kirkland JL, Wagers AJ, Tseng Y-H (2011) Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 143–148.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1010929108>
 38. Munoz MF, Arguelles S, Marotta F, Barbagallo M, Cano M, Ayala A (2020) Effect of Age and Lipoperoxidation in Rat and Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev* 6473279.
<https://doi.org/10.1155/2020/6473279>
 39. Xu M, Palmer AK, Ding H, Weivoda MM, Pirtskhalava T, White TA, Sepe A, Johnson KO, Stout MB, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Tchkonja T, Kirkland JL (2015) Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *eLife* 4: e12997.
<https://doi.org/10.7554/eLife.12997>
 40. Zhu XY, Ma S, Eirin A, Woollard JR, Hickson LJ, Sun D, Lerman A, Lerman LO (2016) Functional plasticity of adipose-derived stromal cells during development of obesity. *Stem Cells Transl Med* 5: 893–900.
<https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0240>
 41. Palmer AK, Xu M, Zhu Y, Pirtskhalava T, Weivoda MM, Hachfeld CM, Prata LG, van Dijk TH, Verkade E, Casaclang-Verzosa G, Johnson KO, Cubro H, Doornebal EJ, Ogrodnik M, Jurk D, Jensen MD, Chini EN, Miller JD, Matveyenko A, Stout MB, Schafer MJ, White TA, Hickson LJ, Demaria M, Garovic V, Grande J, Arriaga EA, Kuipers F, von Zglinicki T, LeBrasseur NK, Campisi J, Tchkonja T, Kirkland JL (2019) Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* 18: e12950.
<https://doi.org/10.1111/acer.12950>
 42. Cencello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevan A, Hen AB, Bedossa P, M Guerre-Millo, K Clement (2006) Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55: 1554–1561.
<https://doi.org/10.2337/db06-0133>
 43. Cipolletta D, Cohen P, Spiegelman BM, Benoist C, Mathis D (2015) Appearance and disappearance of the mRNA signature characteristic of Treg cells in visceral adipose tissue: age, diet, and PPAR γ effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 482–487.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1423486112>
 44. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, Benoist C, Mathis D (2012) PPAR γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose-tissue Treg cells. *Nature* 486: 549–553.
<https://doi.org/10.1038/nature11132>

45. *Deiuliis J, Shah Z, Shah N, Needleman B, Mikami D, Narula V, Perry K, Hazey J, Kampfrath T, Kollengode M, Sun Q, Satozkar AR, Lumeng C, Moffatt-Bruce S, Rajagopalan S* (2011) Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS One* 6: e16376.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016376>
46. *Stout MB, Justice JN, Nicklas BJ, Kirkland JL* (2017) Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty. *Physiology* 32: 9–19.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2016>
47. *Childs BG, Li H, van Deursen JM* (2018) Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest* 128 (4): 1217–1228.
<https://doi.org/10.1172/JCI95146>
48. *LeBrasseur NK, Tchkonina T, Kirkland JL* (2015) Cellular Senescence and the Biology of Aging, Disease, and Frailty. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 83: 11–18.
<https://doi.org/10.1159/000382054>
49. *Carter CS, Justice JN, Thompson L* (2019) Lipotoxicity, aging, and muscle contractility: Does fiber type matter? *Geroscience* 41: 297–308.
<https://doi.org/10.1007/s11357-019-00077-z>
50. *Childs BG, Li H, van Deursen JM* (2018) Senescent cells: A therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest* 128: 1217–1228.
<https://doi.org/10.1172/JCI95146>
51. *Ogrodnik M, Zhu Y, Langhi LGP, Tchkonina T, Kruger P, Fielder E, Victorelli S, Ruswhandi RA, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Podgorni O, Enikolopov G, Johnson KO, Xu M, Inman C, Palmer AK, Schafer M, Weigl M, Ikeno Y, Burns TC, Passos JF, von Zglinicki T, Kirkland JL, Jurk D* (2019) Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metab* 29: 1233.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.013>
52. *Xu M, Tchkonina T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, White TA, Johnson KO, Stout MB, Mezera V, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Kirkland JL* (2015) JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E6301–E6310.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>
53. *Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW* (2018) Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(9): 579–593.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
54. *Gual P, Gilgenkrantz H, Lotersztajn S* (2017) Autophagy in chronic liver diseases: the two faces of Janus. *Am J Physiol Cell Physiol* 312 (3): C263–C273.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00295.2016>
55. *Zhang Y, Sowers JR, Ren J* (2018) Targeting autophagy in obesity: from pathophysiology to management. *Nat Rev Endocrinol* 14 (6): 356–376.
<https://doi.org/10.1038/s41574-018-0009-1>
56. *Oishi Y, Manabe I* (2016) Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ Aging Mech Dis* 2 (1): 16018.
<https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.18>
57. *Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalpour S, Wong J, He F, Boassa D, Perkins G, Ali SR, McGeough MD, Ellisman MH, Seki E, Gustafsson AB, Hoffman HM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Karin M* (2016) NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell* 164 (5): 896–910.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.057>
58. *Otero MG, Fernandez Bessone I, Hallberg AE, Cromberg LE, De Rossi MC, Saez T.M, Levi V, Almenar-Queralt A, Falzone TL* (2018) Proteasome stress leads to APP axonal transport defects by promoting its amyloidogenic processing in lysosomes. *J Cell Sci* 131 (11): jcs214536.
<https://doi.org/10.1242/jcs.214536>
59. *Yuzefovych LV, Musiyenko SI, Wilson GL., Rachek LI* (2013) Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice. *PLoS One* 8 (1): e54059.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054059>
60. *Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L* (2012) Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr* 32: 261–286.
<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150623>
61. *Kuroda M, Sakaue H* (2017) Adipocyte Death and Chronic Inflammation in Obesity. *J Med Invest* 64 (3-4): 193–196.
<https://doi.org/10.2152/jmi.64.193>
62. *Caso G, McNurlan MA, Mileva I, Zemlyak A, Mynarcik DC, Gelato MC* (2013) Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. *Metabolism* 62: 337–340.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.08.007>

63. Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, Kadowitz PJ, Izadpanah R (2012) Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res* 8: 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.11.002>
64. Mau T, Yung R (2018) Adipose tissue inflammation in aging. *Exp Gerontol* 105: 27–31.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.014>
65. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175–184.
<https://doi.org/10.1172/JCI129881>
66. Bandet CL, Tan-Chen S, Bourron O, Le Stunff H, Hajduch E (2019) Sphingolipid Metabolism: New Insight into Ceramide-Induced Lipotoxicity in Muscle Cells. *Int J Mol Sci* 20: 479.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030479>
67. Koster A, Patel KV, Visser M, van Eijk JT, Kanaya AM, de Rekeneire N, Newman AB, Tyllavsky FA, Kritchevsky SB, Harris TB (2008) Health, Aging and Body Composition Study Joint effects of adiposity and physical activity on incident mobility limitation in older adults. *J Am Geriatr Soc* 56: 636–643.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2007.01632.x>
68. Beavers KM, Beavers DP, Houston DK, Harris TB, Hue TF, Koster A, Newman AB, Simonsick EM, Studenski SA, Nicklas BJ, Kritchevsky SB (2013) Associations between body composition and gait-speed decline: Results from the Health, Aging, and Body Composition study. *Am J Clin Nutr* 97: 552–560.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.112.047860>
69. Giolo De Carvalho F, Sparks LM (2019) Targeting White Adipose Tissue with Exercise or Bariatric Surgery as Therapeutic Strategies in Obesity. *Biology* 8: 16.
<https://doi.org/10.3390/biology8010016>
70. Pak JW, Herbst A, Bua E, Gokey N, McKenzie D, Aiken JM (2003) Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Aging Cell* 2: 1–7.
<https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00034.x>
71. Tsuji W, Rubin JP, Marra KG (2014) Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J. Stem Cells* 6: 312–321.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.312>
72. Jang JY, Blum A, Liu J, Finkel T (2018) The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 128: 3662–3670.
<https://doi.org/10.1172/JCI120842>

Obesity and Aging. General Aspects

Yu. A. Dyleva^{a, *}, E. V. Belik^a, and O. V. Gruzdeva^a

^aScientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

*e-mail: dyleva87@yandex.ru

Obesity is associated with an increased risk of acute and chronic diseases, including hypertension, stroke, myocardial infarction, cardiovascular disease, diabetes, cancer, and reduces life expectancy by up to 20 years, increasing the risk of premature death. It has been shown that the metabolic changes associated with obesity are similar to those observed with aging. Thus, obesity and aging have a similar range of phenotypes, such as impaired genome integrity, mitochondrial function, accumulation of intracellular macromolecules, weakened immunity, and systemic inflammation. The commonality of mechanisms may underlie the acceleration of aging processes, both at the molecular and systemic levels. Thus, understanding the mechanisms of adipose tissue dysfunction in obesity can provide insight into the processes that contribute to the metabolic dysfunction associated with the aging process. The current review will examine the molecular and cellular mechanisms that underlie obesity and aging, and how obesity can activate the aging process, initiating the early onset of aging-associated chronic diseases.

Keywords: aging, obesity, adipose tissue

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ВРЕМЕННОГО АНАЛИЗА
ЗВУКА НЕЙРОНАМИ СЛУХОВОГО ЦЕНТРА СРЕДНЕГО МОЗГА МЫШИ
(*MUS MUSCULUS*)

© 2023 г. Г. Д. Хорунжий¹, М. А. Егорова¹, *

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

*E-mail: ema6913@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 11.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

В работе методом внеклеточной регистрации импульсной активности исследована динамика временных узоров разрядов одиночных нейронов слухового центра среднего мозга домашней мыши, вызванных акустическими сигналами, охватывающими все частотное возбудительное рецептивное поле нейрона. Полученные результаты показали, что в популяции нейронов центрального ядра заднего холма наибольшей стабильностью паттернов ответов отличались нейроны с V-образными частотными рецептивными полями. Разряды остальных нейронов были более переменными и с большей вероятностью изменялись при изменении частоты и интенсивности сигнала. У подавляющего большинства исследованных нейронов изменения временных узоров разрядов происходили в пределах 1/2–1/3 октавы в сторону низких или высоких частот от характеристической частоты нейрона. Результаты настоящего исследования обсуждаются с учетом имеющейся информации о формировании ответа нейронов задних холмов вследствие взаимодействия процессов возбуждения и торможения, опосредованных активацией различных типов клеточных рецепторов к глутамату и ГАМК.

Ключевые слова: слух, домашняя мышь, центральное ядро заднего холма, одиночные нейроны, временные характеристики активности, частотные рецептивные поля

DOI: 10.31857/S0869813923030032, EDN: FSHHXZ

ВВЕДЕНИЕ

Особенности временных характеристик активности нейронов слуховых центров мозга (паттерны и латентные периоды ответов) представляют собой нейрофизиологическую основу протекающих в слуховой системе процессов временной обработки звука. Понимание роли временного механизма в кодировании акустических сигналов одиночными слуховыми нейронами требует получения исчерпывающей информации о паттернах и латентных периодах их ответов на звук.

На сегодняшний день внимание исследователей слуха сосредоточено преимущественно на двух центрах обработки информации в восходящем слуховом пути — слуховом центре среднего мозга (задних холмах четверохолмия) и слуховой области коры больших полушарий конечного мозга. Первый из них представляет собой крупнейший стволовой интегративный центр слуха [1–10]. По имеющимся данным, значительная часть базовых процессов кодирования и анализа акустической

информации реализуется уже на этом уровне слуховой системы [6]. Значимость временных характеристик активности нейронов задних холмов для раскрытия нейронных механизмов анализа звука побудила российских нейрофизиологов первыми начать такие исследования еще в конце 60-х—начале 70-х гг. 20 века [1–3]. Гершуни с соавт. показали, что временные характеристики активности различных нейронов центрального ядра заднего холма крысы и кошки значительно различаются между собой [1–3]. Это позволило разделить нейроны центрального ядра на два типа. Нейроны первого типа — “медленно суммирующие”, или “длиннолатентные”, имели тонические разряды, выраженную временную суммацию, большой латентный период ответа и большую его дисперсию при пороговых интенсивностях звука. Нейроны второго типа — “быстро суммирующие”, или “коротколатентные”, отличались фазным разрядом, мало выраженной временной суммацией и небольшим латентным периодом ответа с небольшой его дисперсией при пороговых интенсивностях звука [1–3]. Проводились подобные исследования и за рубежом. По результатам анализа перистимульных гистограмм ответов нейронов центрального ядра заднего холма мыши Ehret и Moffat была предложена приведенная ниже классификация временных узоров разрядов нейронов [4]. В соответствии с этой классификацией выделяли: 1) тонический или фазно-тонический ответ, характеризовавшийся равномерным распределением спайков в течение всего действия сигнала; 2) фазный “on”-ответ, представляющий собой 1–2 спайка, генерируемые нейроном в ответ на начало стимуляции; 3) паузный ответ, характеризовавшийся паузой в импульсном разряде нейрона, следовавшей за начальным фазным компонентом ответа; 4) позднелатентный ответ с латентным периодом более 20 мс; 5) тормозный ответ, представляющий собой торможение спонтанной активности нейрона в ответ на звуковой стимул; 6) отсутствие ответа. При исследовании временных свойств активности нейронов центрального ядра заднего холма кошки [9] использовалась классификация, несколько отличная от приведенной выше: 1) фазный разряд (1–2 спайка через небольшой промежуток времени после начала сигнала); 2) фазно-тонический ответ (за коротким фазным компонентом ответа следует тонический разряд, длящийся в течение всего стимула); 3) паузный (фазный компонент завершается паузой, за которой следует тонический компонент); 4) тонический ответ (отличается равномерным распределением спайков в течение всего действия звукового сигнала); 5) “off”-ответ (спайки генерируются нейроном в ответ на окончание стимуляции). Однако в силу методических ограничений работы носили незаконченный характер. Позднее нами было выполнено систематическое исследование временных свойств активности нейронов центрального ядра заднего холма среднего мозга домашней мыши при действии тональных сигналов характеристической частоты (ХЧ) [10–12], а также видоспецифического коммуникационного сигнала раннего онтогенеза мыши (крика дискомфорта мышат) и его моделей [13, 14]. При этом динамика паттернов ответов нейронов на тональные сигналы, охватывающие все возбуждающее частотное рецептивное поле нейрона, детально проанализирована не была.

Цель настоящей работы — систематическое исследование динамики паттернов ответов нейронов слухового центра среднего мозга мыши при действии тональных сигналов, охватывающих все возбуждающее частотное рецептивное поле нейрона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе выполняли внеклеточную регистрацию импульсной активности одиночных нейронов центрального ядра заднего холма у наркотизированных домашних мышей (*Mus musculus*, самок гибридов линии NMRI и диких мышей) в возрасте 8–15 нед. Методика подготовки животного к эксперименту и регистрации импульс-

ной активности одиночных нейронов подробно описана ранее [7, 10]. У животного оперативно открывали доступ к левому заднему холму. Краниотомию проводили в условиях ингаляционного наркоза (смесь кислорода с 1.5–1.8% галотана). После удаления твердой мозговой оболочки на обнаженную поверхность мозга наносили 2–3 капли теплого силикона. Голову жестко фиксировали в головодержателе таким образом, чтобы дорсальная поверхность мозга располагалась горизонтально. На протяжении эксперимента анестезию поддерживали внутривенными инъекциями смеси кетамина (кетавет, 35 мг/кг) и ксилазина (ромпун, 0.1 мг/кг) каждые 20–45 мин. Ректальная температура тела поддерживалась на уровне $37 \pm 1^\circ\text{C}$. В качестве регистрирующих электродов использовали стеклянные микропипетки, заполненные 3 М раствором KCl, с сопротивлением 3–8 МОм. Электроды вводили стереотаксически в область левого заднего холма животного на 1–1.5 мм каудальнее и на 0.8–1.0 мм латеральнее λ -точки, что соответствовало расположению центрального ядра левого заднего холма мыши [9, 15]. Электрод вводили вертикально, т.е. перпендикулярно дорсальной поверхности мозга, с контролем глубины погружения.

Импульсную активность нейронов усиливали в 10000 раз (усилитель биопотенциалов DAM80, WPI, Германия, полоса пропускания 0.3–10 кГц) и выводили параллельно на осциллограф (Testronix 5A14N, США), громкоговоритель и оконный дискриминатор (model 120, WPI, Германия) для дальнейшей регистрации в форме стандартных импульсов и введения в XT-совместимый компьютер для “on-line” и “off-line” анализа. Генерация сигналов, регистрация импульсной активности и первичная обработка полученных результатов (реконструкция возбудительных частотных рецептивных полей и расчет перистимульных гистограмм ответов нейронов) обеспечивались возможностями специализированного программного обеспечения, разработанного Doergscheidt (Бохум, Германия), на базе двухканального комплекса Tascita, совмещающего ЦАП и АЦП функции, и системной платы VOTIM3. Каждый канал имел тактовую частоту 250 кГц, разрешение по амплитуде 12 бит и встроенный аттенюатор для регуляции уровня звука. Для излучения звука в диапазоне частот 1–30 кГц использовали электродинамический излучатель (Thiel, C2 33/8), в диапазоне 12–75 кГц – изготовленный по специальному заказу электростатический излучатель [16]. Излучатели были размещены на расстоянии 60 см (электродинамический) и 30 см (электростатический) от уха животного, контралатеральной стороне регистрации, под углом 45° к сагиттальной плоскости. Неравномерность частотной характеристики электродинамического излучателя составляла ± 6.5 дБ на частотах 1–30 кГц. Электростатический излучатель имел равномерную частотную характеристику в диапазоне 12–90 кГц (± 2 дБ). Частотные характеристики излучателей фиксировались в компьютере и автоматически корректировались таким образом, что при звукогенерации отклонения от равномерной характеристики составляли только ± 1.5 дБ.

Уровни звукового давления сигналов (УЗД, дБ над 20 мкПа) измеряли в точке расположения ушной раковины животного с помощью системы Брюль & Кьер: 6.5 мм микрофона 4135, предусилителя 2633 и измерительного усилителя 2606. При максимальных значениях используемых сигналов (90 дБ УЗД) уровень основной частоты по крайней мере на 35 дБ (а как правило, более, чем на 50 дБ) превышал уровень продуктов искажений.

На протяжении эксперимента животное находилось в звукозаглушенной анэхоидной камере. Эксперимент начинали с аудиовизуального определения ХЧ и порога ответа нейрона на тон ХЧ. Регистрацию временных характеристик активности нейрона – паттернов ответов – выполняли при тестировании его частотного рецептивного поля одиночными тонами. Тестирование производилось автоматически с использованием контролируемой компьютером однотоновой парадигмы. То-

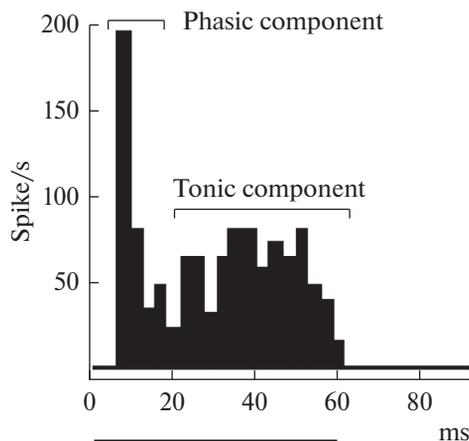


Рис. 1. Типичная перистимульная гистограмма фазно-тонического ответа нейрона центрального ядра на звуковой сигнал, образованная начальным фазным (phasic component) и поздним тоническим (tonic component) компонентами. По оси абсцисс: длительность, мс; по оси ординат: величина ответа, спайк/с. Горизонтальная линия под гистограммой – отметка стимула.

нальные сигналы длительностью 60 мс, включая время нарастания и спада по 5 мс, предъявляли с интервалом 300 мс. Каждый сигнал предъявляли трижды, в случайном порядке комбинаций 16 фиксированных частот и 16 интенсивностей (т.е. 256 различных тонов). Шаг по интенсивности составлял 5–7 дБ, по частоте – 1/16 от выбранного частотного диапазона по логарифмической шкале.

Измерения производили во всем частотном диапазоне слуховой чувствительности мыши (3–80 кГц) и при интенсивностях сигнала от пороговых до 105 дБ над порогом ответа нейрона (что соответствует диапазону от –20 до 85 дБ над 20 мкПа).

Временные узоры разрядов нейронов (паттерны активности) оценивали по перистимульным гистограммам и растровым диаграммам их ответов на тональные сигналы, вызывавшие возбудительный ответ нейрона (рис. 1, 2).

Статистическую обработку данных проводили с использованием теста Манна–Уитни (U-test), а также непараметрического критерия согласия Пирсона (критерий χ^2). При вычислении критерия χ^2 оперировали значениями количества нейронов, а не их процентными соотношениями. Все расчеты выполняли при помощи программного обеспечения SigmaPlot (версия 11).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ временных характеристик активности (временных узоров разрядов) выполнен для 135 нейронов центрального ядра заднего холма у 45 домашних мышей. ХЧ нейронов занимали диапазон 4.3–60 кГц.

В соответствии с разработанной ранее классификацией нейронов центрального ядра [7, 8] все исследованные нейроны были отнесены к трем основным группам на основе пространственного распределения возбуждающих входов в их рецептивных полях. Из 135 зарегистрированных нейронов 50 единиц (37.0%) были отнесены к группе первично-подобных (рис. 2а, 2с, 2д, рис. 4а, 4с), 44 (32.6%) – к группе тормно-зависимых нейронов (рис. 4б), у 41 нейрона (30.4%) частотные рецептивные поля имели V-образную форму (рис. 2б).

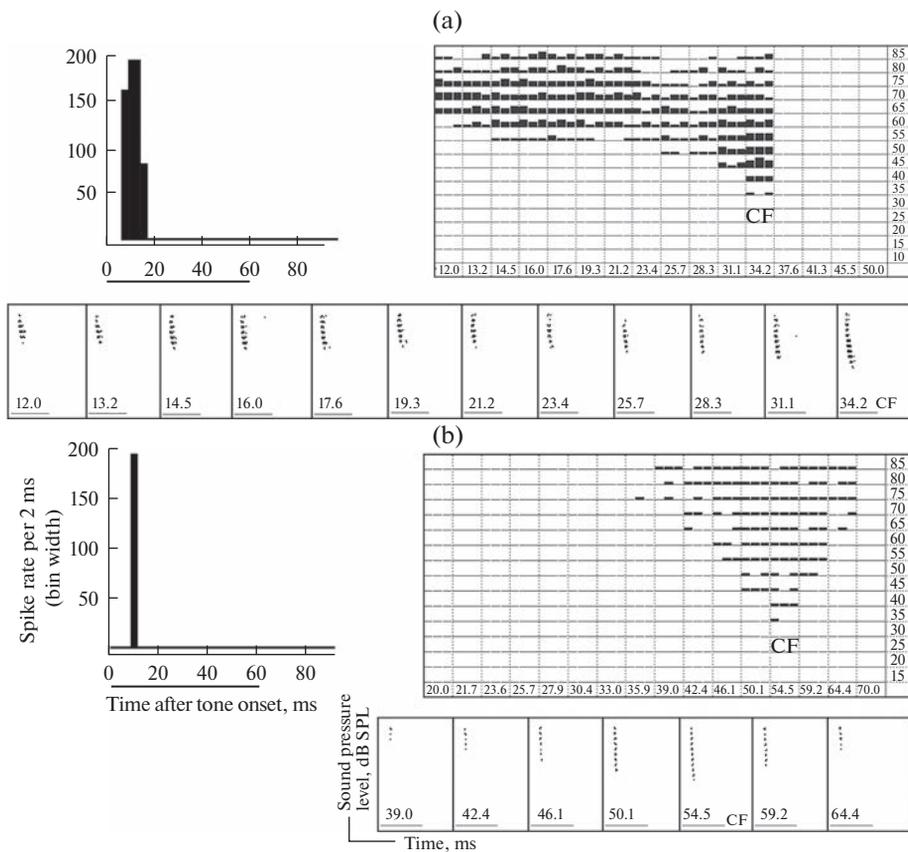


Рис. 2. Примеры нейронов центрального ядра с постоянными паттернами ответов на все звуковые сигналы, вызывающие возбуждательный ответ: (а) – нейрон с первично-подобным рецептивным полем и пачечным разрядом; (б) – нейрон с V-образным рецептивным полем и фазным разрядом; (с) – первично-подобный нейрон с паузным разрядом; (д) – первично-подобный нейрон с позднелатентным разрядом. В верхней левой части каждого фрагмента: перистимульная гистограмма ответа нейрона на сигнал ХЧ. Горизонтальная линия под осью абсцисс – отметка стимула (60 мс). В верхней правой части каждого фрагмента: диаграмма частотного возбуждательного рецептивного поля нейрона, выполненная в координатах частота стимула, кГц (абсцисса) – уровень звукового давления, дБ УЗД над 20 мкПа (ордината). Высота каждого столбика пропорциональна числу спайков в ответе нейрона на сигнал данной частоты и интенсивности. В нижней части каждого фрагмента – растровые диаграммы ответов нейрона. Каждая точка (растр) соответствует разряду нейрона в ответ на сигнал данной частоты и интенсивности. Уровень сигнала увеличивается снизу – вверх. Цифрами на каждой диаграмме указана частота сигнала, кГц. Горизонтальная линия под каждой диаграммой – отметка стимула.

У зарегистрированных нейронов наблюдали все типы разрядов, выявленных ранее при исследовании ответов нейронов центрального ядра на тон ХЧ [9–11]. Мы использовали следующую классификацию типов разрядов: 1) тонический, отличающийся равномерным распределением спайков в течение всего действия звукового сигнала; 2) фазно-тонический, представляющий собой тонический ответ с выраженным начальным фазным компонентом в виде нескольких, быстро следующих один за другим спайков (рис. 1); 3) паузный, с тоническим разрядом, прерываемым паузой в импульсном ответе нейрона (рис. 2с); 4) позднелатентный, с тоническим разрядом и латентным периодом, превышающим 20 мс (рис. 2д); 5) фазный, содер-

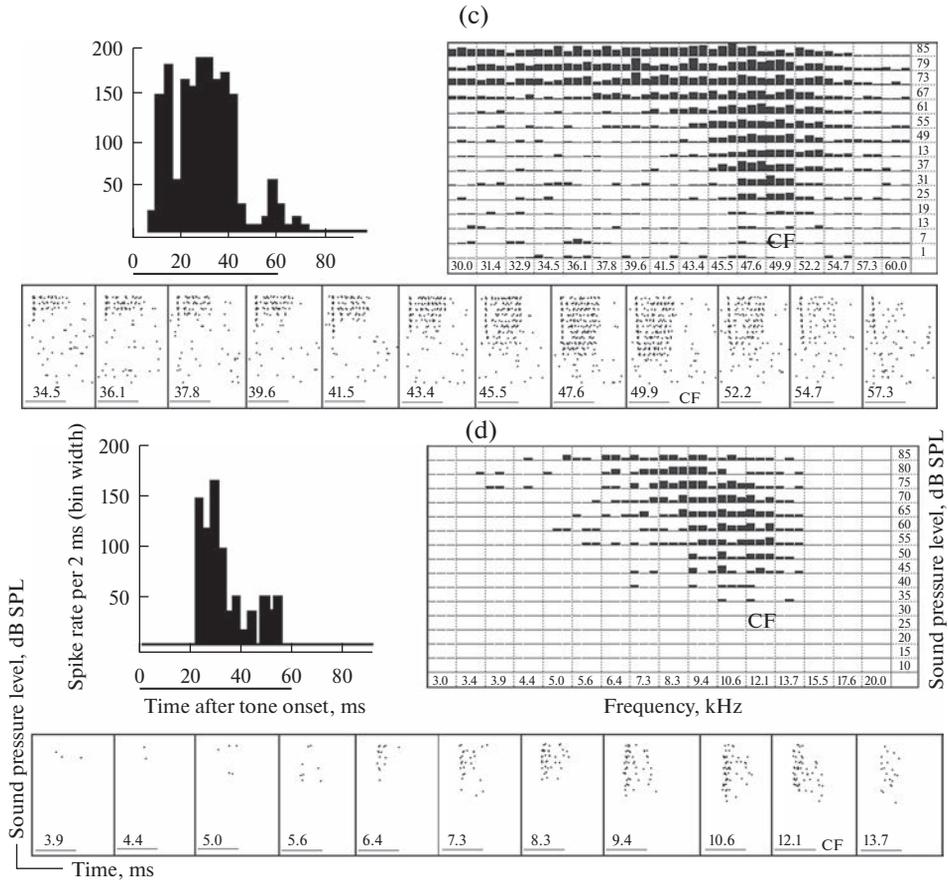


Рис. 2. Окончание.

жащий в ответе на сигнал 1–3 начальных спайка (рис. 2b) и б) пачечный, с разрядом, превышающим по длительности и количеству спайков фазный, но заканчивающимся ранее окончания сигнала (рис. 2a). Таким образом, в ответе любого нейрона (за исключением пачечных разрядов) можно было выделить начальный фазный компонент, занимавший первые 10–11 мс, и/или следующий за ним более поздний тонический компонент, длительность которого соответствовала длительности ответа за вычетом его фазного компонента (рис. 1).

Более трети всех исследованных нейронов не изменяли тип разряда с изменением частоты и интенсивности сигнала (37.8%, 51 нейрон, рис. 2, табл. 1). Около половины из них (47.0%, 24 нейрона) имели рецептивные поля V-образного типа (рис. 2b); 27.0% (14 нейронов) относились к группе первично-подобных нейронов (рис. 2a, 2c, 2d); 26.0% нейронов были тормозно-зависимыми (13 единиц). Критерий χ^2 выявил достоверные различия в распределении паттернов ответов среди нейронов трех групп с постоянным временным узором разряда во всей области возбудительного ответа ($p < 0.001$). Среди первично-подобных нейронов с постоянным паттерном активности преобладали единицы с позднелатентными ответами (рис. 2d). В меньшей степени такие нейроны проявляли фазный, тонический, пачечный (рис. 2a) или паузный (рис. 2c) разряды. Тормозно-зависимые нейроны с

Таблица 1. Распределение нейронов центрального ядра с различными типами разрядов среди трех основных групп

	Тип разряда	Тип рецептивных полей			Всего	
		первично-подобные	тормозно-зависимые	V-образные		
Не изменяли тип разряда	Тонический	2 (14.3%)	1 (7.7%)	—	3	
	Фазно-тонический	—	—	—	—	
	Паузный	1 (7.1%)	2 (15.4%)	—	3	
	Позднелатентный	6 (42.9%)	1 (7.7%)	1 (4.2%)	8	
	Пачечный	2 (14.3%)	3 (23.0%)	8 (33.3%)	13	
	Фазный	3 (21.4%)	6 (46.2%)	15 (62.5%)	21	
	Всего	14 (100%)	13 (100%)	23 (100%)	50	
Изменяли тип разряда	36			31	17	84
Всего	50			44	41	135

постоянным типом разряда демонстрировали, как правило, фазный, в меньшей степени — паузный, пачечный и тонический ответы. Среди нейронов этой группы позднелатентный ответ не встречался. У нейронов с V-образными рецептивными полями преобладали фазные (рис. 2b) и пачечные разряды. Нейроны с фазно-тоническими или паузными ответами в этой группе не встречались. Нейроны с постоянным фазно-тоническим разрядом в исследованной популяции не встречались.

Остальные нейроны (62.2%, 84 нейрона) изменяли тип разряда при изменении частоты и/или интенсивности звука. Среди них более 40% составляли нейроны с первично-подобными рецептивными полями (42.9%, 36 единиц). 31 нейрон (36.9%) имел тормозно-зависимое рецептивное поле. Доля V-образных нейронов с вариабельным паттерном активности была наименьшей и составляла немногим более пятой части (20.2%, 17 единиц). Ответы 31 нейрона (20 первично-подобных и 11 тормозно-зависимых) на любые сигналы всегда содержали тонический компонент, т.е. отличались тоническими характеристиками активности. Ответы 36 нейронов (16 первично-подобных и 20 тормозно-зависимых) хотя бы на некоторые сигналы были фазными и пачечными, т.е. без тонического компонента.

Практически у всех нейронов смена паттерна разряда с изменением частоты и интенсивности сигнала наблюдалась не более, чем дважды во всем возбуждающем частотном рецептивном поле (рис. 3, 4). При этом у большинства нейронов (71.4% первично-подобных, 94.7% тормозно-зависимых и 69.2% V-образных единиц) изменение типа разряда происходило в пределах 1/3–1/2 октавы от ХЧ как в сторону низких, так и в сторону высоких частот (рис. 4). Эта величина соответствует ширине критической полосы слуха мыши, определенной нами для нейронов центрального ядра ранее [8, 17–21]. При этом у первично-подобных и тормозно-зависимых нейронов преобладали изменения разряда, связанные с усилением торможения, по сравнению с ответами на тон ХЧ (рис. 3а, 3б; рис. 4а, 4с), а именно: утрата фазного компонента ответа с преобразованием разряда в позднелатентный (рис. 3б), утрата тонического компонента ответа с преобразованием разряда в фазный или пачечный (рис. 3а), появление паузы между компонентами. Ослабление торможения у первично-подобных нейронов наблюдалось только с низкочастотной стороны на границе критической полосы нейрона и за ее пределами (рис. 3с; рис. 4а) и проявлялось в появлении фазного, либо тонического компонента ответа по сравнению с ответом на тон ХЧ, либо в исчезновении паузы между ними.

Ослабление торможения у тормозно-зависимых единиц было выявлено всего в четырех случаях (как с низко-, так и с высокочастотной стороны относительно ХЧ). Изменения временного узора разряда первично-подобных нейронов происходили на достоверно большем удалении от ХЧ, чем у тормозно-зависимых единиц (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$, рис. 4а, 4с). Повторное изменение типа разряда встречалось у единичных нейронов (рис. 4а, 4с). У первично-подобных нейронов оно было вызвано ослаблением торможения в области низкочастотного хвоста (рис. 4а); у тормозно-зависимых – усилением торможения с низкочастотной стороны (рис. 4с).

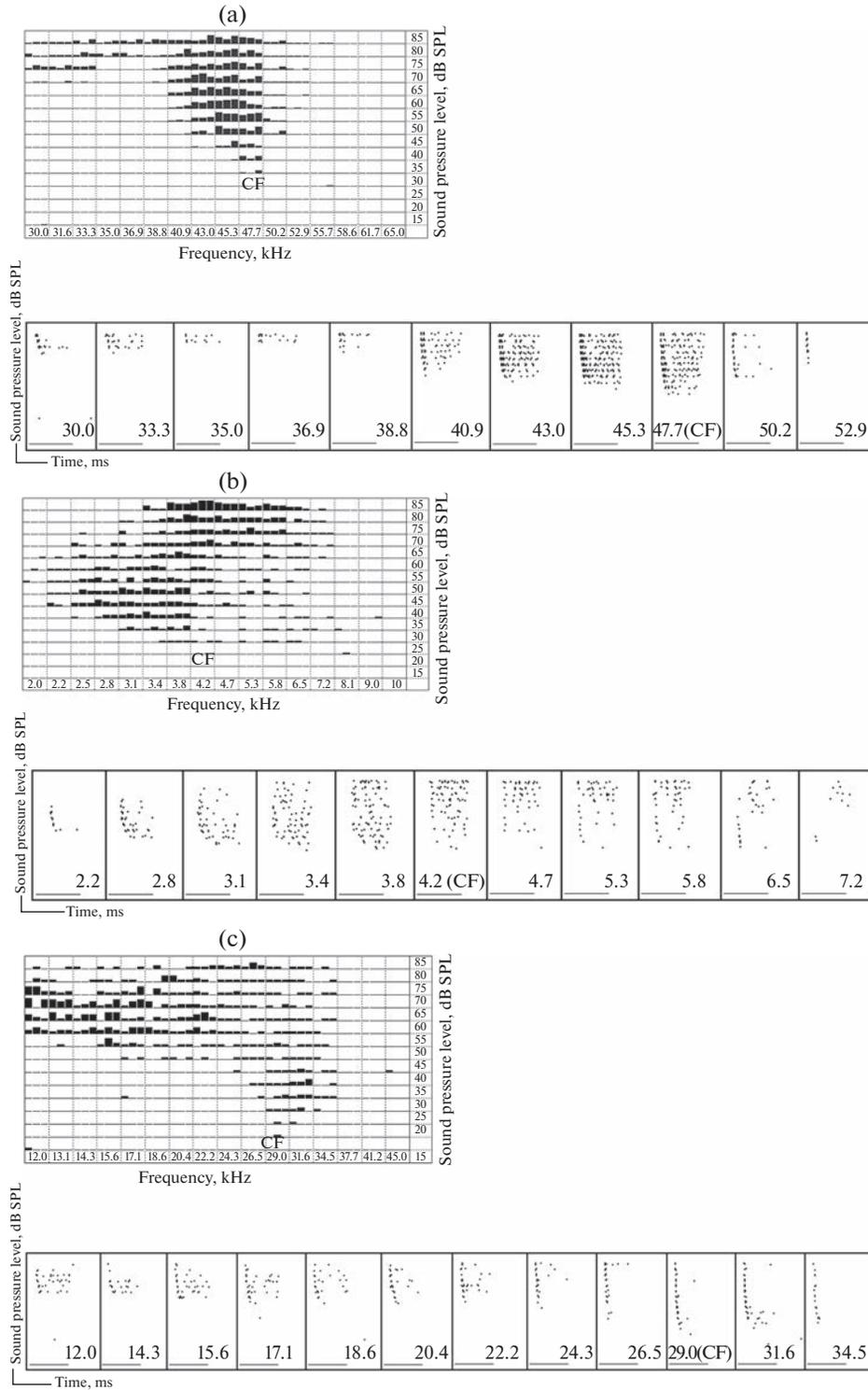
Как было упомянуто выше, подавляющая часть V-образных нейронов не изменяла тип разряда. Изменения встречались лишь у единичных нейронов и были связаны как с усилением, так и с ослаблением торможения в диапазоне $-1...+0.6$ октавы относительно ХЧ нейрона (рис. 4е). При столь редко встречающемся изменении типа разряда трудно делать выводы о закономерностях в распределении тормозных входов в рецептивных полях V-образных нейронов, и дальнейший анализ изменений паттернов разрядов у этой группы нейронов не производили.

У большинства нейронов преобразование паттернов ответа было связано с утратой его фазного или тонического компонента (по сравнению с ответом на тон ХЧ), т.е. очевидно, с активацией тормозных входов в рецептивном поле нейрона (рис. 4б, 4д, 4ф). Достоверных различий в октавном расстоянии между ХЧ нейрона и частотой, на которой происходила утрата фазного или тонического компонента разряда, между первично-подобными и тормозно-зависимыми нейронами выявлено не было (тест Манна–Уитни, $p > 0.5$). При этом у 78.0% первично-подобных и 86.0% тормозно-зависимых нейронов преобразования ответа происходили не далее, чем в $1/3-1/2$ октавы от ХЧ нейрона в сторону низких или высоких частот (рис. 4б, 4д, 4ф). У первично-подобных нейронов со стороны высоких частот преобладала утрата тонического компонента, со стороны низких частот вытормаживание обоих компонентов ответа было представлено в равной мере (рис. 4б). У тормозно-зависимых единиц преобладало вытормаживание тонического компонента ответа (рис. 4д). Статистический анализ показал, что: 1) в целом, среди первично-подобных и тормозно-зависимых единиц вытормаживание фазных и тонических компонентов ответа происходило на разных расстояниях от ХЧ (тест Манна–Уитни, $p < 0.01$); 2) вытормаживание фазных компонентов ответа у первично-подобных нейронов происходило на разном удалении от ХЧ нейрона со стороны низких и со стороны высоких частот (тест Манна–Уитни, $p < 0.01$); 3) вытормаживание компонентов ответа у тормозно-зависимых нейронов было симметричным относительно ХЧ нейрона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящей работы показали, что популяция нейронов центрального ядра заднего холма мышцы гетерогенна не только по особенностям временных характеристик ответов нейронов на тон ХЧ [10–12], но и по особенностям динамики

Рис. 3. Примеры трех нейронов центрального ядра, у которых при отклонении частоты сигнала от ХЧ наблюдали преобразования типа разряда, сопряженные с утратой либо появлением фазного или тонического компонента. (а) – Первично-подобный нейрон, паузный ответ которого на тон ХЧ при дальнейшем росте частоты сигнала переходит в фазный с утратой позднего тонического компонента; (б) – тормозно-зависимый нейрон, в ответе которого наблюдается утрата тонического компонента при понижении частоты сигнала относительно ХЧ и утрата фазного – при ее повышении; (с) – первично-подобный нейрон с фазным ответом на сигнал ХЧ, который преобразуется в паузный (т.е. приобретает тонический компонент) при отклонении частоты тона от ХЧ в низкочастотную сторону. Каждый фрагмент включает диаграмму возбуждающего рецептивного поля данного нейрона (вверху, столбчатая диаграмма) и растровые диаграммы его ответов (внизу). Все обозначения – как на рис. 2.



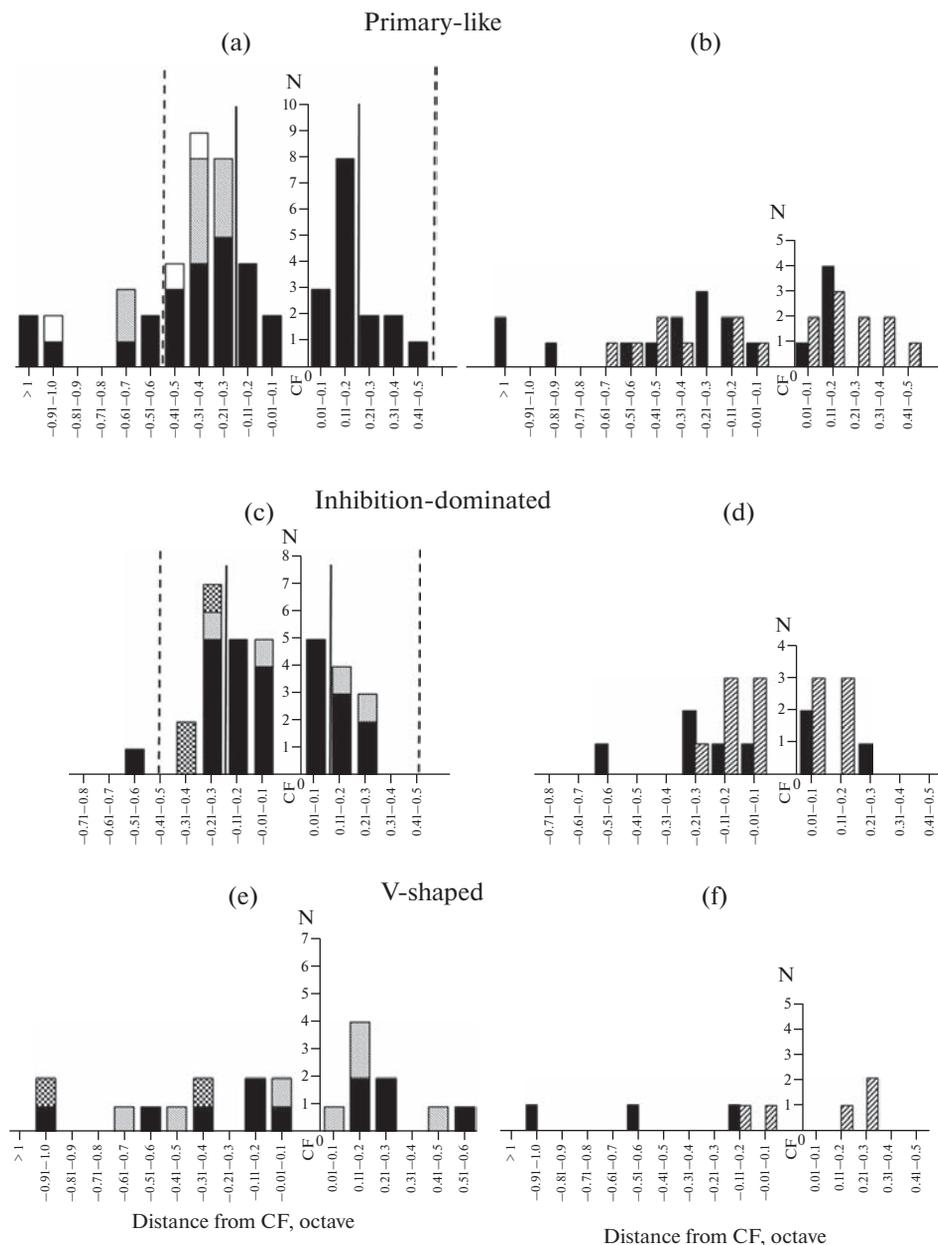
паттернов ответов в их возбудительных частотных рецептивных полях. Как правило, нейроны с постоянными временными характеристиками ответа имели частотные рецептивные поля V-образного типа и реагировали на сигнал фазным или пачечным разрядом. Остальные нейроны отличались вариабельностью временных характеристик вызванной активности. При этом для первично-подобных и тормозно-зависимых нейронов были характерны разряды с ярко выраженным поздним тоническим компонентом (т.е. тонический, фазно-тонический, паузный или позднелатентный ответ).

Значительная часть нейронов при смене паттерна активности по сравнению с ответом на тон ХЧ проявляла либо ослабление тонического компонента в ответе вплоть до его полного исчезновения (разряд нейрона становился фазным, пачечным или паузным), либо вытормаживание фазного компонента ответа с преобразованием разряда в позднелатентный. Такое ослабление тонического либо фазного компонентов в ответе, по-видимому, объясняется активацией тормозных входов в рецептивных полях нейронов, вызванной воздействием сигналов с определенной частотой и интенсивностью по механизму латерального торможения. Анализ распределения тормозных входов в частотных рецептивных полях, подавляющих фазный либо тонический компонент в ответе нейрона, выявил их преимущественную локализацию в пределах одной критической полосы ниже и выше по частоте относительно ХЧ нейрона. Полученные результаты являются дополнительным доказательством универсальности механизма критических полос, лежащего в основе не только частотного, но и временного анализа в слуховых центрах мозга [19–21]. Морфологическим базисом механизма критических полос в центральном ядре являются строго упорядоченные синаптические связи между нейронами внутри критической полосы, причем эти связи, по-видимому, имеют преимущественно тормозный характер. Периодичности тормозных входов внутри критической полосы, по-видимому, нет, они непрерывны. Распределение тормозных входов у нейронов с первично-подобными и тормозно-зависимыми рецептивными полями различается. Ослабление торможения наблюдается преимущественно у границ критических полос или за их пределами.

V-образные нейроны отличаются постоянством типа разряда и, как было показано ранее [12, 22], постоянством латентных периодов ответов, т.е. малым влиянием торможения на формирование их активности. Это соответствует выводам о слабости тормозных входов в их рецептивных полях [12, 22].

По всей видимости, выявленные нами свойства динамики временных характеристик ответов нейронов являются следствием особенностей распределения и функционирования в мембранах нейронов рецепторов к медиатору, и в первую

Рис. 4. Распределение нейронов центрального ядра в зависимости от положения смены типа разряда по частотной шкале относительно ХЧ нейрона. (а), (b) – Первично-подобные нейроны; (с), (d) – тормозно-зависимые нейроны; (е), (f) – V-образные нейроны. (а), (с), (е) – Распределение числа нейронов относительно расстояния (в октавах) между ХЧ нейрона и частотой сигнала, при действии которого наблюдали изменение типа разряда нейрона, вызванное усилением (заливка черным) или ослаблением (диагональная штриховка) тормозных входов в рецептивном поле нейрона, а также от удаленности от ХЧ нейрона частоты звука, при которой происходила вторая смена паттерна его активности (белая заливка – ослабление торможения, сетчатая штриховка – усиление торможения). Вертикальными пунктирными линиями отмечены границы критических полос слуха мыши ниже и выше по частоте от ХЧ нейрона; сплошными – границы критической полосы нейронов данной группы, для которой ХЧ является центральной частотой критической полосы [16, 17]. (b), (d), (f) – Распределение числа нейронов трех основных групп относительно удаленности (в октавах) от ХЧ нейрона частоты звука, при действии которого происходило вытормаживание фазного (черная заливка) или тонического (штриховка) компонентов ответа нейрона. N – число нейронов.



очередь, к глутамату — основному возбуждающему нейротрансмиттеру в задних холмах. Для мембран нейронов центрального ядра показаны два основных типа глутаматных рецепторов — NMDA и AMPA [23]. Хорошо известно, что эти типы рецепторов различаются по скорости активации и инактивации [23–25], что делает разным и их вклад в формирование раннего (фазного) и позднего (преимущественно тонического) компонентов ответов нейронов. AMPA-рецепторы имеют наиболее быструю кинетику активации, инактивации и десенсibilизации среди всех ти-

пов рецепторов к глутамату, обеспечивая передачу сигнала в глутаматергических синаптических окончаниях в течение 0.3–5 мс [23–25]. Это означает, что с учетом синаптической задержки в восходящем слуховом пути от Кортиева органа к центральному ядру, за счет функционирования только AMPA-рецепторов может быть сформирован ответ нейрона с латентным периодом, не превышающим 10–11 мс. Таким образом, именно активация данных глутаматных рецепторов, по всей видимости, приводит к развитию начального фазного компонента ответа нейронов. С активацией более медленных NMDA-рецепторов [23], по-видимому, связано формирование позднего тонического компонента ответа нейронов задних холмов. Кроме того, по данным Wu и соавт., начальная стадия возникновения позднего компонента ответа также обеспечивается продолжающейся активацией AMPA-рецепторов [25]. В литературе имеются также данные о важной роли тормозных процессов, опосредованных активацией ГАМК_A-рецепторов, в формировании свойств ответов нейронов центрального ядра [25–27].

Каждая из трех основных групп нейронов центрального ядра, по всей видимости, обладает характерным только для нее алгоритмом последовательной активации и инактивации AMPA-, NMDA- и ГАМК_A-рецепторов в мембранах соответствующих синаптических окончаний и, вероятно, отличается от остальных групп по соотношению вклада этих рецепторов. Очевидно, что у нейронов с V-образными рецептивными полями и фазными разрядами ключевую роль в формировании фазного разряда играет передача сигнала при помощи AMPA-рецепторов к глутамату и тормозных ГАМК_A-рецепторов. Полученные нами результаты позволяют предположить полное отсутствие NMDA-рецепторов в мембранах V-образных нейронов, отвечающих на любые сигналы (простые тональные и сложные многокомпонентные) только фазными разрядами [12, 14, 17]. У первично-подобных и тормозно-зависимых нейронов, разряды которых образованы как фазными, так и тоническими компонентами, очевидно, что для формирования ответа принципиальной является передача сигнала посредством активации как AMPA-, так и NMDA-рецепторов. Выявленная в настоящей работе большая доля единиц с фазным разрядом среди тормозно-зависимых нейронов по сравнению с первично-подобными, вероятно, свидетельствует о силе пресинаптического торможения в этой группе нейронов, опосредованно инактивирующего ионные каналы NMDA-рецепторов. Можно предположить, что у нейронов, отвечающих только позднелатентными разрядами, сопряженными с высокой дисперсией латентных периодов ответов [12], в мембране отсутствуют AMPA-рецепторы.

Изменение типа разряда нейрона на фазный или позднелатентный на разном частотном расстоянии от его ХЧ, показанное у первично-подобных и тормозно-зависимых нейронов, свидетельствует о специфике распределения в этих группах пресинаптического торможения на аксонах, возбуждающих AMPA- и NMDA-рецепторы.

Еще одним актуальным вопросом, требующим разрешения, является установление соответствия между результатами нейрофизиологических исследований активности нейронов задних холмов и данными, полученными в ходе их морфологического описания. Так, на сегодняшний день известно, что популяция нейронов центрального ядра, получающих глутаматергические возбуждающие входы от нижележащих центров слуха, может быть подразделена на две группы на основании состава синтезируемых этими клетками белков. Примерно в 60% этих клеток выявлена экспрессия генов, ответственных за биосинтез холецистокинина [28]. При этом нейроны, синтезирующие холецистокинин, отличались параллельной (ламинарной) ориентацией дендритов. Аксоны же данных нейронов формировали основной объем восходящих проекций из центрального ядра задних холмов в вентральный подотдел медиального колленчатого тела [28]. Представляется очевидным, что

нейроны центрального ядра, синтезирующие холецистокинин, соответствуют описанным ранее у кошки, крысы и мыши основным (веретеновидным, дисковидным) клеткам [29–31]. Остальную часть популяции возбуждающих нейронов центрального ядра составляли нервные клетки, в которых была отмечена экспрессия генов, обеспечивающих биосинтез вазоактивного интестинального пептида (VIP). Данные клетки, обозначенные как VIP-нейроны, отличались звездчатым морфотипом и располагались диффузно по всему объему центрального ядра, а их аксоны формировали большое количество восходящих и нисходящих проводящих путей, связывающих задние холмы как со специфическими структурами слуховой системы, так и с центрами других сенсорных систем, а также с ассоциативными ядрами в разных отделах мозга [32–34]. По всей видимости, VIP-нейроны соответствуют описанным ранее в центральном ядре звездчатым клеткам [29–31].

Исследования свойств импульсной активности холецистокинин-содержащих нейронов в условиях аппликации блокаторов AMPA- и NMDA-рецепторов позволили авторам предположить, что для развития ответов этих нейронов на звук необходима активация и того и другого типа ионотропных рецепторов к глутамату [26]. Кроме того, в последние годы были получены данные, указывающие на вовлеченность в формирование основных свойств ответов VIP-нейронов задних холмов как глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов, так и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. В частности, было показано, что аппликация блокаторов $\alpha_3\beta_4$ -N-ацетилхолиновых рецепторов на поверхность заднего холма мыши приводит к подавлению опосредованного ацетилхолином возбуждательного ответа VIP-нейронов [32, 33].

Таким образом, VIP-нейроны задних холмов, по-видимому, получают более разнообразный набор возбуждающих входов, чем “холецистокининные” нейроны, что, несомненно, должно находить отражение в регистрируемых в физиологическом эксперименте свойствах их ответов на звуковые сигналы [35]. Например, можно предположить, что частотная настройка таких нейронов должна быть шире, а избирательность по частоте ниже, чем у единиц, получающих возбуждающие входы от малого числа источников. Кроме того, недавно в центральном ядре задних холмов мыши был описан другой тип мультиполярных нейронов – так называемые нейропептид-Y-синтезирующие нейроны (NPY-нейроны) [36, 37]. Согласно данным авторов приведенных исследований, они являются ГАМКергическими вставочными нейронами и составляют около 1/6 части популяции нейронов центрального ядра [26, 33, 36]. По всей видимости, NPY-нейроны в задних холмах вовлечены в регуляцию активности других групп единиц слухового центра среднего мозга посредством усиления получаемых ими тормозных входов [36].

С учетом результатов исследований импульсной активности нейронов задних холмов, выполненных на переживающих срезах мозга мыши методом локальной фиксации потенциала на мембране, и выявивших фазные свойства ответов и низкую частотную избирательность у звездчатых нейронов [38], а также сходства частотно-временных характеристик ответов V-образных нейронов центрального ядра и мультиполярных нейронов, обнаруженных в заднем вентральном кохлеарном ядре и названных клетками-октопусами [39, 40], представляется обоснованным идентифицировать V-образные нейроны как звездчатые. В то же время прямых и однозначных доказательств соответствия V-образных нейронов центрального ядра звездчатым клеткам пока не получено, что, вместе с данными о морфологической и функциональной неоднородности мультиполярных нейронов, обнаруженных в этой структуре, приводит нас к заключению о необходимости дальнейших исследований данного вопроса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые детально рассмотрена взаимосвязь динамики временных узоров разрядов различных типов нейронов слухового центра среднего мозга мыши с особенностями паттерна активации тормозных входов в их частотных возбуждающих рецептивных полях. Нейрофизиологическими методами подтверждена универсальность механизма критических полос слуха их участием не только в частотном, но и во временном анализе звуковых сигналов. Выявленное разнообразие динамики типов разрядов в частотных рецептивных полях исследованных нейронов позволило предположить существование различий в распределении разных типов глутаматных рецепторов в мембранах нейронов с разным строением рецептивных полей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в настоящем исследовании с участием экспериментальных животных (мышей), соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Протокол № 1-2 от 26.01.2023).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00 (актуален по состоянию на 2023 год).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Г.Д.Х. — проведение экспериментов, обработка и анализ экспериментальных данных, написание рукописи, подготовка рисунков.

М.А.Е. — идея работы, планирование и проведение экспериментов, осмысление результатов исследования, написание рукописи, подготовка рисунков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гершуни ГВ (1967) О механизмах слуха (в связи с исследованием временных и временно-частотных характеристик слуховой системы). Механизмы слуха. Пробл физиол акустики 5(6): 3–32. [*Gershuni GV (1967) On the mechanisms of hearing (in connection with the study of temporal and temporal-frequency characteristics of the auditory system). Mechanisms of hearing. Probl Physiol Acoust 5(6): 3–32. (In Russ)*].
2. Гершуни ГВ, Альтман ЯА, Вартамян ИА, Марусева АМ, Радионова ЕА, Ратникова ГИ (1969) О функциональной классификации нейронов слухового отдела четверохолмия кошки по временным характеристикам. Нейрофизиология 1(2): 137–146. [*Gershuni GV, Altman JA, Vartanian IA, Maruseva AM, Radionova EA, Ratnikova GI (1969) Functional classification of the neurons of the inferior colliculi in the cat based on their temporal properties. Neurofiziologia 1(2): 137–146. (In Russ)*].
3. Gershuni GV (ed) (1971) Temporal organization of the auditory function. In: Sensory processes at the neuronal and behavioral levels. NY-London. Acad Press. 85–114.
4. Ehret G, Moffat AJM (1985) Inferior colliculus of the house mouse. II. Single unit responses to tones, noise and tone-noise combinations as a function of sound intensity. J Comp Physiol 156: 619–635.
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00619111>

5. *Ehret G, Fischer R* (1991) Neuronal activity and tonotopy in the auditory system visualized by c-fos gene expression. *Brain Res* 567: 350–354.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90819-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90819-H)
6. *Ehret G* (1997) The auditory midbrain, a “shunting yard” of acoustical information processing In: *G Ehret and R Romand* (Eds) *The Central Auditory System*. Oxford Univer Press. New York. 259–316.
7. *Egorova M, Ehret G, Vartanian I, Esser K-H* (2001) Frequency response areas of neurons in the mouse inferior colliculus. I. Threshold and tuning characteristics. *Exp Brain Res* 140: 145–161.
<https://doi.org/10.1007/s002210100786>
8. *Vartanian IA, Egorova MA, Ehret G* (2000) Critical Bandwidths of Different Types of Neurons in the Mouse Auditory Midbrain. *Dokl Biol Sci* 373(5): 701–703.
9. *Ehret G, Merzenich MM* (1988) Neuronal discharge rate is unsuitable for encoding sound intensity at the inferior colliculus level. *Hear Res* 35: 1–8.
[https://doi.org/10.1016/0378-5955\(88\)90035-4](https://doi.org/10.1016/0378-5955(88)90035-4)
10. *Egorova MA* (2008) Временные свойства импульсной активности одиночных нейронов задних холмов мыши. *Сенсорн сист* 22(3): 203–213. [*Egorova MA* (2008) The temporal properties of activity of the mouse inferior colliculus single neurons. *Sensorn Syst* 22(3): 203–213. (In Russ)].
11. *Egorova MA* (2008) Peculiarities of time patterns of discharges of single auditory neurons of mouse inferior colliculi. *J Evol Biochem Physiol* 44(5): 637.
<https://doi.org/10.1134/S0022093008050149>
12. *Egorova MA, Akimov AG, Khorunzhii GD, Ehret G* (2020) Frequency response areas of neurons in the mouse inferior colliculus. III. Time-domain responses: Constancy, dynamics, and precision in relation to spectral resolution, and perception in the time domain. *PLoS One* 15(10): e0240853.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240853>
13. *Egorova MA, Akimov AG* (2020) Specialization of Neurons with Different Response Patterns in the Mouse *Mus musculus* Auditory Midbrain and Primary Auditory Cortex during Communication Call Processing. *J Evol Biochem Physiol* 56(5): 406–414.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020050038>
14. *Akimov AG, Egorova MA, Ehret G* (2017) Spectral summation and facilitation in on-and off-responses for optimized representation of communication calls in mouse inferior colliculus. *Eur J Neurosci* 45(3): 440–459.
<https://doi.org/10.1111/ejn.13488>
15. *Sidman RL, Angewine JB, Pierce ET* (1977) In: *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*. Massachusetts. Harvard Univer Press.
16. *Machmerth H, Theiss D, Schnitzler HU* (1975) Konstruktion eines Luftschallgebers mit konstantem Frequenzgang im Bereich von 15–130 kHz. *Acustica* 34: 81–85.
17. *Egorova M, Ehret G* (2008) Tonotopy and inhibition in the midbrain inferior colliculus shape spectral resolution of sounds in critical bands. *Eur J Neurosci* 28: 675–692.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06376.x>
18. *Egorova M, Vartanian I, Ehret G* (2006) Frequency response areas of mouse inferior colliculus neurons II. Critical bands. *Neuroreport* 17(17): 1783–1786.
<https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000239966.29308.fb>
19. *Egorova MA, Akimov AG* (2013) Spectral coding in auditory midbrain neurons. *J Integr Neurosci* 12(1): 1–15.
<https://doi.org/10.1142/S0219635213500027>
20. *Egorova MA, Вартанян ИА, Эрет Г* (2002) Нейрофизиологические предпосылки слуховых критических полос на уровне среднего мозга. *Сенсорн сист* 16: 3–12. [*Egorova MA, Vartanian IA, Ehret G* (2002) Neurophysiological background for auditory critical bands in the auditory midbrain. *Sensorn Syst* 16: 3–12. (In Russ)].
21. *Malinina ES, Egorova MA, Akimov AG* (2015) Neurophysiological approaches to studying the functional role of auditory critical bands. *J Evol Biochem Physiol* 51(5): 401–411.
<https://doi.org/10.1134/S0022093015050063>
22. *Khorunzhii GD, Egorova MA* (2014) Time characteristics of impulse activity of neurons with the V-shaped frequency receptive fields in the house mouse (*Mus musculus*) auditory midbrain. *J Evol Biochem Physiol* 50(4): 357–361.
<https://doi.org/10.1134/S0022093014040097>
23. *Kelly JB, Zhang H, Wu SH* (2001) Contribution of AMPA and NMDA receptors to the excitatory responses in the inferior colliculus. *Hear Res* 165: 35–42.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00372-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00372-6)

24. *Erreger K, Chen PE, Wyllie DJ, Traynelis SF* (2004) Glutamate receptor gating. *Crit Rev Neurobiol* 16(3): 187–224.
<https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v16.i3.10>
25. *Wu SH, Ma CL, Kelly JB* (2004) Contribution of AMPA, NMDA, and GABA_A receptors to temporal pattern of postsynaptic responses in the inferior colliculus of the rat. *J Neurosci* 24(19): 4625–4634.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0318-04.2004>
26. *LeBeau FEN, Malmieca MS, Rees A* (2001) Ionophoresis in vivo demonstrates a key role for GABA_A and glycinergic inhibition in shaping frequency response areas in the inferior colliculus of guinea pig. *J Neurosci* 21: 7303–7312.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07303.2001>
27. *Schofield BR, Beebe NL* (2019) Subtypes of GABAergic cells in the inferior colliculus. *Hear Res* 376: 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.10.001>
28. *Kreeger LJ, Connelly CJ, Mehta P, Zemelman BV, Golding NL* (2021) Excitatory cholecystokinin neurons of the midbrain integrate diverse temporal responses and drive auditory thalamic subdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(10): e2007724118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2007724118>
29. *Oliver DL, Kuwada S, Yin TCT, Haberly LB, Henkel CK* (1991) Dendritic and axonal morphology of HRP-injected neurons in the inferior colliculus of the cat. *J Comp Neurol* 303: 75–100.
<https://doi.org/10.1002/cne.903030108>
30. *Malmierca MS, Blackstad TW, Osen KK, Karagülle T, Molowny RL* (1993) The central nucleus of the inferior colliculus in rat: a Golgi and computer reconstruction study of neuronal and laminar structure. *J Comp Neurol* 333: 1–27.
<https://doi.org/10.1002/cne.903330102>
31. *Malmierca MS, Seip KL, Osen KK* (1995) Morphological classification and identification of neurons in the inferior colliculus: a multivariate analysis. *Anat Embryol* 191: 343–350.
<https://doi.org/10.1007/BF00534687>
32. *Rivera-Perez LM, Kwapiszewski JT, Roberts MT* (2021) $\alpha 3\beta 4^*$ Nicotinic acetylcholine receptors strongly modulate the excitability of VIP neurons in the mouse inferior colliculus. *bioRxiv*: 1–26.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.709387>
33. *Kwapiszewski JT, Rivera-Perez LM, Roberts MT* (2022) Cholinergic boutons are distributed along the dendrites and somata of VIP neurons in the inferior colliculus. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2022.09.18.508423>
34. *Liu M, Dai J, Zhou M, Liu J, Ge X, Wang N, Zhang J* (2022) Mini-review: The neural circuits of the non-lemniscal inferior colliculus. *Neurosci Lett* 136567.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136567>
35. *Beebe NL, Silveira MA, Goyer D, Nofzt WA, Roberts MT, Schofield BR* (2022) Neurotransmitter phenotype and axonal projection patterns of VIP-expressing neurons in the inferior colliculus. *J Chem Neuroanat* 126: 102189.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102189>
36. *Silveira MA, Anair JD, Beebe NL, Mirjalili P, Schofield BR, Roberts MT* (2020) Neuropeptide Y expression defines a novel class of GABAergic projection neuron in the inferior colliculus. *J Neurosci* 40(24): 4685–4699.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0420-20.2020>
37. *Anair JD, Silveira MA, Mirjalili P, Beebe NL, Schofield BR, Roberts MT* (2022) Inhibitory NPY neurons provide a large and heterotopic commissural projection in the inferior colliculus. *Front Neur Circ* 16.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2022.871924>
38. *Peruzzi D, Sivaramakrishnan S, Oliver DL* (2000) Identification of cell types in brain slices of the inferior colliculus. *Neuroscience* 101(2): 403–416.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00382-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00382-1)
39. *Rhode WS, Oertel D, Smith PH* (1983) Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 213(4): 448–463.
<https://doi.org/10.1002/cne.902130408>
40. *Golding NL, Robertson D, Oertel D* (1995) Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J Neurosci* 15(4): 3138–3153.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-04-03138.1995>

**Neurophysiological Approaches for Temporal Sound Analysis
in the Mouse Auditory Midbrain Neurons**

G. D. Khorunzhii^a and M. A. Egorova^{a, *}

*^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia*

**e-mail: ema6913@yandex.ru*

The dynamics of the response patterns of the mouse auditory midbrain single neurons in the whole neuronal excitatory receptive field was studied by the extracellular recordings of the pulse activity of neurons. The obtained data showed that the V-shaped neurons demonstrated the highest stability of their responses among the whole population of ICC neurons. The discharges of both primary-like and inhibition-dominated neurons were more variable and their variations more likely followed the changes of the sound frequency and intensity. Changes of the discharge pattern of the vast majority of studied neurons occurred $1/3$ – $1/2$ octave away the neuronal CF in the direction of both the low-frequency and high-frequency borders of the neural FRA. The results of present study are discussed taking into account the available data about the formation of IC neurons response due the interaction of the excitatory and inhibitory processes mediated by the activation of different types of cellular glutamate and GABA receptors.

Keywords: hearing, house mouse, inferior colliculus central nucleus, single neurons, temporal response properties, frequency receptive fields

**АРГИНИНДЕИМИНАЗА ПИОГЕННОГО СТРЕПТОКОККА M49-16
НАРУШАЕТ СТРУКТУРУ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА
И КОНФЛЮЭНТНОСТЬ МОНОСЛОЯ В КУЛЬТУРЕ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

© 2023 г. Дж. Т. Маммедова¹, А. Б. Карасева¹, Л. А. Бузова¹, А. В. Соколов¹,
Д. А. Переплетчикова², А. Б. Малашичева^{2, 3}, Э. А. Старикова^{1, 4, 5, *}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁴Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁵Институт медицинского образования Национального медицинского исследовательского
центра им. В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: Starickova@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Регуляция барьерной функции эндотелия зависит от динамики актинового цитоскелета, которая обусловлена биодоступностью аргинина. Патогенные микроорганизмы могут использовать аргинингидролизующие ферменты для нарушения непрерывности эндотелиальной выстилки сосудов и последующей диссеминации. В данном исследовании изучали влияние аргининдеиминазы пиогенного стрептококка на конфлюэнтность монослоя и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека *in vitro*. В экспериментах использовали оригинальную методику получения супернатантов разрушенных ультразвуком стрептококковых клеток (СРС) исходного штамма *Streptococcus pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы *S. pyogenes* M49-16delArcA. Анализ концентрации L-аргинина производили модифицированным колориметрическим методом Сакагучи. Структуру актинового цитоскелета анализировали с помощью окрашивания клеток фаллоидином, меченным флуоресцирующим красителем. Конфлюэнтность монослоя эндотелиальных клеток оценивали морфологически после окрашивания клеток красителем кристаллическим фиолетовым. Было установлено, что в присутствии СРС исходного штамма достоверное снижение концентрации L-аргинина в культуре эндотелиальных клеток совпадало с динамическими изменениями структуры актинового цитоскелета. Через 48 ч происходило формирование ламеллы и стресс фибрилл. Через 72 ч содержание F-актина снижалось, и конфлюэнтность монослоя эндотелиальных клеток нарушалась. Такие изменения не были выявлены при культивировании клеток в стандартных условиях или в присутствии СРС мутантного по гену аргининдеиминазы штамма. Полученные результаты показывают, что патогенные микроорганизмы могут использовать истощение аргинина для регуляции барьерной функции эндотелия и диссеминации в организме хозяина.

Ключевые слова: аргинин, актиновый цитоскелет, эндотелиальные клетки, аргининдеиминаза, *Streptococcus pyogenes*

DOI: 10.31857/S0869813923030056, **EDN:** FSSGNU

Эндотелий сосудов играет активную роль в реализации защитных реакций иммунитета при инфекции за счет регуляции процессов коагуляции, воспаления и проницаемости сосудов [1]. Значительная разбалансировка этих процессов, связанная с нарушением метаболизма аргинина, развитием эндотелиальной дисфункции и нарушением барьерной функции эндотелия, сопровождается такими тяжелыми состояниями как сепсис [2], синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания [3], острый респираторный дистресс синдром [4]. Аргинин в эндотелиальных клетках регулирует mTOR (механическая цель рапамицина, от англ. mechanical target of rapamycin) метаболический сигнальный каскад [5]. Аргинин также является субстратом для продукции важнейшей регуляторной молекулы оксида азота (NO, nitric oxide) и служит предшественником других важных метаболитов – полиаминов, пролина, агматина и др. [6]. Установлено, что от биодоступности аргинина в разных типах клеток зависит структура, динамика актиновых филаментов и связанные с этим локомоторные функции клетки. В частности, в исследовании влияния дефицита аргинина на морфологию первичных глиальных клеток крысы было показано, что в отсутствие аргинина в этих клетках наблюдались дефекты ламелли движущего края, снижалось количество стресс-фибрилл и кортикального актина, а клетки приобретали вытянутую форму. Внесение добавки аргинина приводило к быстрому восстановлению морфологии клеток и структуры цитоскелета [7]. Предполагают, что влияние аргинина на актиновый цитоскелет может быть связано с активностью кофилина [8], процессами аргинилирования белков [9, 10] и продукцией NO [11, 12]. Точные аргинин-связанные механизмы регуляции актинового цитоскелета остаются малоизученными. Многие микробные патогены в ходе эволюции выработали разнообразные стратегии, позволяющие регулировать барьерную функцию эндотелия и использовать кровоток как магистраль для распространения в организме хозяина [13]. Актиновый цитоскелет играет важную роль в поддержании барьерной функции эндотелия. Формирование межклеточных контактов, контактов с внеклеточным матриксом, поляризация эндотелиальных клеток и поддержание их формы зависят от работы актинового цитоскелета. Межклеточные адгезионные комплексы (прочные контакты и адгезионные контакты), связанные, с одной стороны, с актиновым цитоскелетом, а с другой стороны, с клеточной мембраной, формируют кортикальное актиновое кольцо, которое соединяет соседние клетки и обеспечивает стабильность эндотелиального монослоя [14]. Актиновый цитоскелет часто становится мишенью действия бактериальных факторов патогенности [15]. Аргининдеиминаза (АДИ) – бактериальный фермент, который осуществляет необратимый гидролиз аргинина с образованием цитруллина и аммиака [16]. Бактериальная АДИ впервые была открыта и долгое время изучалась как фермент, подавляющий пролиферацию разных типов клеток [17–19]. Дальнейшие исследования показали, что АДИ также влияет на другие, связанные с работой цитоскелета функции эндотелиальных клеток, такие как миграция [19, 20] и способность формировать капилляроподобные структуры [17, 21]. В наших ранних исследованиях было установлено, что под влиянием АДИ проис-

Список сокращений. АДИ – аргининдеиминаза; ИФ – относительная интенсивность флуоресценции; СРС – супернатант разрушенных ультразвуком *Streptococcus pyogenes*; ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ; eNOS – endothelial nitric oxide synthase (эндотелиальная синтаза оксида азота); F-актин – фибриллярный актин; HUVEC – human umbilical vein endothelial cells (эндотелиальные клетки вены пупочного канатика); mTOR – mechanical target of rapamycin (механическая цель рапамицина); NO – nitric oxide (оксид азота).

ходит значительное снижение количества фибриллярного актина (F-актина) в эндотелиальных клетках вены пупочного канатика (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) [22]. В работе Zhuo с соавт. на клетках микрососудов человека было также показано, что ингибирование формирования актиновых фибрилл в присутствии АДИ может служить одним из механизмов нарушения формирования “ведущей” клетки (tip cell) в ходе роста капилляроподобных структур *in vitro* [20]. Экспрессия аргинингидролизующих ферментов, таких как АДИ, открывает для патогенных микроорганизмов возможность регулировать широкий спектр аргинин-зависимых клеточных функций организма хозяина. Патогены могут использовать активность АДИ для создания дефицита аргинина в очаге воспаления и, наряду с другими биологически активными продуктами *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), облегчать инвазию патогена и его диссеминацию через кровеносное русло.

В данной работе исследовали влияние стрептококковой АДИ на морфологию и структуру актинового цитоскелета эндотелия вены пупочного канатика человека в монослое. При сравнении эффектов супернатантов разрушенных стрептококков (СРС) исходного штамма и его изогенного мутанта с инактивированным геном АДИ было установлено, что в присутствии бактериального фермента в культуральной среде снижается концентрация аргинина, изменяется морфология клеток, нарушается структура актиновых филаментов и межклеточные контакты в монослое.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы *S. pyogenes*. Для изучения влияния АДИ на эндотелиальные клетки в работе использовали ранее охарактеризованный исходный штамм *S. pyogenes* M49-16, экспрессирующий АДИ, и его изогенный мутант с инактивированным геном АДИ *ArcA* [23]. Штаммы *S. pyogenes* M49-16 и M49-16del*ArcA* были любезно предоставлены руководителем отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины профессором А.Н. Суворовым.

Получение супернатанто разрушенных *S. pyogenes*. Для получения супернатантов разрушенных стрептококков (СРС) бактерии выращивали 18–20 ч в аэробных условиях при 37°C в среде Todd–Hewitt (Difco, США). Далее суспензию бактериальных клеток осаждали центрифугированием и двукратно отмывали раствором PBS (БиолоТ), после чего доводили концентрацию клеток до $2.5\text{--}5.0 \times 10^9$ КОЕ/мл. Взвесь бактерий в объеме 5 мл в PBS подвергали дезинтеграции ультразвуком при 22 Гц в течение 5 мин при мощности дезинтегратора (MSE) 0.6–0.8 мА. Разрушение клеток контролировали микроскопически. Суспензию микробов центрифугировали 30 мин при 1600 *g* для получения супернатанта, который стерилизовали с использованием фильтров Filtropure S (Sarstedt, Австрия) с размером пор 0.45 мкм.

Получение эндотелиальных клеток вены пупочного канатика (HUVEC). Эндотелиальные клетки выделяли из вены пупочного канатика человека по адаптированной стандартной методике [24]. Пуповины получали из перинатального центра Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие. С момента родов до выделения клеток проходило не более 48 ч. Вены канюлировали и инкубировали в течение 10 мин на водяной бане при 37°C с коллагеназой второго типа (Worthington, США) 140 ед./мл в DMEM (БиолоТ, Россия). Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием при 300 *g* в течение 5 мин, далее клетки ресуспендировали в полной культуральной среде ECM (Sciencell, США) и высевали в культуральные флаконы (Sarstedt, Австрия), покрытые 0.2%-ным раствором желатина (Sigma, США). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя вызывали инкубацией в растворе Трипсин-ЭДТА (Sigma, США) при 37°C.

В экспериментах использовали клетки 3–6 пассажей. Клетки культивировали в среде Endothelial Cell Basal Medium-2 (ECBM-2) (Promocell, Германия) с добавлением ростовой добавки Supplement Mix (Promocell, Германия), 10% эмбриональной сыворотки телят (Sigma, США), 2 мМ L-глутамина (БиолоТ, Россия) и 50 мкг/мл гентамицина (БиолоТ, Россия). Пересев культуры производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя осуществляли с использованием раствора Трипсин-ЭДТА (Sigma, США). Для проведения экспериментов использовали клетки 3–5 пассажей.

Влияние СРС M49-16 и M49-16delArcA на жизнеспособность HUVEC. Эндотелиальные клетки засеивали в 96-луночные планшеты (Sarstedt, Австрия) в концентрации 25 тысяч клеток в 100 мкл и инкубировали 24 ч до образования конфлюэнтного монослоя при температуре 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO₂. Далее вносили СРС и культивировали 24 или 72 ч. По истечении времени инкубации монослой дезинтегрировали раствором аккутазы (Sigma, США), клетки переносили в микропробирки (Eppendorf, Германия). Пробы центрифугировали 5 мин при 300 g, надосадочную жидкость удаляли. Клетки переносили в пробирки для анализа и производили окрашивание раствором YO-PRO® (Invitrogen, США) в конечной концентрации 100 нМ и раствором йодида пропидия (Sigma, США) в конечной концентрации 2 мкг/мл в течение 5 мин. Анализ образцов проводили с помощью проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США). Апоптотические клетки становятся проницаемыми для YO-PRO®, но остаются непроницаемыми для йодида пропидия, окрашивающего мертвые клетки. Живые клетки не окрашиваются ни YO-PRO®, ни йодидом пропидия.

Анализ концентрации L-аргинина в культуральной среде HUVEC. Анализ концентрации L-аргинина производили модифицированным колориметрическим методом Сакагучи. Реакция основана на образовании окрашенного в красный цвет соединения при реакции аргинина с 8-оксихинолином и гипобромитом натрия в щелочной среде. Клетки засеивали в концентрации 5 тысяч в 100 мкл полной культуральной среды и инкубировали сутки с исследуемыми веществами. Для анализа использовали культуральную среду, отобранную через 24, 48 и 72 ч. Образцы среды центрифугировали 5 мин при 300 g в микропробирках (Eppendorf, Германия), далее 50 мкл надосадочной жидкости переносили в 96-луночные планшеты (Sarstedt, Австрия). Объем пробы доводили до 100 мкл с помощью PBS (БиолоТ, Россия). Для анализа концентрации L-аргинина в пробы добавляли 50 мкл 5 мМ 8-оксихинолина и 100 мкл 8 мМ гипобромита натрия в 2 М NaOH. В качестве контрольной пробы использовали PBS, а для получения градуировочного графика — серию проб с двухкратным разбавлением 500 мкМ гидрохлорида аргинина до 4 мкМ в PBS. Оптическую плотность регистрировали с помощью планшетного спектрофотометра ClarioStar (BMG Labtech, Германия) при 495 нм. С помощью программного обеспечения Mars прибора ClarioStar (BMG Labtech, Германия) строили градуировочный график и рассчитывали концентрацию аргинина в пробах культуральной среды, учитывая ее объемную долю в анализируемых пробах.

Анализ влияния СРС на морфологию HUVEC. Для изучения влияния СРС на морфологию HUVEC клеточную суспензию вносили в 96-луночные планшеты (Sarstedt, Австрия) по 25 тысяч клеток в 100 мкл полной культуральной среды. Клетки инкубировали в присутствии СРС 24, 48 или 72 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Клетки фиксировали в 0.2%-ном растворе кристаллического фиолетового (SigmaAldrich, Германия) на 10%-ном метаноле (Вектон, Россия). По окончании инкубации избыток красителя удаляли трехкратной отмывкой дистиллированной водой. Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioObserver. D1 (Zeiss, Германия) и программы AxioVisionRel. 4.7 (Zeiss, Германия).

Анализ структуры актинового цитоскелета. Для анализа структуры актинового цитоскелета суспензию эндотелиальных клеток в концентрации 50 тыс. в 300 мкл полной культуральной среды вносили в 24-луночные плоскодонные планшеты (Sarstedt, Австрия), на дно которых были предварительно помещены стерильные обезжиренные покровные стекла. Одновременно в лунки планшета вносили исследуемые вещества. Клетки инкубировали 24, 48 или 72 ч при температуре 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации среду удаляли. Покровные стекла фиксировали в 4%-ном параформальдегиде при 25°C. Фиксатор удаляли, стекла промывали PBS. Пермеабиллизацию клеток производили 0.01%-ным раствором Тритона X-100 (Sigma, США) при 25°C. После этого детергент удаляли и стекла промывали PBS (БиолоТ, Россия). Далее вносили раствор AlexaFluor488-фаллоидина в 3.3%-ном метаноле (Invitrogen, США), инкубировали при температуре 37°C, промывали PBS, высушивали и наносили среду для заключения, содержащую краситель для ядер DAPI (Invitrogen, США). Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioObserver. D1 (Zeiss, Германия) и программы AxioVision-Rel. 4.7 (Zeiss, Германия).

Для количественной оценки содержания F-актина в клетке проводили измерение относительной интенсивности флуоресценции (ИФ) актинового цитоскелета с использованием программы ImageJ (NIH, США). В микрофотографии выделяли слой, содержащий изображение F-актина, переводили его в 8-битный формат, содержащий только оттенки серого, и получали ИФ среднего значения серого (Mean gray value).

Статистическая обработка данных. Полученные данные проверяли на нормальность распределения с помощью теста Шапиро–Уилка. Оценку достоверности различий между контрольными и опытными выборками проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), попарное сравнение средних значений производили при помощи апостериорного теста Тьюки. Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0.05$. Анализ проводился с помощью программ STATISTICA 6.0, Microsoft Office Excel 2010, GraphPad Prism 8 и AxioVision Rel. 4.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение влияния СРС M49-16 и M49-16delArcA на концентрацию аргинина в среде культивируемых клеток

Предварительно проводили оценку способности АДИ вызывать истощение аргинина в образцах среды культур эндотелиальных клеток. Было установлено, что концентрация L-аргинина в культуральной среде до начала эксперимента составляла 113 ± 6 мкМ (базовый уровень) (рис. 1), что согласуется с данными исследований по изучению концентрации этой аминокислоты в плазме крови человека [25, 26]. При инкубации клеток в стандартных условиях на протяжении всего эксперимента значения концентрации L-аргинина в культуральной среде на разных сроках культивирования достоверно не отличались. Концентрация L-аргинина в культуральной среде HUVES в присутствии СРС мутантного штамма также достоверно не изменялась. В присутствии СРС исходного штамма, через 24 ч инкубации, концентрация L-аргинина в культуральной среде достоверно снижалась до 63 ± 9 мкМ ($p < 0.001$) и сохранялась на этом уровне при 72-часовой культивации.

Сравнение влияния СРС M49-16 и M49-16delArcA на конфлюэнтность монослоя эндотелиальных клеток

Было установлено, что при инкубации в стандартных условиях на сроках 24, 48 и 72 ч эндотелиальные клетки образовывали монослой с хорошо сформированными

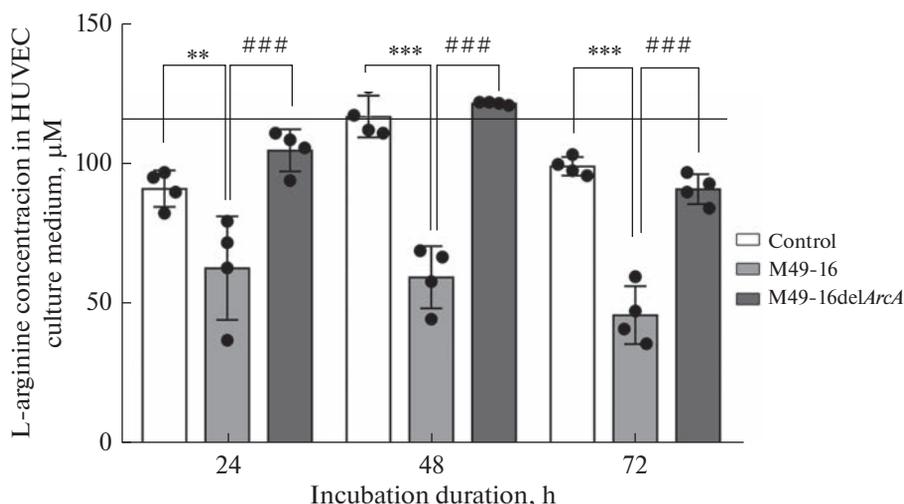


Рис. 1. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *S. pyogenes* на концентрацию аргинина в культуральной среде HUVEC. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 4$ в каждой группе. Отличия от контроля достоверны при *** – $p < 0.001$, ** – $p < 0.005$; отличия от CPC *S. pyogenes* M49-16 достоверны при ### – $p < 0.001$. Горизонтальная линия – базовый уровень аргинина в культуральной среде.

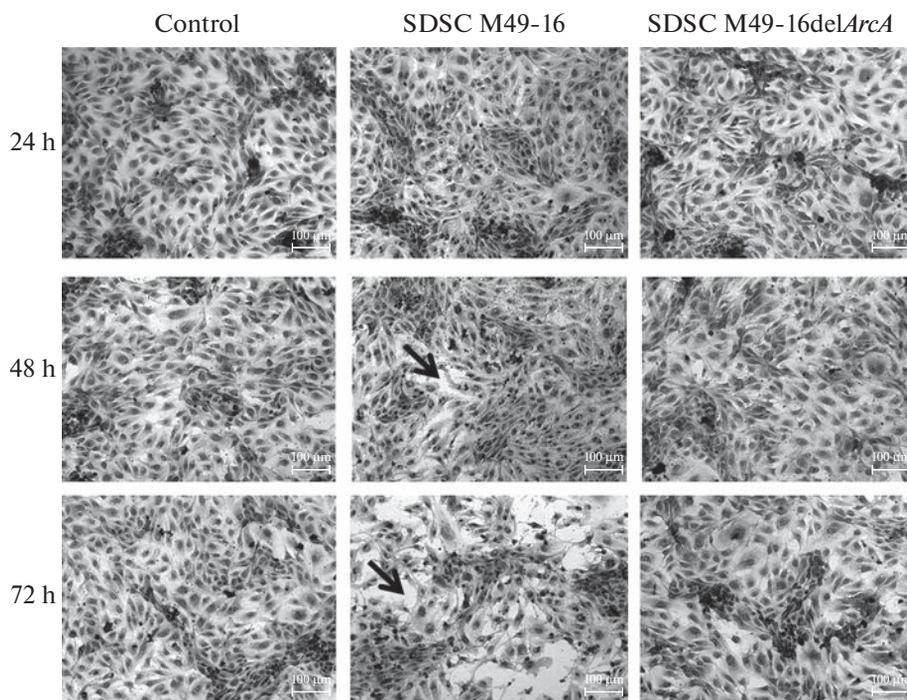


Рис. 2. Репрезентативные микроскопические фотографии, отражающие морфологические изменения HUVEC в стандартных условиях культивирования и в присутствии CPC *S. pyogenes* через 24, 48 и 72 ч инкубации; окраска кристаллическим фиолетовым. Увеличение в 100 раз. Стрелки указывают на участки, в которых нарушены межклеточные контакты.

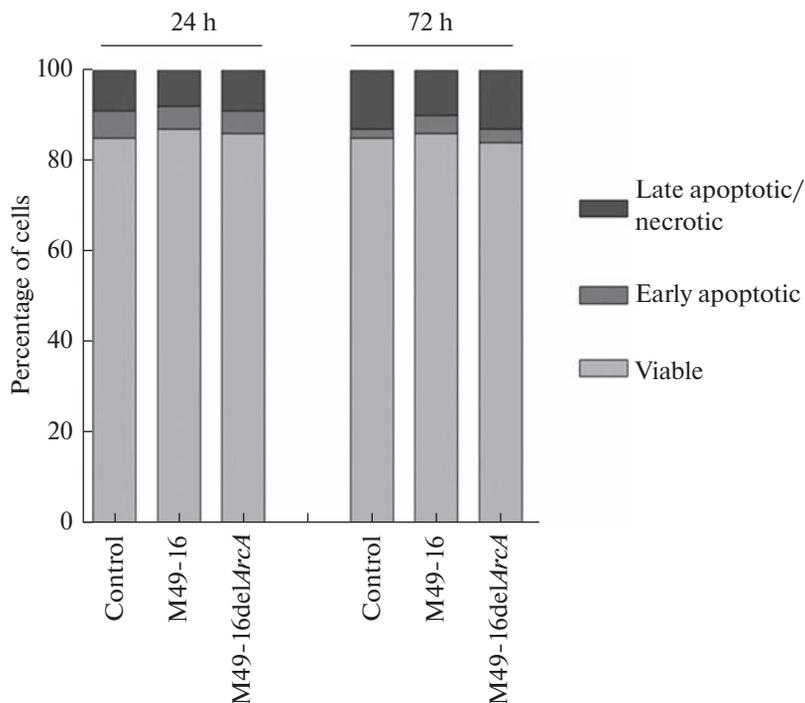


Рис. 3. Влияние CPC M49-16 и M49-16delArcA на жизнеспособность HUVEC.

Данные представлены как $M \pm SEM$ (%), $n = 3$ в каждой группе. Viable – живые клетки; early apoptotic – клетки в состоянии раннего апоптоза; late apoptotic/necrotic – клетки в состоянии позднего апоптоза и некроза.

межклеточными контактами (рис. 2). В присутствии CPC мутантного штамма заметных отличий морфологии монослоя эндотелиальных клеток по сравнению с этим показателем в контроле выявлено не было.

При культивировании клеток в присутствии CPC исходного штамма через 48 ч непрерывность монослоя эндотелиальных клеток нарушалась. Через 72 ч инкубации в этих условиях большая часть клеток формировала тонкие длинные отростки, при этом появлялись отдельные участки, в которых межклеточные контакты были разрушены.

Анализ влияния CPC M49-16 и M49-16delArcA на жизнеспособность HUVEC

Чтобы убедиться, что нарушение конфлюэнтности монослоя эндотелиальных клеток в присутствии CPC исходного штамма не было связано с гибелью клеток, в дальнейших экспериментах изучали влияние CPC на жизнеспособность клеток. Было установлено, что на всех сроках культивирования CPC исходного и мутантного штаммов не влияли на жизнеспособность HUVEC (рис. 3).

Сравнение влияния CPC M49-16 и M49-16delArcA на структуру актинового цитоскелета HUVEC

В стандартных условиях культивирования клетки имели преимущественно полигональную форму. Пучки актиновых филаментов располагались вдоль длинной

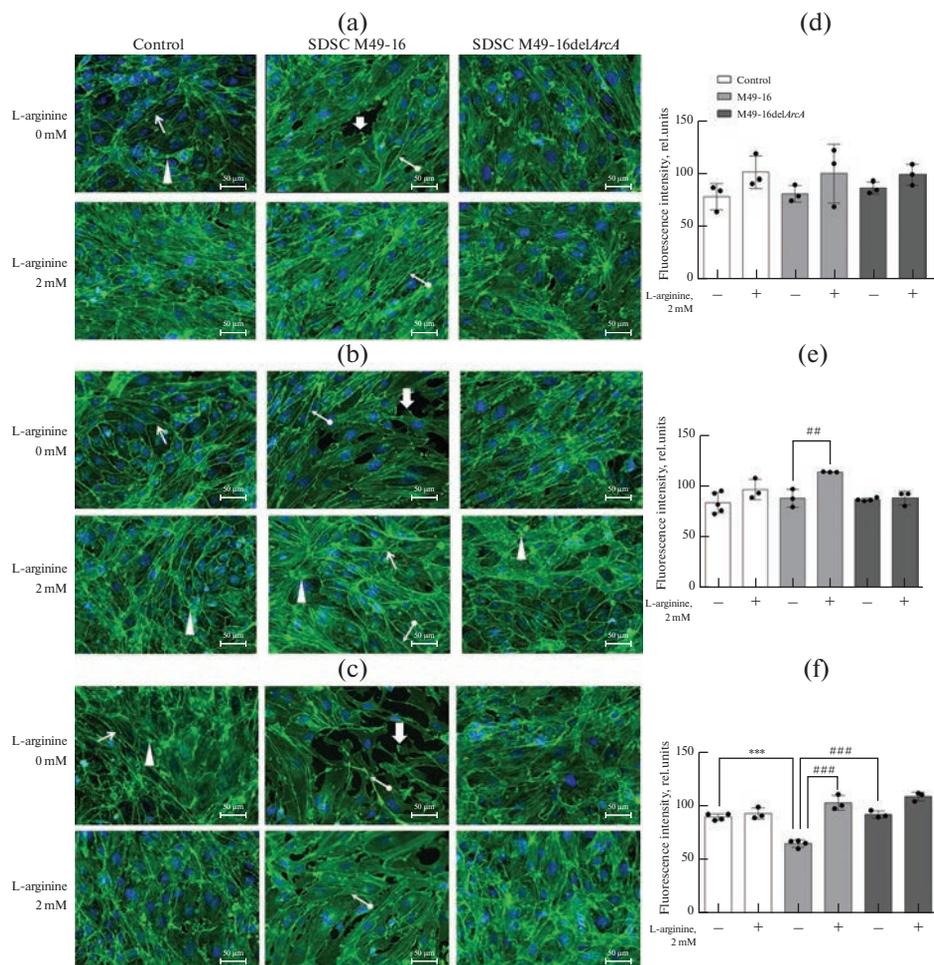


Рис. 4. Репрезентативные микроскопические фотографии и гистограммы, отражающие влияние супернатантов разрушенных *S. pyogenes* на интенсивность флуоресценции актинового цитоскелета в монослое HUVEC. (а и d) – 24 ч инкубации; (b и e) – 48 ч инкубации; (с и f) – 72 ч инкубации. Увеличение в 200 раз. Актиновый цитоскелет окрашивали фаллоидином, меченным AlexaFluor488 (зеленая флуоресценция), ядра – DAPI (синяя флуоресценция). Стрелками отмечены структуры цитоскелета: тонкая стрелка – F-актин; толстая стрелка – ламелла; наконечник стрелки – межклеточные контакты; стрелка с круглым хвостом – стресс-фибриллы. Относительную интенсивность флуоресценции F-актина измеряли с использованием программы ImageJ. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 3-5$ в каждой группе. Отличия от контроля достоверны при *** – $p < 0.001$; отличия от CPC *S. pyogenes* M49-16 достоверны при ## – $p < 0.01$; ### – $p < 0.001$.

оси клеток (тонкая стрелка, рис. 4а), а также концентрировались по периферии клетки так, что межклеточные контакты были ярко выражены (наконечник стрелки, рис. 4а). Культивирование клеток в присутствии CPC мутантного штамма не оказывало значительного влияния на структуру актинового скелета. В присутствии CPC исходного штамма уже через 24 ч инкубации происходило разрушение межклеточных контактов, и в этих участках наблюдалось больше имеющих характерные для движущихся клеток волнистых структур – ламелл, с повышенной кон-

центрацией актина на ведущем крае (толстая стрелка, рис. 4а). Через 48 ч в клетках возрастало количество стресс-фибрилл (стрелка с круглым хвостом, рис. 4б), дезинтеграция монослоя эндотелиальных клеток усиливалась и становилась еще более очевидной к третьим суткам (72 ч). На этом сроке количество F-актина в клетках заметно снижалось, клетки приобретали вытянутую веретенообразную форму с выраженными ламеллиподиями.

Внесение добавки аргинина (рис. 4а) к клеткам, инкубируемым в стандартных условиях и в присутствии СРС мутантного штамма, не оказывало значимого влияния на структуру актинового цитоскелета. Через 48 ч культивирования в этих условиях межклеточные контакты становились более выраженными за счет усиления кортикального актина (наконечник стрелки, рис. 4б). Введение добавки аргинина к клеткам, которые культивировали в присутствии СРС М49-16, приводило к значительному повышению количества F-актина (тонкая стрелка, рис. 4б), а также концентрации актина, расположенного по периферии клетки в зонах межклеточных контактов, если сравнивать с клетками в тех же условиях без аргинина (наконечник стрелки, рис. 4б). При этом на сроках 24 и 48 ч наблюдалось заметно повышенное по сравнению с контролем и СРС мутантного штамма количество стресс-фибрилл в клетках (стрелка с круглым концом, рис. 4а, 4б). Конфлюэнтность монослоя сохранялась на сроках 24 и 48 ч, нарушалась только через 72 ч инкубации и не так значительно, как без добавки аргинина. Кроме того, при введении добавки аргинина в присутствии СРС исходного штамма сохранялась характерная для эндотелия полигональная форма клеток.

Культивирование клеток в присутствии СРС мутантного штамма не оказывало достоверного влияния на ИФ F-актина клеток на всех сроках эксперимента. Через 24 и 48 ч культивирования в присутствии СРС исходного штамма ИФ F-актина не отличалась от соответствующих значений в контроле (рис. 4d и 4e). Через 72 ч инкубации клеток в присутствии СРС исходного штамма ИФ F-актина была достоверно ниже по сравнению с контролем (при $p < 0.001$) (рис. 4f). Внесение добавки аргинина к клеткам, инкубируемым в этих условиях, приводило к достоверному повышению относительной ИФ F-актина до значений в контроле (при $p < 0.001$). Самостоятельного действия добавки аргинина на ИФ F-актина выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе изучали влияние стрептококковой АДИ на морфологию и цитоскелет эндотелиальных клеток в монослое путем сравнения эффектов СРС исходного штамма *S. pyogenes* М49-16 и его изогенного мутанта М49-16del*ArcA* с инактивированным геном АДИ *ArcA*. В ходе экспериментов было установлено, что в присутствии СРС исходного штамма в культуре эндотелиальных клеток происходили изменения конфлюэнтности монослоя, структуры актинового цитоскелета и содержания F-актина, которых не было выявлено при культивировании клеток в стандартных условиях и в присутствии СРС мутантного штамма. Так, через 48 ч культивирования в присутствии СРС исходного штамма в клетках формировались многочисленные ламеллы – структуры, которые свидетельствуют об усилении миграции клеток. В наших предыдущих исследованиях в модели “раны” *in vitro* было доказано, что под действием АДИ происходит снижение миграционной активности эндотелиальных клеток. Однако в этих экспериментах срок наблюдения миграции клеток был ограничен 24 ч [19, 27]. Нельзя исключать, что АДИ по-разному влияет на миграционную активность клеток на разных сроках: через 24 ч – снижает, а через 48–72 ч – усиливает.

В настоящем исследовании было также установлено, что через 48 ч инкубации в присутствии СРС исходного штамма в клетках формировались выраженные

стресс-фибриллы (рис. 4b). Такие изменения структуры цитоскелета могут быть связаны с нарушением активности кофилина — белка, регулирующего динамику сборки и разборки актиновых филаментов [28, 29]. Равновесие полимеризации/деполимеризации актина в клетках осуществляется посредством изменения фосфорилирования кофилина. Блокировка этого процесса делает цитоскелет жестким, и клетка теряет способность к локомоции [28]. Ранее на культурах лимфоцитов периферической крови человека было установлено, что в условиях дефицита аргинина дефосфорилирование кофилина блокируется. Регуляция этого процесса в Т-клетках человека находится под контролем Rat sarcoma-mitogen-activated protein kinase (MEK) [30] и phosphoinositide 3-kinase (PI3K), связанными с внутриклеточными сигнальными каскадами [8]. Было показано, что в дефицитной по аргинину среде наблюдается снижение уровня фосфо-Erk1/2, но повышается уровень фосфо-РКВ/Акт фосфокиназ [8]. Исследование влияния аргинина на регуляцию активности кофилина в эндотелиальных клетках до сих пор не проводилось.

Другим вероятным механизмом нарушения структуры цитоскелета в условиях дефицита аргинина может быть остановка посттрансляционного аргинилирования белков. Это перенос аргинина с тРНК на N-концевые аминокислоты белков (аспарагиновая кислота, глутамин и цистеин), который осуществляет фермент аргинил-тРНК-трансфераза (ATE1) [31]. На клеточном уровне аргинилирование регулирует уровень полимерного актина и структуру внутриклеточной актиновой сети [9, 10, 32]. Показано, что делеция гена аргинил-тРНК-трансферазы у эмбрионов мышей приводит к дефектам образования новых сосудов, влияет на их направленность и общую организацию. При этом наблюдаются нарушения процесса ангиогенеза [31, 33] и развития сердечно-сосудистой системы [34]. Недосток аргинилированных белков нарушает образование актиновой сети на клеточном уровне и снижает уровень полимеров актина, укорачивает актиновые волокна и способствует формированию внутриклеточных агрегатов [35]. Такие изменения, выражающиеся в обеднении структур актинового цитоскелета в эндотелиальных клетках, были зарегистрированы после 72 ч культивирования в присутствии СРС исходного штамма в данном исследовании. Кроме того, аналогичные результаты были получены ранее при изучении влияния АДИ на структуру актинового цитоскелета отдельных эндотелиальных клеток, не находящихся в состоянии монослоя [19, 22].

Производство NO играет важную роль в биологии эндотелия. В низких концентрациях NO поддерживает гомеостаз сосудов, оказывает вазодилаторное, противовоспалительное и антикоагуляторное действие [36, 37]. Высокие концентрации этого метаболита обладают сильными цитотоксическими эффектами. Высказываются мнения, что NO в разных концентрациях также может разнонаправленно влиять на проницаемость сосудов [11]. В литературе встречаются немногочисленные данные, которые указывают на возможную связь между активностью эндотелиальной синтазы оксида азота (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), продукцией NO и актиновым цитоскелетом в эндотелиальных клетках. Так, в исследовании, проведенном на эндотелиальных клетках аорты быка (bovine aortic endothelial cells) было показано, что от эндогенной продукции NO зависит распределение F-актина и проницаемость эндотелия [12]. В другом исследовании было установлено, что взаимодействие с β -актином поддерживало ферментативную активность eNOS. Диссоциация eNOS и β -актина в эндотелиальных клетках приводила к снижению продукции NO и усилению генерации супероксида [38]. Подавление продукции NO с использованием неселективных ингибиторов NOS изменяло структуру актинового цитоскелета и повышало проницаемость мезентериальных вен у крыс [11].

Теоретически, бактериальный фермент может как подавлять, так и усиливать продукцию NO, поскольку АДИ катализирует реакцию гидролиза аргинина, в ходе которой образуется цитруллин — предшественник аргинина [39]. В исследованиях

влияния бактериальной АДИ на продукцию NO эндотелиальными клетками были получены неоднозначные результаты. На культуре HMEC (human microvascular endothelial cells) было показано, что рекомбинантная АДИ усиливала фосфорилирование eNOS по остаткам серина и тирозина [20]. Изучение влияния АДИ на эндотелиальные клетки линии TR-BBB (transgenic rat blood-brain barrier) показало, что фермент не влияет на индуцированную кальциевым ионофором выработку NO [40]. В исследовании на HUVEC [41] было установлено усиление продукции NO под действием стрептококковой АДИ. Несмотря на крайне малочисленные работы по изучению влияния АДИ на активность NOS и значения NO в регуляции актинового цитоскелета, нельзя исключать, что обнаруженное в наших экспериментах нарушение структуры актиновых филаментов могло быть обусловлено вмешательством бактериального фермента в работу eNOS.

Хорошо известно, что *S. pyogenes* экспрессирует целый ряд факторов патогенности (SpeB, SpyCEP и др.), способных повреждать эндотелий сосудов и капилляров, что при острой инфекции приводит к воспалению и возможным тромбозам [42, 43]. В данной работе на культуре эндотелиальных клеток HUVEC впервые показано, что АДИ, вызывая динамические изменения актинового цитоскелета и нарушая непрерывность монослоя эндотелиальных клеток, может способствовать усилению проницаемости сосудов и развитию эндотелиальной дисфункции. Проведенные эксперименты подтверждают важную роль биодоступности аргинина для поддержания гомеостаза сосудов. Дальнейшие исследования бактериальной АДИ необходимы для более глубокого понимания патогенетических механизмов развития стрептококковой инфекции и могут способствовать разработке новых методов лечения сепсиса и других тяжелых инфекционных заболеваний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование клеточных и молекулярных основ патологий аорты с использованием ткани, полученной из остатков после хирургических вмешательств, одобрено этическим комитетом НМИЦ им. Алмазова, разрешение от 26 декабря 2014 г. Все пациентки подписывали добровольное информированное согласие. Работы с клетками человека соответствовали Хельсинской декларации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР ФГБНУ “ИЭМ” FGWG-2022-0005 (рег. № 122020300186-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.Т.М. и Э.А.С.), сбор данных (Д.Т.М., Э.А.С., А.Б.К., Л.А.Б., А.В.С., Д.А.П., А.Б.М.), обработка данных (Д.Т.М., Э.А.С.), написание и редактирование рукописи (Д.Т.М., Э.А.С.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность заведующему отделом молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины д.м.н., профессору А.Н. Суворову за предоставленные штаммы *S. pyogenes*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shao Y, Saredy J, Yang WY, Sun Y, Lu Y, Saaoud F, Drummer C, Johnson C, Xu K, Jiang X, Wang H, Yang X* (2020) Vascular Endothelial Cells and Innate Immunity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol* 40: e138–e152.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314330>
2. *Lee WL, Slutsky AS* (2010) Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med* 363: 689–691.
<https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1007320>
3. *Toh C-H, Toh JMH, Abrams ST* (2019) Disseminated intravascular coagulation – what can we do? *Hemasphere* 3: 92–94.
<https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000232>
4. *Bannerman DD, Goldblum SE* (1999) Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 79: 1181–1199.
5. *Saxton RA, Sabatini DM* (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168: 960–976.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
6. *Morris SM Jr* (2016) Arginine Metabolism Revisited. *J Nutrition* 146: 2579S–2586S.
<https://doi.org/10.3945/jn.115.226621>
7. *Pavlyk I, Rzhetskiy Y, Jagielski AK, Drozak J, Wasik A, Pereverzieva G, Olchowik M, Kunz-Schugart LA, Stasyk O, Redowicz MJ* (2015) Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β -actin arginylation. *Amino Acids* 47: 199–212.
<https://doi.org/10.1007/s00726-014-1857-1>
8. *Feldmeyer N, Wabnitz G, Leicht S, Luckner-Minden C, Schiller M, Franz T, Conradi R, Kropp P, Müller I, Ho AD, Samstag Y, Munder M* (2012) Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. *Int Immunol* 24: 303–313.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxs004>
9. *Karakozova M, Kozak M, Wong CCL, Bailey AO, Yates JR, Mogilner A, Zebroski H, Kashina A* (2006) Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* 313: 192–196.
<https://doi.org/10.1126/science.1129344>
10. *Saha S, Mundia MM, Zhang F, Demers RW, Korobova F, Svitkina T, Perieteanu AA, Dawson JF, Kashina A* (2010) Arginylation Regulates Intracellular Actin Polymer Level by Modulating Actin Properties and Binding of Capping and Severing Proteins. *Mol Biol Cell* 21: 1350–1361.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E09-09-0829>
11. *Baldwin AL, Thurston G, Al Naemi H* (1998) Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton. *Am J Physiol Heart Circul Physiol* 274: H1776–H1784.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1776>
12. *Liu SM, Sundqvist T* (1997) Nitric Oxide and cGMP Regulate Endothelial Permeability and F-Actin Distribution in Hydrogen Peroxide-Treated Endothelial Cells. *Exp Cell Res* 235: 238–244.
<https://doi.org/10.1006/excr.1997.3675>
13. *Lubkin A, Torres VJ* (2017) Bacteria and endothelial cells: a toxic relationship. *Curr Opin Microbiol* 35: 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.008>
14. *Bogatcheva NV, Verin AD* (2008) The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvasc Res* 76: 202–207.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.06.003>
15. *Colonne PM, Winchell CG, Voth DE* (2016) Hijacking Host Cell Highways: Manipulation of the Host Actin Cytoskeleton by Obligate Intracellular Bacterial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 22 (6): 107.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00107>
16. *Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A* (1987) Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl Environment Microbiol* 53: 198–200.
<https://doi.org/10.1128/aem.53.1.198-200.1987>
17. *Park I-S, Kang S-W, Shin Y-J, Chae K-Y, Park M-O, Kim M-Y, Wheatley DN, Min B-H* (2003) Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Br J Cancer* 89: 907–914.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601181>
18. *Старикова ЭА, Карасева АБ, Бурова ЛА, Суворов АН, Соколов АВ, Васильев ВБ, Фрейдлин ИС* (2016) Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* М49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии Ea.hy926. *Мед иммунол* 18(6): 555–562. [*Starikova EA, Karaseva AB, Burova LA, Suvorov AN, Sokolov AV, Vasiliev VB, Freidlin IS* (2016)

- The role of arginine deiminase *Streptococcus pyogenes* M49-16 in inhibition of proliferation of human Ea.hy926 line endothelial cells. *Med Immunol* 18(6): 555–562. (In Russ)].
19. Маммедова ДТ, Старикова ЭА, Бурова ЛА, Малашичева АБ, Семёнова ДС, Фрейдлин ИС (2017) Влияние аргининдеиминазы *S. pyogenes* на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека. Цитокины и воспаление 16(3): 48–51. [Mammedova JT, Starikova EA, Burova LA, Malashicheva AB, Semenova DS, Freidlin IS (2017) The effect of *S. pyogenes* arginine deiminase on the proliferative and migration activity of human umbilical vein endothelial cells. *Tsitokiny i vospaleniye* [Cytokines and Inflammation] 16(3): 48–51. (In Russ)].
 20. Zhuo W, Song X, Zhou H, Luo Y (2011) Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 39: 1376–1381. <https://doi.org/10.1042/BST0391376>
 21. Beloussow K, Wang L, Wu J, Ann D, Shen W-C (2002) Recombinant arginine deiminase as a potential anti-angiogenic agent. *Cancer Lett* 183: 155–162. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00793-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00793-5)
 22. Маммедова ДТ, Старикова ЭА, Бурова ЛА, Малашичева АБ, Семёнова ДС, Фрейдлин ИС (2018) Бактериальная аргининдеиминаза нарушает структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток. Цитокины и воспаление 18(1-4): 75–79. [Mammedova JT, Starikova EA, Burova LA, Malashicheva AB, Semenova DS, Freidlin IS (2018) Bacterial arginine deiminase disrupts the endothelial cells actin cytoskeleton. *Tsitokiny i vospaleniye* [Cytokines and Inflammation] 18(1-4): 75–79. (In Russ)].
 23. Starikova EA, Sokolov AV, Vlasenko AY, Burova LA, Freidlin IS, Vasilyev VB (2016) Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem Cell Biol* 94:129–137. <https://doi.org/10.1139/bcb-2015-006924>
 24. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M (2007) A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2: 481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>
 25. Gilinskii OR, Gilinsky M, Krivoschekov S, Latysheva T, Naumenko S, Gilinskaya O, Aizman R, Golovin M, Balioz N, Karmakulova I (2018) L-Arginine and Its Methylated Derivatives in the Blood of Athletes. *Human Physiol* 44: 679–685. <https://doi.org/10.1134/S0362119718060063>
 26. Kelly E, Morris JR SM, Billiar TR (1995) Review: Nitric Oxide, Sepsis, and Arginine Metabolism. *J Parenter Enter Nutrition* 19: 234–238. <https://doi.org/10.1177/0148607195019003234>
 27. Старикова ЭА, Маммедова ДТ, Бурова ЛА, Соколов АВ, Васильев ВБ, Фрейдлин ИС (2017) Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на миграционную активность и структуру цитоскелета эндотелиальных клеток человека. *Мед иммунол* 19(5): 521–528. [Starikova EA, Mammedova JT, Burova LA, Sokolov AV, Vasilyev VB, Freidlin IS (2017) The effect of *Streptococcus pyogenes* arginine deiminase on the migration activity and structure of the cytoskeleton of human endothelial cells. *Med Immunol* 19(5): 521–528. (In Russ)].
 28. Wang W, Eddy R, Condeelis J (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7: 429–440. <https://doi.org/10.1038/nrc2148>
 29. Belvitch P, Htwe YM, Brown ME, Dudek S (2018) Cortical Actin Dynamics in Endothelial Permeability. *Curr Top Membr* 82: 141–195. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.09.003>
 30. Samstag Y, John I, Wabnitz GH (2013) Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol Rev* 256: 30–47. <https://doi.org/10.1111/immr.12115>
 31. Wong CCL, Xu T, Rai R, Bailey AO, Yates JR, Wolf YI, Zebroski H, Kashina A (2007) Global Analysis of Posttranslational Protein Arginylation. *PLoS Biol* 5: e258. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050258>
 32. Kurosaka S, Leu NA, Zhang F, Bunte R, Saha S, Wang J, Guo C, He W, Kashina A (2010) Arginylation-Dependent Neural Crest Cell Migration Is Essential for Mouse Development. *PLoS Genet* 6: e1000878. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000878>
 33. Kwon YT, Kashina AS, Davydov IV, Hu R-G, An JY, Seo JW, Du F, Varshavsky A (2002) An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* 297: 96–99. <https://doi.org/10.1126/science.1069531>
 34. Leu NA, Kurosaka S, Kashina A (2009) Conditional Tek Promoter-Driven Deletion of Arginyltransferase in the Germ Line Causes Defects in Gametogenesis and Early Embryonic Lethality

- in Mice. PLoS One 4: e7734.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007734>
35. Kashina A (2014) Protein arginylation, a global biological regulator that targets actin cytoskeleton and the muscle. *Anat Rec (Hoboken)* 297: 1630–1636.
<https://doi.org/10.1002/ar.22969>
 36. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC (2003) Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 24: 91–95.
[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)00049-4)
 37. Mammedova JT, Sokolov AV, Freidlin IS, Starikova EA (2021) The Mechanisms of L-Arginine Metabolism Disorder in Endothelial Cells. *Biochemistry (Moscow)* 86: 146–155.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921020036>
 38. Kondrikov D, Fonseca FV, Elms S, Fulton D, Black SM, Block ER, Su Y (2010) β -Actin Association with Endothelial Nitric-oxide Synthase Modulates Nitric Oxide and Superoxide Generation from the Enzyme. *J Biol Chem* 285: 4319–4327.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063172>
 39. Su Y (2014) Regulation of Endothelial Nitric oxide Synthase Activity by Protein-Protein Interaction. *Curr Pharm Des* 20: 3514–3520.
<https://doi.org/10.2174/13816128113196660752>
 40. Shen L-J, Lin W-C, Beloussow K, Hosoya K-I, Terasaki T, Ann DK, Shen W-C (2003) Recombinant arginine deiminase as a differential modulator of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthetase activity in cultured endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 66: 1945–1952.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00555-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00555-0)
 41. Mammedova JT, Sokolov AV, Burova LA, Karaseva AB, Grudinina NA, Malashicheva AB, Semenova DS, Kiseleva EP, Starikova EA (2023) Streptococcal arginine deiminase regulates endothelial inflammation, mTOR pathway and autophagy. *Immunobiology (In press)*.
 42. Burns EH, Lukomski S, Rurangirwa J, Podbielski A, Musser JM (1998) Genetic inactivation of the extracellular cysteine protease enhances in vitro internalization of group A streptococci by human epithelial and endothelial cells. *Microb Pathog* 24: 333–339.
<https://doi.org/10.1006/mpat.1998.0204>
 43. Barnett TC, Cole JN, Rivera-Hernandez T, Henningham A, Paton JC, Nizet V, Walker MJ (2015) Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cell Microbiol* 17: 1721–1741.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12531>

**Arginine Deiminase of *Streptococcus pyogenes* M49-16 Disrupts
the Confluence of the Monolayer and the Structure of the Actin Cytoskeleton
of Endothelial Cells *In Vitro***

**J. T. Mammedova^a, A. B. Karaseva^a, L. A. Burova^a, A. V. Sokolov^a, D. A. Perepletchikova^b,
A. B. Malashicheva^{b, c}, and E. A. Starikova^{a, d, e, *}**

^a*Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia*

^b*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

^c*Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia*

^d*Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia*

^e*Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: Starikova@yandex.ru*

The actin cytoskeleton is involved in the regulation of the barrier function of the endothelium. The bioavailability of arginine is an important factor determining of actin cytoskeleton dynamics. Pathogenic microorganisms can use arginine-hydrolyzing enzymes to disrupt the confluences of the vascular endothelium for subsequent dissemination. In this study, the effect of streptococcal arginine deiminase on the human umbilical vein endothelial cells monolayer confluence and the actin cytoskeleton structure *in vitro* was studied. The original technique for obtaining supernatants by sonication destroyed streptococcal cells (SDSCs) of the original strain of *Streptococcus pyogenes* M49-16 and its isogenic mutant with the inactivated arginine deiminase gene *S. pyogenes* M49-16 Δ elArcA was used in this study. The changes in the L-arginine concentration were evaluated by the modified Sakaguchi colorimetric method. The structure of the actin cytoskeleton was

analyzed after cells staining with fluorescent dye labeled phalloidin. The confluence of the endothelial cell monolayer was evaluated morphologically after staining the cells with crystal violet dye. It was found that in the presence of the parental strain-derived SDSC, a significant decrease in the arginine concentration in the endothelial cells culture medium caused dynamic changes in the actin cytoskeleton structure. After 48 hours, lamellae and stress fibers formed. After 72 hours, the content of F-actin decreased and the confluence of the monolayer of endothelial cells was disrupted. Such changes were not detected when cells were cultured under standard conditions and in the presence of mutant strain-derived SDSC. The results obtained show that pathogenic microbes can use arginine depletion to regulate endothelial barrier function and dissemination in the host organism.

Keywords: arginine, actin cytoskeleton, endothelial cells, arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭФФЕКТЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
НА СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ VTBR – МОДЕЛИ
РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

© 2023 г. И. Н. Рожкова¹, С. В. Окотруб¹, Е. Ю. Брусенцев¹, Т. Н. Игонина¹,
Т. А. Рахманова^{1, 2}, Д. А. Лебедева^{1, 2}, Т. А. Яцук¹, В. С. Козенева^{1, 2},
В. А. Напримеров¹, С. Я. Амстиславский¹. *

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

*E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 03.02.2023 г.

Работа является первым исследованием влияния такой вспомогательной репродуктивной технологии (ВРТ), как культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов на социальное поведение потомков мышей линии VTBR (VTBR T + Itpr3tf/J), которая представляет собой идиопатическую модель аутизма. В качестве контроля были использованы мыши C57BL/6J. У взрослых потомков мышей, полученных в результате естественного спаривания (группы C57BL/6J и VTBR), либо после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов соответствующих линий мышей псевдобеременным самкам C57BL/6J (группы ВРТ-C57BL/6J и ВРТ-VTBR), было изучено социальное поведение. При межлинейном сравнении было показано, что мыши VTBR имеют сниженные уровни социального распознавания и мотивации по сравнению с мышами C57BL/6J. У самок ВРТ-C57BL/6J и ВРТ-VTBR было установлено снижение интереса к новому партнеру в сессии на социальное распознавание по сравнению с естественно зачатыми животными того же пола. Результаты поведенческого теста свидетельствуют о влиянии культивирования *in vitro* на социальное распознавание у потомков мышей линий C57BL/6J и VTBR, но только у самок.

Ключевые слова: C57BL/6J, VTBR, преимплантационные эмбрионы, вспомогательные репродуктивные технологии, культивирование *in vitro*, расстройства аутистического спектра, социальное поведение

DOI: 10.31857/S0869813923030044, **EDN:** FSRFDJ

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) в настоящее время являются неизлечимыми и характеризуются снижением интереса к сверстникам, стереотипным поведением, трудностями в поддержании социальных контактов и нарушением коммуникации [1]. Детально объяснить их патологические механизмы и, следовательно, применить соответствующие профилактические методы лечения пока невозможно. Несмотря на интерес исследователей к РАС, этиологические причины и патогенетические механизмы возникновения этих расстройств изучены лишь ча-

стично, каких-либо методов превентивной терапии РАС на сегодняшний день нет, а существующие стратегии направлены лишь на смягчение симптомов [2]. Сложности в понимании этиологии аутизма и механизмов, лежащих в основе РАС, связаны, в частности, с тем, что в патогенез этих расстройств вовлечено множество генетических и средовых факторов в их сложном взаимодействии, а также эпигенетические модификации [3, 4]. Между тем, большинство исследователей согласны, что РАС могут возникать в результате нарушений развития нервной системы в раннем онтогенезе [2, 5, 6].

Культивирование ранних эмбрионов *in vitro* является одной из основных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), широко применяемых как в медицине, так и в исследованиях на животных [7, 8]. Несмотря на более чем 40-летнее использование ВРТ в репродуктивной медицине, накапливаются противоречивые данные по поводу отдаленных эффектов применения этих методов по отношению к потомкам. Одни исследователи обнаруживают влияние этих процедур на здоровье людей, другие нет, что может быть обусловлено применением различных протоколов. Наряду с анализом медицинской литературы, при обсуждении последствий применения репродуктивных технологий следует учитывать результаты экспериментов на животных, выполненных в стандартизированных условиях на разных лабораторных моделях [7, 8].

В последнее десятилетие активно обсуждают возможную связь между применением ВРТ и повышением частоты РАС [9–12] и отклонениями в развитии нервной системы [13, 14] у детей после применения ВРТ. Проблема таких исследований, основанных на мета-анализе клинических данных, заключается в том, что ВРТ характеризуются многочисленными и сложными терапевтическими процедурами, которые до сих пор не унифицированы [15]. Хотя некоторые исследования выявили влияние ВРТ на частоту возникновения РАС у детей [9–11], потенциальный биологический механизм этой связи до сих пор не ясен, что осложнено малой величиной исследованных выборок, отсутствием адекватной контрольной группы, а также тем, что процедуры ВРТ могут различаться в разных клиниках, и объединение данных не всегда корректно. Более того, до сих пор неясно, вызваны ли наблюдаемые нарушения в развитии индивидуумов, рожденных с применением ВРТ, именно применением репродуктивных технологий как таковых, или они обусловлены характерными особенностями субфертильности пар, в отношении которых применяли ВРТ, в частности, наличием у них хронических заболеваний [16–18]. В недавней обзорной статье был проведен анализ соответствующих исследований по наблюдению за детьми, рожденными после применения ВРТ, и сделано заключение о том, что данные достаточно противоречивы и пока их недостаточно для того, чтобы сделать окончательный вывод о возможных последствиях этих процедур на здоровье потомков [19].

В связи с этим более предпочтительным является использование животных моделей для изучения РАС, в частности, влияния ВРТ на проявление характерных для этих расстройств особенностей поведения. Различные линии мышей, несущие модифицированные гены, ассоциированные с РАС, моделируют определенные эндотипы, характерные для аутизма [20–22]. Между тем мыши линии ВТВВ, которые характеризуются выраженной гиперактивностью, стереотипией, нарушением социального поведения, дефицитом пространственного обучения и памяти, признаны в качестве идиопатической модели аутизма, их часто исследуют с целью изучения причин возникновения и последствий РАС, а также механизмов, лежащих в основе этих заболеваний [23–27].

Исследования, выполненные на различных линиях мышей, показали, что применение репродуктивных технологий сопровождается нарушением различных форм поведения у потомков [28–31]. Несмотря на то, что ВРТ применяли по отно-

шению к мышам линии BTBR ранее [32], исследования влияния этих процедур на поведение рожденных после применения ВРТ потомков до сих пор проведено не было. Целью данной работы было изучение эффектов применения такой ключевой репродуктивной технологии, как культивирование *in vitro* на социальное поведение потомков мышей линий C57BL/6J и BTBR T+Itpr3tf/J.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и дизайн эксперимента

В эксперименте были использованы две линии мышей: C57BL/6J (39 самцов и 47 самок) и BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR: 35 самцов и 44 самки), которых содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, США): 34.3 см × 29.2 см × 15.5 см, при температуре 22–24°C и влажности 40–50%, с инвертированным 12:12-часовым циклом дня:ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстила использовали березовую щепу, фракционную для содержания лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Животные имели постоянный доступ к автоклавированному стандартизированному комбикорму для лабораторных крыс и мышей “Дельта Фидс” ЛБК 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 (БиоПро, Россия) и очищенной воде “Северянка”, обогащенной минеральными добавками (Экопроект, Россия). Животных содержали в группах по три–пять особей одного пола. Для получения потомства самок отбирали по стадиям эстрального цикла, которые определяли цитологическим исследованием мазков из влагалища. Самок, находящихся в проэструсе либо эструсе, подсаживали индивидуально к фертильным самцам той же линии. Матерей с потомством содержали в отдельных клетках. Для создания гнезда самки использовали подстил; дополнительные материалы в клетку не вносили. Отсадку потомства от матери проводили в возрасте 21-го дня.

Были сформированы четыре экспериментальные группы из потомков мышей двух линий, полученных как путем естественного спаривания, так и после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов самкам-реципиентам. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1:

1) группа C57BL/6J – самцы и самки линии C57BL/6J, полученные путем естественного спаривания. Было рождено 12 выводков от 12 самок из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (24 самца и 28 самок);

2) группа ВРТ-C57BL/6J – самцы и самки линии C57BL/6J, полученные после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов линии C57BL/6J самкам-реципиентам C57BL/6J. Было рождено 8 выводков от 8 самок-реципиентов, из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (15 самцов и 19 самок);

3) группа BTBR – самцы и самки линии BTBR, полученные после естественного спаривания. Было рождено 11 выводков от 11 самок, из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (20 самцов и 20 самок);

4) группа ВРТ-BTBR – самцы и самки линии BTBR, полученные после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов линии BTBR самкам-реципиентам C57BL/6J. Было рождено 12 выводков от 12 самок-реципиентов, из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (15 самцов и 24 самки).

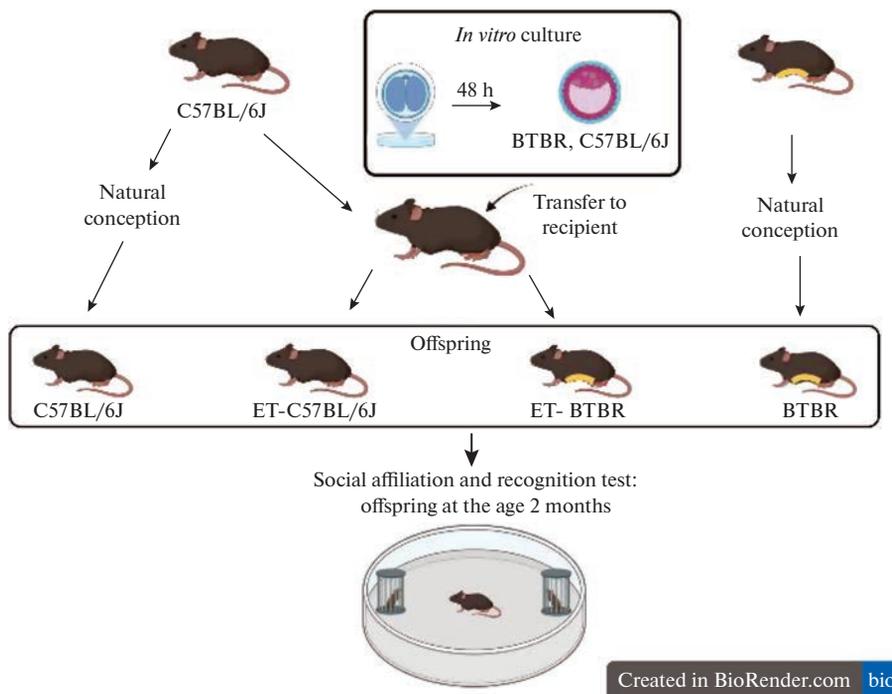


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам.

Получение и культивирование преимплантационных эмбрионов

Самкам мышей линии C57BL/6J ($n = 8$) и BTBR ($n = 12$) в возрасте 2–3 мес. вводили 5 МЕ хорионического гонадотропина лошади (Фоллигон; Intervet international, B.V., Нидерланды) и через 45–48 ч 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (Хорулон; Intervet international, B.V., Нидерланды), затем их ссаживали с фертильными самцами тех же линий ($n = 7$ и $n = 7$ соответственно). Подтверждали спаривание наличием влажной пробки, а день ее обнаружения считали первым днем беременности.

Для получения эмбрионов на стадии двух клеток самок-доноров эмбрионов подвергали эвтаназии путем ингаляции углекислого газа на следующий день после обнаружения влажной пробки. Брюшную полость самки-донора вскрывали, извлекали репродуктивные органы, яйцеводы отделяли от яичника и матки, затем матку и выделенные яйцеводы помещали на 90-миллиметровую чашку Петри (Corning, США) в 100 мкл капли предварительно прогретой до 37°C среды FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Яйцеводы промывали этой же средой, эмбрионы отмывали от дебриса, проводя по трем 50-микромиллиметровым каплям среды FertiCult™ Flushing, а затем оценивали их качество при помощи стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия) по критериям, описанным ранее [33]. Эмбрионы низкого качества: с поврежденными прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*), с неравномерным дроблением бластомеров и/или с фрагментациями (более 25%) отбраковывали [33]. Эмбрионы высокого качества: с неповрежденными прозрачными оболочками и без видимых дефектов (не более 25% поврежденных бластомеров)

помещали в среду для культивирования KSOM (EmbryoMax; Merck, Германия) в CO₂-инкубатор Galaxy 48R NewBrunswick (Eppendorf, Германия). Эмбрионы культивировали в группах по 6–10 в чашках Петри диаметром 35 мм (Corning, США) в течение 48 ч. Непосредственно перед переносом в матку самки-реципиента развитие эмбрионов оценивали визуально с помощью стереомикроскопа S8 APO.

Подготовка суррогатных матерей и перенос эмбрионов

За две недели до начала эксперимента проводили операцию вазэктомии у гибридных самцов CD1×C57BL/6J ($n = 7$) в возрасте 5 нед. Операцию проводили стандартным способом, как описано ранее [31, 34]. Для получения псевдобеременных самок проводили стерильное спаривание между вазэктомизированными гибридными самцами и самками-реципиентами линии C57BL/6J ($n = 20$) в возрасте 2.5–3 мес. на стадии проэструс/эструс, которые определяли цитологическим исследованием мазков из влагалища. День обнаружения влагалищной пробки у реципиентов считали первым днем псевдобеременности.

Бластоцисты после культивирования *in vitro* переносили в матку самки-реципиента на третий день псевдобеременности (в среднем по 10 эмбрионов на животное). Таким образом, имел место асинхронный перенос эмбрионов (стадия развития эмбрионов на 1.5–2 сут. опережала стадию развития эндометрия). Как показано ранее, это обеспечивает достаточную эффективность при переносе эмбрионов у грызунов [34, 35].

Операцию по переносу эмбрионов в матку проводили согласно стандартной методике [35]. Для анестезии самке-реципиенту внутривенно вводили 0.01 мг на мышшь медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин вводили внутримышечно 5 мг на мышшь кетамина гидрохлорида (Кетамин, 50 мг/мл; Апи-Сан, Россия). Затем подкожно делали инъекцию антибиотика – 0.01 мл амоксициллина (тригидрат амоксициллина, 150 мг/мл). Готовили операционное поле согласно правилам асептики: шерсть в области операционного поля сбрасывали, а кожу обрабатывали 70%-ным раствором этанола. Накрывали операционное поле стерильной салфеткой с отверстием для доступа. Применяли правосторонний вертикальный оперативный доступ: кожу и лежащий под ней мышечный слой в области матки разрезали дорзовентрально, 3 мм от нижних ребер в каудальном направлении. Висцеральный жир вместе с яичником, яйцеводом и верхней частью матки захватывали пинцетом и доставали наружу. В правом роге матки делали прокол с помощью стерильной иглы 27 G, затем 6–10 эмбрионов переносили стеклянным капилляром в матку через сделанное отверстие в 2 мкл среды FertiCult™ Flushing. Разрез зашивали и обрабатывали антибиотиком (амоксициллина тригидрат) и антисептиком (ацербин).

Тест “социальная мотивация и распознавание”

Исследование социального поведения животных четырех групп C57BL/6J, BPT-C57BL/6J, ВТВР, BPT-ВТВР проводили в возрасте двух месяцев. Каждое животное помещали в чистую индивидуально вентилируемую клетку за 2 дня до оценки поведения. Поверхности оборудования для тестирования протирали после каждого животного 70%-ным раствором этанола для удаления запаховых меток. Время проведения испытания с 16:00 до 18:00, что совпадало с началом темного времени суток в комнате содержания животных (16:00), то есть в период наибольшей активности животных. Использовали установку, предназначенную для проведения теста “открытое поле” (OpenScience, Россия), которая представляет собой круглую арену диаметром 60 см из белого поливинилхлорида, огороженную стен-

кой высотой 30 см, на полу которой были размещены металлические контейнеры с отверстиями. Расстояние между контейнерами составляло 42 см. Помещение для проведения экспериментов было освещено лампой накаливания 100 Вт; при этом свет был направлен в сторону от поверхности арены, для уменьшения тревожности, испытываемого животным. Регистрацию поведения проводили два исследователя вручную.

В тесте “социальная мотивация и распознавание” было исследовано: C57BL/6J (24 ♂ и 28 ♀); BPT-C57BL/6J (14 ♂ и 15 ♀); BTBR (20 ♂ и 20 ♀); BPT-BTBR (15 ♂ и 23 ♀). Данный тест является одним из способов оценки социального поведения у лабораторных животных. Исследование было выполнено в соответствии с описанным ранее протоколом [36] и состояло из трех этапов:

1) “адаптация” – для того, чтобы животное привыкло к условиям тестирования, его за хвост плавно помещали в центр арены на 5 мин; при этом располагали тело так, чтобы передняя его часть не была направлена ни на один из контейнеров. Никакого поведения за этот период не фиксировали;

2) “сессия 1” (социальная мотивация) – в “контейнер 1” помещали незнакомую мышь той же линии, пола, возраста и массы тела, что и исследуемое животное (“партнер 1”), в “контейнер 2” – нейтральный объект (черный металлический зажим высотой 4.5 см и шириной 2.5 см, что соответствует среднему размеру мыши в положении сидя, который не должен был иметь для животного сильного запаха). В качестве контейнеров были использованы металлические сетчатые емкости прямоугольной формы высотой 11 см и шириной 8 см. Животное могло видеть и даже частично обнюхать находящийся в контейнере объект, но не имело прямого контакта с ним. Тестируемое животное помещали в центр установки. В течение 10 мин регистрировали продолжительность и число контактов исследуемой мыши с незнакомым партнером и нейтральным объектом (нахождение животного не более чем в 7 см от контейнера, что, как правило, сопровождалось его обнюхиванием), а также время, проведенное в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими партнера 1 или нейтральный объект). Рассчитывали “индекс социальной мотивации” по следующей формуле:

$$1 - \left(\frac{\text{Время рядом с нейтральным объектом}}{\text{Время рядом с нейтральным объектом} + \text{время рядом с партнером 1}} + \frac{\text{Число подходов к нейтральному объекту}}{\text{Число подходов к нейтральному объекту} + \text{число подходов к партнеру 1}} \right) / 2.$$

В качестве основы была использована формула для вычисления индекса тревожности [37], где были произведены следующие замены: 1) “время в открытых рукавах” на “время рядом с нейтральным объектом”; 2) “общее время в лабиринте” на “суммарное время рядом с нейтральным объектом и партнером 1”; 3) “число заходов в открытые рукава” на “число подходов к нейтральному объекту”; 4) “общее число заходов во все рукава” на “суммарное число подходов к нейтральному объекту и партнеру 1”.

3) “сессия 2” (социальное распознавание) – в “контейнере 2” нейтральный предмет заменяли незнакомой мышью (“партнер 2”). Соответственно в “сессии 2”, тестируемому животному предлагали уже знакомого “партнера 1” и нового “партнера 2”, которых помещали в два контейнера. В течение 10 мин регистрировали продолжительность и число контактов исследуемой мыши со знакомым “партнером 1” и с новым “партнером 2”, а также время, проведенное в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими первого либо второго партнера). Рассчитывали “индекс социального распознавания” по следующей формуле:

$$1 - \left(\frac{\text{Время рядом с партнером 1}}{\text{Время рядом с партнером 1} + \text{время рядом с партнером 2}} + \frac{\text{Число подходов к партнеру 1}}{\text{Число подходов к партнеру 1} + \text{число подходов к партнеру 2}} \right) / 2.$$

Также в качестве основы была использована формула для вычисления индекса тревожности [37], где были произведены следующие замены: 1) “время в открытых рукавах” на “время рядом с партнером 1”; 2) “общее время в лабиринте” на “суммарное время рядом с первым и вторым партнером”; 3) “число заходов в открытые рукава” на “число подходов к партнеру 1”; 4) “общее число заходов во все рукава” на “суммарное число подходов к первому и второму партнеру”.

Статистический анализ

Анализ результатов проводили с использованием программного пакета STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США) и PAST program (Норвегия). Данные по поведенческим параметрам, таким как время, проведенное с партнером 1, нейтральным объектом, партнером 2 и в одиночестве, а также число подходов к партнерам/объекту представлены в виде ящика с усами, с обозначением медианы (Me) с первым (Q1) и третьим (Q3) квартилями. По этим отдельным поведенческим параметрам в тесте “социальная мотивация и распознавание” внутри каждой из исследуемых групп (C57BL/6J, BPT-C57BL/6J, BTBR и BPT-BTBR) проводили соответствующие попарные сравнения с использованием бутстрепа (bootstrap) с многократной генерацией выборок ($N_{\text{bootstrap}} = 9999$). Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента в сочетании с применением бутстрепа. Данные по индексам социальной мотивации и распознавания были проверены на нормальность с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и представлены в виде средней с ошибкой средней. Сравнение между группами по индексу социальной мотивации в сессии 1 и по индексу социального распознавания в сессии 2 проводили с помощью многофакторного дисперсионного анализа (Factorial ANOVA) по трем факторам: “линия” (C57BL/6J и BTBR), “тип развития” – т.е. условия преимплантационного развития эмбриона (*in vivo/in vitro*) (без BPT и после BPT) и “пол” (самцы и самки), а также последующего *post-hoc* Fisher LSD. Дополнительно к дисперсионному анализу для обоих индексов были вычислены главные компоненты и рассчитаны корреляции с ними всех исходных признаков. Уровень значимости принимали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты тестирования на “социальную мотивацию и распознавание” представлены на рис. 2–5. Статистический анализ показал, что в “сессии 1” самцы группы C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1”, чем с предметом ($p < 0.001$) и чем в одиночестве ($p < 0.001$) (рис. 2а). Также в “сессии 1” самцы C57BL/6J делали больше подходов к “партнеру 1”, чем к предмету ($p < 0.05$) (рис. 4а). В “сессии 2” самцы C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2”, чем с “партнером 1” ($p < 0.05$) (рис. 2а). По числу подходов к “партнеру 1 или 2” в “сессии 2” не было отличий (рис. 4б). Сходное поведение демонстрировали и самки этой группы. В “сессии 1” самки C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1”, чем с предметом ($p < 0.05$) и чем в одиночестве ($p < 0.001$), а также больше времени с предметом, чем в одиночестве ($p < 0.05$) (рис. 3а). В “сессии 2” самки C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2”, чем с “партнером 1” ($p < 0.05$) и чем в одиночестве ($p < 0.01$) (рис. 3а). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4с, 4д).

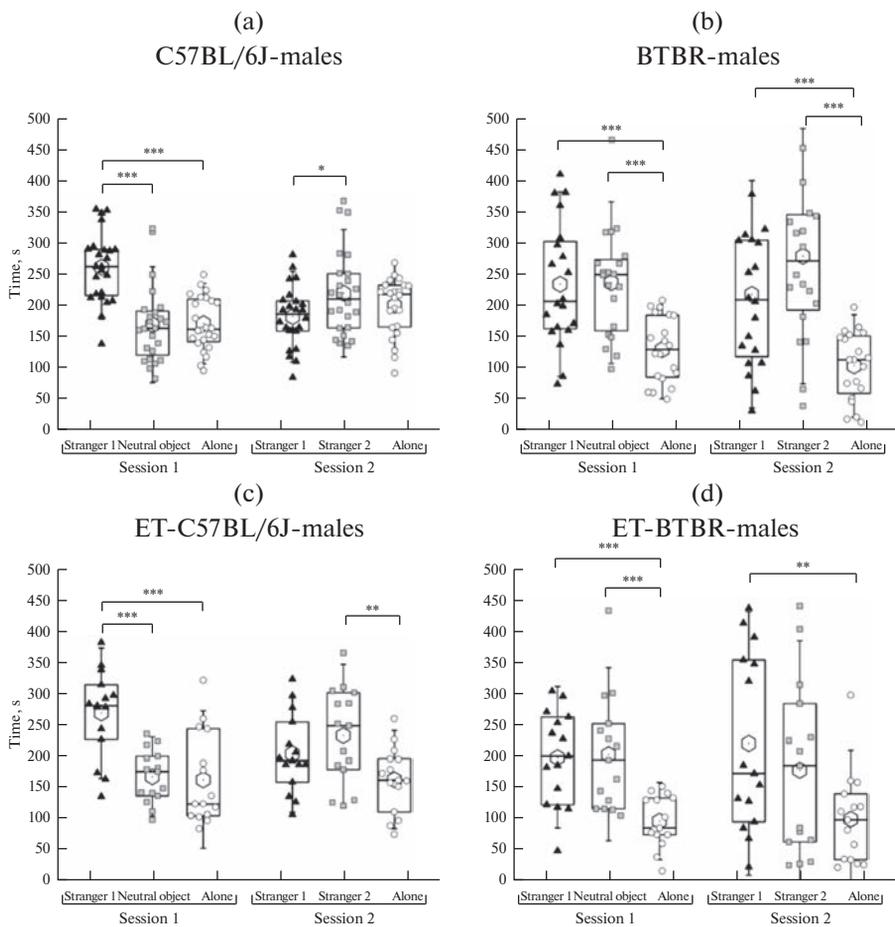


Рис. 2. Социальная мотивация и распознавание самцов линий C57BL/6J и BTBR, полученных естественным спариванием либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J (a), BTBR (b), ET-C57BL/6J (c) и ET-BTBR(d)). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. В сессии 1 и 2 показано время, проведенное с партнером 1; с предметом/партнером 2; в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими партнера 1 или 2 или предмет). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

В “сессии 1” самцы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем с предметом и чем в одиночестве (рис. 2c). В “сессии 2” самцы группы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2” ($p < 0.01$), чем в одиночестве, однако время, проведенное с “партнером 1” и с “партнером 2”, не отличалось (рис. 2c). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4a, 4b). В “сессии 1” самки группы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем с предметом и чем в одиночестве, а также больше времени с предметом ($p < 0.01$), чем в одиночестве (рис. 3c). В “сессии 2” самки группы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2”, чем в одиночестве ($p < 0.01$), однако время, проведенное с “партне-

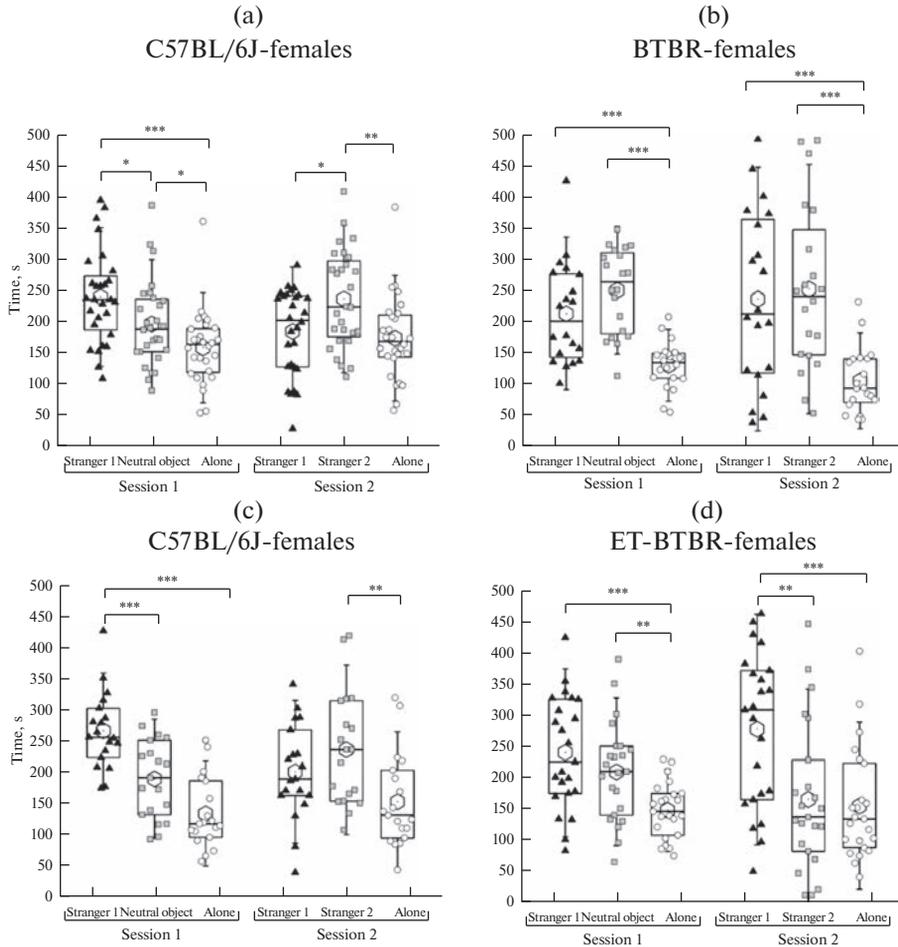


Рис. 3. Социальная мотивация и распознавание самок линий C57BL/6J и BTBR, полученных естественным спариванием либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J (a), BTBR (b), ET-C57BL/6J (c) и ET-BTBR(d)). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. В сессии 1 и 2 показаны время, проведенное с партнером 1; с предметом/партнером 2; в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими партнера 1 или 2 или предмет). * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

ром 1” и с “партнером 2” не отличалось (рис. 3c). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4c, d).

В “сессии 1” самцы и самки BTBR проводили равное время с “партнером 1” и с предметом, причем в одиночестве они проводили меньше времени ($p < 0.001$), чем с “партнером 1” и чем с предметом (рис. 2b, рис. 3b). В “сессии 2” самцы и самки BTBR проводили равное время с “партнером 1” и с “партнером 2”, причем в одиночестве они проводили меньше времени ($p < 0.001$), чем с “партнером 1” и “партнером 2” (рис. 2b, рис. 3b). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4a–4d).

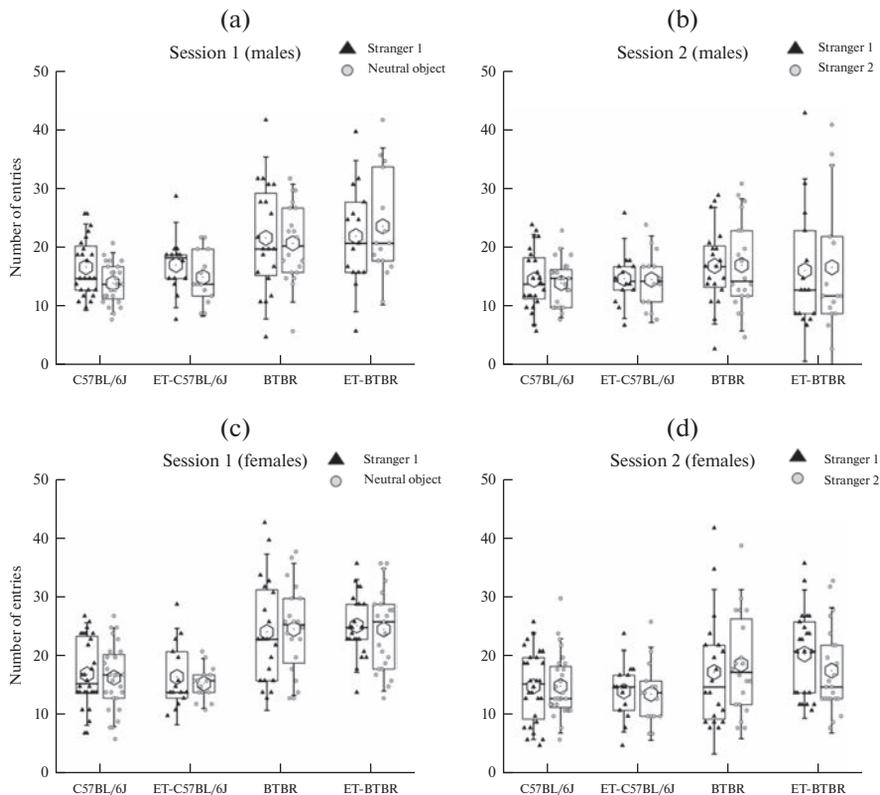


Рис. 4. Социальная мотивация и распознавание самцов и самок линий C57BL/6J и BTBR, полученных естественным спариванием либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J, ET-C57BL/6J, BTBR и ET-BTBR). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. Показаны параметры: число подходов к партнеру 1, число подходов к предмету в сессии 1, а также число подходов к партнеру 1 и число подходов к партнеру 2 в сессии 2. * $p < 0.05$ по сравнению с партнером 1 (Stranger 1) в пределах одной сессии.

В “сессии 1” самцы группы ВРТ-ВТВР проводили равное время с “партнером 1” и с предметом, причем в одиночестве они проводили меньше времени ($p < 0.001$), чем с “партнером 1” и предметом (рис. 2d). В “сессии 2” самцы группы ВРТ-ВТВР проводили равное время с “партнером 1” и с “партнером 2”. При этом они проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем в одиночестве, а время, проведенное с “партнером 2”, не отличалось от времени, проведенного в одиночестве (рис. 2d). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4а, 4б). В “сессии 1” самки группы ВРТ-ВТВР проводили равное время с “партнером 1” и с предметом, причем в одиночестве они проводили меньше времени, чем с “партнером 1” ($p < 0.001$) и предметом ($p < 0.01$) (рис. 3d). В “сессии 2” самки группы ВРТ-ВТВР проводили больше времени с “партнером 1”, чем с “партнером 2” ($p < 0.01$). При этом они проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем в одиночестве, а время, проведенное с “партнером 2”, не отличалось от времени, проведенного в одиночестве (рис. 3d). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4с, 4д).

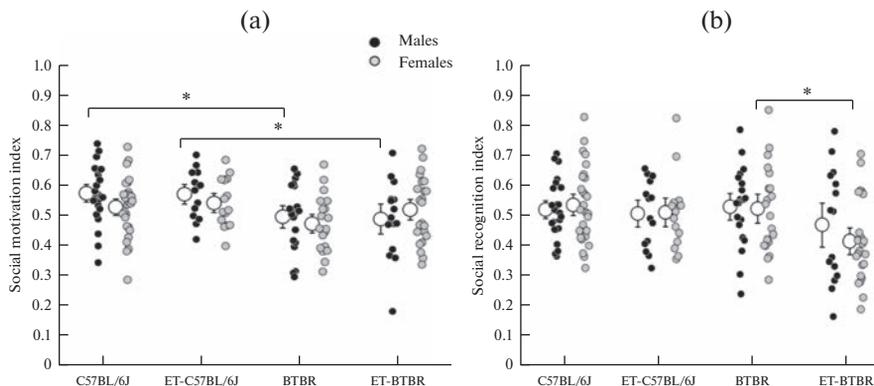


Рис. 5. Индекс социальной мотивации (а) и социального распознавания (б) у самцов и самок линий C57BL/6J и BTBR, полученных в результате естественного спаривания, либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J, ET-C57BL/6J, BTBR и ET-BTBR). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$.

Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора “линия” на индекс социальной мотивации для $F_{(1,157)} = 12.23$; $p < 0.001$. Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора “тип развития” на индекс социального распознавания $F_{(1,157)} = 7.75$; $p < 0.01$.

Многофакторный дисперсионный анализ выявил эффекты влияния “линии” на “индекс социальной мотивации” в “сессии 1” и “тип развития” на “индекс социального распознавания” в “сессии 2” (табл. 1). По фактору “пол”, а также взаимодействию между факторами достоверных отличий обнаружено не было ($p > 0.05$). *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы группы C57BL/6J имели больший “индекс социальной мотивации” ($p < 0.05$) по сравнению с линией BTBR. Самки C57BL/6J имели тенденцию ($p = 0.065$) к увеличению “индекса социальной мотивации” по сравнению с линией BTBR. Самцы группы BPT-C57BL/6J также имели более высокий индекс социальной мотивации ($p < 0.05$) по сравнению с самцами BPT-BTBR (рис. 5a). *Post-hoc* Fisher LSD показал, что у самцов четырех групп “индекс социального распознавания” не отличался, в то время как самки BPT-BTBR имели более низкий “индекс социального распознавания” ($p < 0.01$), чем особи того же пола из группы BTBR (рис. 5b).

Таблица 1. Данные многофакторного дисперсионного анализа

Фактор влияния	Индекс социальной мотивации	Индекс социального распознавания
Линия	$F_{(1,151)} = 12.99$; $p = 0.0004$	$F_{(1,151)} = 2.47$; $p = 0.12$
Тип развития	$F_{(1,151)} = 0.58$; $p = 0.45$	$F_{(1,151)} = 5.62$; $p = 0.02$
Пол	$F_{(1,151)} = 1.03$; $p = 0.31$	$F_{(1,151)} = 0.21$; $p = 0.64$
Линия × Тип развития	$F_{(1,151)} = 0.2$; $p = 0.65$	$F_{(1,151)} = 2.24$; $p = 0.14$
Линия × Пол	$F_{(1,151)} = 1.59$; $p = 0.21$	$F_{(1,151)} = 0.84$; $p = 0.36$
Тип развития × Пол	$F_{(1,151)} = 1.16$; $p = 0.28$	$F_{(1,151)} = 0.48$; $p = 0.49$
Линия × Тип развития × Пол	$F_{(1,151)} = 0.3$; $p = 0.58$	$F_{(1,151)} = 0.17$; $p = 0.68$

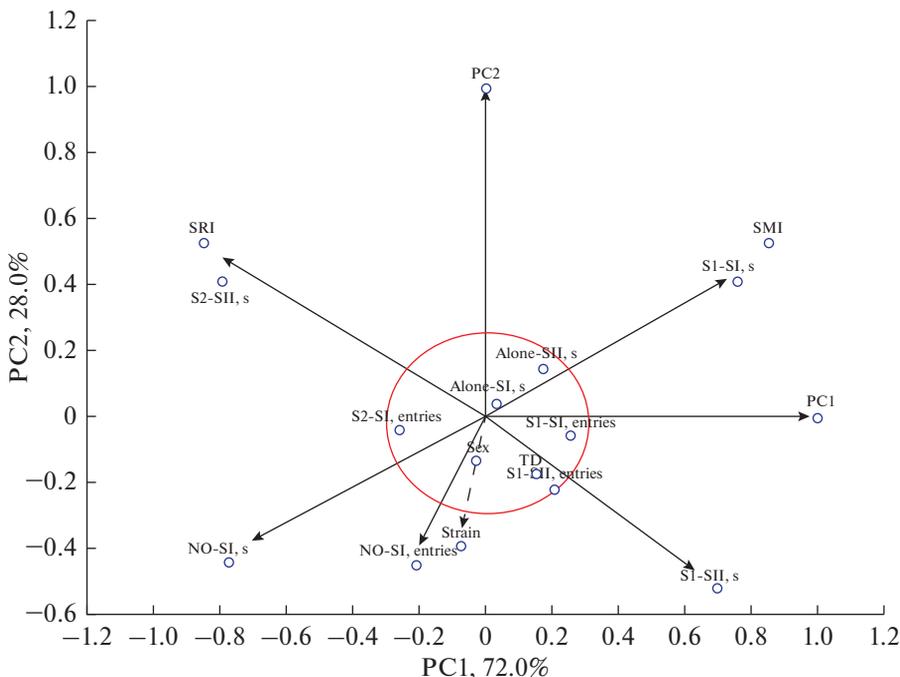


Рис. 6. Проекция признаков на плоскость первых двух главных компонент (PC1, PC2).

За пределами окружности показаны признаки, для которых корреляция с факторами достоверна при $p < 0.001$. **TD** – тип развития; **S1-SI (sec)** – время (с), проведенное рядом с партнером 1 (stranger1) в сессии 1; **NO-SI, (sec)** – время (с), проведенное рядом с предметом в сессии 1; **SMI** – индекс социальной мотивации; **Alone-SI, (sec)** – время (с), проведенное в одиночестве в сессии 1; **S1-SII, (sec)** – время (с), проведенное рядом с партнером 1 (stranger1) в сессии 2; **S2-SII, (sec)** – время (с), проведенное рядом с партнером 2 (stranger2) в сессии 2; **SRI** – индекс социального распознавания; **Alone-SII, (sec)** – время (с), проведенное в одиночестве в сессии 1; **S1-SI, entries** – число подходов к партнеру 1 (stranger1) в сессии 1; **NO-SI, entries** – число подходов к предмету в сессии 1; **S1-SII, entries** – число подходов к партнеру 1 (stranger 1) в сессии 2; **S2-SII, entries** – число подходов к партнеру 2 (stranger 2) в сессии 2.

Признаки, отвечающие за время, проведенное рядом с партнерами и нейтральным объектом (**S1-SI, (sec)**; **NO-SI, (sec)**; **S1-SII, (sec)**; **S2-SII, (sec)**), число подходов к нейтральному объекту в сессии I (**NO-SI, entries**), а также фактор “линия” (“**strain**”) значительно сильнее коррелировали с индексами и полученными из них главными компонентами, чем признаки, отвечающие за число подходов (**S1-SI, entries**; **S1-SII, entries**; **S2-SII, entries**), время, проведенное в одиночестве в обеих сессиях (**Alone-SI, (sec)**; **Alone-SII, (sec)**) и факторы “пол” (“**sex**”), и “тип развития” (“**TD**”) (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Различные нервно-психические заболевания, в том числе расстройства аутистического спектра, характеризуются нарушением социального поведения. Для оценки социального поведения у животных были разработаны тесты, подобные описанному в настоящем исследовании [36, 38]. Используемый нами вариант теста позволяет оценить два важных аспекта социального поведения, такие как социальная мотивация, а также социальное распознавание/новизна. Социальная мотива-

ция определяется как предпочтение проводить время с другой мышью по сравнению со временем, проведенным с нейтральным объектом. Социальное распознавание/новизна определяется как склонность проводить время с ранее незнакомой мышью по сравнению с уже известной тестируемому животному [38]. Нарушение в социальном взаимодействии является ключевым дефицитом при РАС у людей [1], причем одним из компонентов этого нарушения может являться отсутствие предпочтения социальных контактов с новыми людьми по сравнению со знакомыми, т.е. дефицит социального распознавания/новизны [39].

В нашем исследовании было проведено сравнение социального взаимодействия у мышей двух линий: C57BL/6J и BTBR, последняя является признанной идиопатической моделью РАС [40]. В отличие от мышей C57BL/6J, и самцы, и самки линии BTBR уделяли одинаковое время и партнеру, и нейтральному предмету в “сессии 1” теста, а в “сессии 2” эти мыши равное время уделяли новому и знакомому партнеру. Более того, самцы BTBR имели низкий индекс социальной мотивации по сравнению с мышами C57BL/6J. Наши данные согласуются с результатами недавнего исследования, в котором было показано, что индекс социального взаимодействия был снижен и у самцов, и у самок BTBR по сравнению с мышами линии C57BL/6J [27]. Более ранние исследования также указывают на то, что мыши линии BTBR менее социальны в сравнении с мышами C57BL/6J [24–26]. Таким образом, наши результаты, как и данные предыдущих исследований свидетельствуют о снижении социальных взаимодействий у мышей BTBR, это согласуется с мнением о том, что эта линия является адекватной моделью РАС человека [40].

Исследования на различных линиях мышей показали, что применение ВРТ может сопровождаться изменением различных форм поведения у потомков. В частности, у таких потомков изменяется уровень тревожности и социальное поведение, а также нарушается пространственная память [28–31]. В настоящем исследовании тест на социальное поведение показал, что в “сессии 1” самцы и самки группы ВРТ-C57BL/6J, как и естественно зачатые, уделяли больше времени “партнеру 1”, чем нейтральному предмету, что свидетельствует о высокой социальной мотивации. Однако в “сессии 2” самцы и самки ВРТ-C57BL/6J стали уделять равное время новому и знакомому партнеру по сравнению с естественно зачатыми животными, служащими контролем, что может свидетельствовать о снижении у них социального распознавания. Ранее проведенное исследование показало, что самки линии C57BL/6N, полученные после переноса эмбрионов без культивирования *in vitro*, также имели изменения в социальном поведении, однако они, наоборот, уделяли больше внимания новому партнеру [31]. Возможно, такого рода противоречие обусловлено дополнительным эффектом, который оказала процедура культивирования *in vitro*, этой процедуры не было произведено в цитируемой выше в работе [31]. Другой причиной может являться то, что в цитируемой работе трансплантация зародышей была осуществлена в яйцевод [31], а в нашем исследовании – в рог матки. Как было показано ранее на мышах линии CD1, поведение потомков, полученных после переноса эмбрионов в яйцевод либо в рог матки, может различаться [30]. В частности, перенос эмбрионов в рог матки самкам-реципиентам вызывал повышение уровня тревожности у рожденных потомков, тогда как подсаживание эмбрионов в яйцевод таких изменений в поведении не вызывало [30]. Между тем, как в нашем исследовании, так и в цитированной выше работе [31], применение ВРТ повлияло преимущественно на поведение потомков-самок. Это может быть связано с тем, что уровень транскрипции большого числа генов различается у преимплантационных эмбрионов мышей разного пола [41, 42]. Кроме того, на этапе преимплантационного развития возникают эпигенетические различия между полами, в частности, сообщалось о том, что эмбрионы мыши разного пола отличаются по скорости развития и метаболическим особенностям; это может обуслови-

вать различия в проявлении отдаленных эффектов у потомков разного пола, вызываемые культивированием *in vitro* [43–46].

Изменения в социальном поведении были обнаружены и у потомков линии ВТВР, однако проявление этих эффектов было отличным от такового у мышей С57BL/6J. В “сессии 1” самцы и самки группы ВРТ-ВТВР уделяли одинаковое время и партнеру, и нейтральному предмету. Однако в “сессии 2” самцы ВТВР равное время уделяли новому и знакомому партнеру, а самки – больше знакомому “партнеру 1”, чем новому. Кроме того, в отличие от эффектов ВРТ на мышей С57BL/6J, индекс социального распознавания был меньше у самок ВРТ-ВТВР по сравнению с естественно рожденными животными, что может свидетельствовать о снижении у них интереса к новому партнеру и социального взаимодействия в целом. Наши результаты хорошо согласуются с результатами более раннего исследования, показавшего, что поведение может по-разному меняться у потомков, полученных после применения ВРТ, в зависимости от линии мышей [29]. В частности, было показано, что потомки мышей DBA/2J, рожденные после культивирования *in vitro* эмбрионов, менее тревожные, чем линии СЗН/HeN [29].

Изменения в социальном поведении мышей, обнаруженные в нашей работе, могут быть связаны с нарушениями эпигенетического характера при развитии эмбрионов в условиях *in vitro*. В частности, некоторые исследования показали, что существуют изменения уровня метилирования и экспрессии некоторых генов у преимплантационных эмбрионов мышей, культивированных *in vitro* на различных питательных средах, по сравнению с эмбрионами, развивающимися *in vivo* [47, 48]. Такого рода нарушения могут иметь отдаленные последствия, в том числе для развития нервной системы. В головном мозге потомков мышей, рожденных после применения ВРТ, было обнаружено снижение синтеза некоторых белков, в частности, Tuba1c, Crk и Psma3, что, как полагают авторы, связано с эпигенетическими изменениями [48]. Также у самцов мышей, полученных после культивирования *in vitro* эмбрионов, выявлено снижение некоторых нейротрофинов (BDNF, GDNF и NGF) в префронтальной коре и гиппокампе [49]. По нашим неопубликованным данным, у мышей с нокаутом по кальсину-2 (Clstn2-KO), которых можно рассматривать как модельный объект для изучения РАС, было выявлено, что такие процедуры, как культивирование *in vitro* эмбрионов, оказывают влияние на плотность нейронов в префронтальной коре и гиппокампе, а также на нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа. Можно предположить, что описанные нарушения в головном мозге, вызванные эпигенетическими изменениями после применения процедур ВРТ, связанных с культивированием *in vitro* эмбрионов, могут отразиться на развитии головного мозга в целом и на поведении потомков, в частности, на социальном взаимодействии.

В настоящем исследовании мы показали, что культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов может влиять на социальное распознавание у самок мышей обеих линий, рожденных после применения этих процедур, причем у мышей ВТВР (модели РАС) эти нарушения были более выражены. Подобные половые различия были также обнаружены в исследованиях на людях, рожденных после применения ВРТ, где девочки имели более высокий риск возникновения РАС по сравнению с мальчиками [50, 51]. Полученный результат имеет важное значение для медицины, поскольку до сих пор нет четких подтверждений, оказывают ли процедуры ВРТ негативное влияние на развитие заболеваний нервной системы, в частности, РАС. Несмотря на то, что существуют мета-анализы, где описаны отклонения в развитии нервной системы [13, 14] у детей, рожденных после применения ВРТ, и в том числе частоты возникновения РАС [9–11], сложно сделать однозначный вывод о влиянии данных процедур [12]. Поэтому эксперименты, направленные на изучение поведения потомков, полученных после различных процедур

ВРТ на животных, с продуманным дизайном и однородной выборкой, вносят важный вклад в изучение отдаленных последствий ВРТ на здоровье потомства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе было выявлено, что как у самцов, так и у самок ВТBR нарушено социальное поведение по сравнению с мышами линии C57BL/6J. Кроме того, в нашем исследовании показано, что культивирование преимплантационных эмбрионов *in vitro* приводит к характерным изменениям социального поведения мышей линий C57BL/6J и ВТBR, а именно — к снижению социального распознавания у самок обеих линий. Эпигенетические нарушения развития при культивировании преимплантационных эмбрионов *in vitro* могут быть основным механизмом, приводящим к наблюдаемым поведенческим изменениям у потомков. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была частично профинансирована из бюджетного проекта № FWNR-2022-0002 Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00162). Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Авторы выражают благодарность В.М. Ефимову за консультации и помощь в статистической обработке результатов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — С.Я.А., И.Н.Р., Т.Н.И., Е.Ю.Б., В.А.Н., получение, культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов, проведение поведенческих экспериментов — И.Н.Р., С.В.О., Т.Н.И., Т.А.Р., Д.А.Л., В.С.К., Я.Т.А., обработка результатов — С.В.О., Е.Ю.Б., Т.А.Р., С.Я.А., написание и редактирование рукописи — С.Я.А, С.В.О., Е.Ю.Б., Т.Н.И.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *American Psychiatric Association (APA)* (2013) Autism spectrum disorder, diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fifth ed. Am Psychiatric Publ. Arlington. VA. 50–59.
2. *Kodak T, Bergmann S* (2020) Autism spectrum disorder: characteristics, associated behaviors, and early intervention. *Pediatr Clin North Am* 67: 525–535.
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2020.02.007>
3. *Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI* (2015) Autism spectrum disorder — a complex genetic disorder. *Folia Med (Plovdiv)* 57: 19–28.
<https://doi.org/10.1515/folmed-2015-0015>
4. *Waye MMY, Cheng HY* (2017) Genetics and epigenetics of autism: a review. *Psychiatry Clin Neurosci* 72: 228–244.
<https://doi.org/10.1111/pcn.12606>

5. Yang G, Shcheglovitov A (2020) Probing disrupted neurodevelopment in autism using human stem cell-derived neurons and organoids: An outlook into future diagnostics and drug development. *Dev Dyn* 249: 6–33.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.100>
6. Girault JB, Piven J (2020) The Neurodevelopment of autism from infancy through toddlerhood. *Neuroimaging Clin N Am* 30: 97–114.
<https://doi.org/10.1016/j.nic.2019.09.009>
7. Ramos-Ibeas P, Heras S, Gomez-Redondo I, Planells B, Fernandez-Gonzalez R, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Perez-Cerezales S, Gutierrez-Adan A (2019) Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev* 86: 1292–1306.
<https://doi.org/10.1002/mrd.23119>
8. Berntsen S, Soderstrom-Anttila V, Wennerholm U-B, Laivuori H, Loft A, Oldereid NB, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A (2019) The health of children conceived by ART: “the chicken or the egg?” *Hum Reprod Update* 25: 137–158.
9. Sandin S, Nygren KG, Iliadou A, Hultman CM, Reichenberg A (2013) Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization. *JAMA* 310: 75–84.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.7222>
10. Kissin DM, Zhang Y, Boulet SL, Fountain C, Bearman P, Schieve L, Yeargin-Allsopp M, Jamieson DJ (2015) Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children. *Hum Reprod* 30: 454–465.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deu338>
11. Liu L, Gao J, He X, Cai Y, Wang L, Fan X (2017) Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a meta-analysis. *Sci Rep* 7: 46207.
<https://doi.org/10.1038/srep46207>
12. Andreadou MT, Katsaras GN, Talimtzis P, Doxani C, Zintzaras E, Stefanidis I (2021) Association of assisted reproductive technology with autism spectrum disorder in the offspring: an updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Pediatr* 180: 2741–2755.
<https://doi.org/10.1007/s00431-021-04187-9>
13. Rumbold AR, Moore VM, Whitrow MJ, Oswald TK, Moran LJ, Fernandez RC, Barnhart KT, Davies MJ (2017) The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: a systematic review. *Hum Reprod* 32: 1489–1507.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dex085>
14. La Rovere M, Franzago M, Stupia L (2019) Epigenetics and neurological disorders in ART. *Int J Mol Sci* 20: 4169.
<https://doi.org/10.3390/ijms20174169>
15. Sunde A (2019) Embryo culture and phenotype of the offspring. *In Vitro Fertilization*: 877–889.
16. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH (2014) Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 12: 22.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-22>
17. Pontesilli M, Painter RC, Grooten IJ, van der Post JA, Mol BW, Vrijkotte TG, Repping S, Roseboom TJ (2015) Subfertility and assisted reproduction techniques are associated with poorer cardiometabolic profiles in childhood. *Reprod Biomed Online* 30: 258–267.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.11.006>
18. Dayan N, Lanes A, Walker MC, Spitzer KA, Laskin CA (2016) Effect of chronic hypertension on assisted pregnancy outcomes: a population-based study in Ontario, Canada. *Fertil Steril* 105: 1003–1009.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.039>
19. Bergh C, Wennerholm UB (2020) Long-term health of children conceived after assisted reproductive technology. *Ups J Med Sci* 125: 152–157.
<https://doi.org/10.1080/03009734.2020.1729904>
20. Banerjee S, Riordan M, Bhat MA (2014) Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front Cell Neurosci* 8: 58.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00058>
21. Kazdoba TM, Leach PT, Crawley JN (2016) Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes Brain Behav* 15: 7–26.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12256>
22. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR (2017) Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol* 134: 537–566.
<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>
23. Pobbe RL, Defensor EB, Pearson BL, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ (2011) General and social anxiety in the BTBR T+ tf/J mouse strain. *Behav Brain Res* 216: 446–451.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.039>

24. Langley EA, Krykbaeva M, Blusztajn JK, Mellott TJ (2015) High maternal choline consumption during pregnancy and nursing alleviates deficits in social interaction and improves anxiety-like behaviors in the BTBR T+Itp3tf/J mouse model of autism. *Behav Brain Res* 278: 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.043>
25. Amodeo DA, Pahua AE, Zarate M, Taylor JA, Peterson S, Posadas R, Oliver BL, Amodeo LR (2019) Differences in the expression of restricted repetitive behaviors in female and male BTBR T + tf/J mice. *Behav Brain Res* 372: 112028. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112028>
26. Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, Alqahtani F, Alhoshani AR, Alasmari F, Alsaleh NB, Attia SM (2020) 5-aminoisoquinolinone attenuates social behavior deficits and immune abnormalities in the BTBR T+ Itp3tf/J mouse model for autism. *Pharmacol Biochem Behav* 189: 172859. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172859>
27. Reshetnikov VV, Ayriyants KA, Ryabushkina YA, Sozonov NG, Bondar NP (2021) Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early-life stress in C57BL/6 and BTBR mice. *Behav Brain Res* 414: 113489. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113489>
28. Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM (2004) Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1595–1600. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306846101>
29. Rose C, Schwegler H, Hanke J, Rohl FW, Yilmazer-Hanke DM (2006) Differential effects of embryo transfer and maternal factors on anxiety-related behavior and numbers of neuropeptide Y (NPY) and parvalbumin (PARV) containing neurons in the amygdala of inbred C3H/HeN and DBA/2J mice. *Behav Brain Res* 173: 163–168.
30. Lopez-Cardona AP, Fernandez-Gonzalez R, Perez-Crespo M, Alen F, de Fonseca FR, Orio L, Gutierrez-Adan A (2015) Effects of synchronous and asynchronous embryo transfer on postnatal development, adult health, and behavior in mice. *Biol Reprod* 93: 85. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130385>
31. Lerch S, Tolksdorf G, Schutz P, Brandwein C, Dormann C, Gass P, Chourbaji S (2016) Effects of embryo transfer on emotional behaviors in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55: 510–519.
32. Baan M, Krentz KJ, Fontaine DA, Davis DB (2016) Successful in vitro fertilization and generation of transgenics in Black and Tan Brachyury (BTBR) mice. *Transgenic Res* 25: 847–854. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9974-0>
33. Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramanel J, Englert Y (2000) Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 4: 905–910. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.4.905>
34. Hogan B, Constantiny F, Lacy E (1986) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. N.Y. Spring Harbor Lab.
35. Амстиславский СЯ, Игонина ТН, Рожкова ИН, Брусенцев ЕЮ, Роговая АА, Рагаева ДС, Напримеров ВА, Литвинова ЕА, Плюснина ИЗ, Маркель АЛ (2013) Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловск журн генетики и селекции 17: 147–161. [Amstislavsky SIA, Igonina TN, Rozhkova IN, Brusentsev IM, Rogovaya AA, Ragaeva DS, Naprimerov VA, Litvinova EA, Plusnina IZ, Markel AL (2013) Rederivation by transplantation of embryo lines of laboratory mice and rats. *Vavilov J Genetics and Breeding* 17: 147–161. (In Russ)].
36. Ranneva S, Pavlov K, Gromova A, Amstislavskaya T, Lipina T (2017) Features of emotional and social behavioral phenotypes of calyntenin2 knockout mice. *Behav Brain Res* 332: 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.029>
37. Lee B, Sur B, Cho SG, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH (2016) Ginsenoside Rb1 rescues anxiety-like responses in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Nat Med* 70: 133–144. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0943-3>
38. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR (2011) Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp*: 2473. <https://doi.org/10.3791/2473>
39. Carter MD, Shah CR, Muller CL, Crawley JN, Carneiro AM, Veenstra-VanderWeele J (2011) Absence of preference for social novelty and increased grooming in integrin $\beta 3$ knockout mice: initial studies and future directions. *Autism Res* 4: 57–67. <https://doi.org/10.1002/aur.180>
40. Meyza KZ, Blanchard DC (2017) The BTBR mouse model of idiopathic autism - Current view on mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 76: 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>

41. *Peaston AE, Eysikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, Knowles BB* (2004) Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 7: 597–606.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.004>
42. *Fernandez-Gonzalez R, Ramirez MA, Pericuesta E, Calle A, Gutierrez-Adan A* (2010) Histone modifications at the blastocyst *Axin1* (Fu) locus mark the heritability of *in vitro* culture-induced epigenetic alterations in mice. *Biol Reprod* 83: 720–727.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084715>
43. *Peippo J, Bredbacka P* (1995) Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos *in vivo* and *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 40: 56–61.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080400108>
44. *Perez-Crespo M, Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R, Rizos D, Lonergan P, Pintado B, Gutierrez-Adan A* (2005) Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev* 72: 502–510.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20366>
45. *Gutierrez-Adan A, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Ramirez MA, Moreira P, Pintado B, Lonergan P, Rizos D* (2006) Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reprod Domest Anim* 41(2): 54–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00769.x>
46. *Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A* (2011) Transcriptional sexual dimorphism during preimplantation embryo development and its consequences for developmental competence and adult health and disease. *Reproduction* 141: 563–570.
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0482>
47. *de Waal E, Mak W, Calhoun S, Stein P, Ord T, Krapp C, Coutifaris C, Schultz RM, Bartolomei MS* (2014) In vitro culture increases the frequency of stochastic epigenetic errors at imprinted genes in placental tissues from mouse concepti produced through assisted reproductive technologies. *Biol Reprod* 90: 22.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114785>
48. *Zhu W, Zheng J, Wen Y, Li Y, Zhou C, Wang Z* (2020) Effect of embryo vitrification on the expression of brain tissue proteins in mouse offspring. *Gynecol Endocrinol* 36: 973–977.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1734785>
49. *Qin NX, Zhao YR, Shi WH, Zhou ZY, Zou KX, Yu CJ, Liu X, Dong ZH, Mao YT, Zhou CL, Yu JL, Liu XM, Sheng JZ, Ding GL, Zhao WL, Wu YT, Huang HF* (2021) Anxiety and depression-like behaviours are more frequent in aged male mice conceived by ART compared with natural conception. *Reproduction* 162: 437–448.
<https://doi.org/10.1530/REP-21-0175>
50. *Hvidtjorn D, Grove J, Schendel D, Schieve LA, Svarke C, Ernst E, Thorsen P* (2011) Risk of autism spectrum disorders in children born after assisted conception: a population-based follow-up study. *J Epidemiol Community Health* 65: 497–502.
<https://doi.org/10.1136/jech.2009.093823>
51. *Davidovitch M, Chodick G, Shalev V, Eisenberg VH, Dan U, Reichenberg A, Sandin S, Levine SZ* (2018) Infertility treatments during pregnancy and the risk of autism spectrum disorder in the offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 86: 175–179.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.022>

Effects of Assisted Reproductive Technologies on Social Behavior of BTBR Mice – A Model of Autism Spectrum Disorder

**I. N. Rozhkova^a, S. V. Okotrub^a, E. Yu. Brusentsev^a, T. N. Igonina^a, T. A. Rakhmanova^{a, b},
D. A. Lebedeva^{a, b}, T. A. Yatsuk^a, V. S. Kozeneva^{a, b},
V. A. Naprimerov^a, and S. Ya. Amstislavsky^{a, *}**

^a*Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^{*}*e-mail: amstis@yandex.ru*

The present work is the first attempt to study the effect of such assisted reproductive technologies (ARTs), as in vitro culture of preimplantation embryos on the social behavior of offspring, using BTBR mice (BTBR T+Itpr3tf/J) as an idiopathic model of autism. The C57BL/6J mice were used as controls. Social behavior was studied in adult

offspring mice obtained after *in vitro* culture and embryo transfer (ET) (groups ET-C57BL/6J and ET-BTBR). The BTBR mice demonstrated the reduced levels of social recognition and affiliation compared to C57BL/6J mice. The social affiliation and recognition test revealed that ET-C57BL/6J males had a high level of social interaction, which was of similar magnitude as in naturally conceived C57BL/6J males. However, ET-C57BL/6J and ET-BTBR females demonstrated a decrease in interest to a new stranger compared to naturally conceived controls of the same sex, which was revealed in a social recognition session of this test. Thus, the *in vitro* culture affected the social recognition in the offspring of C57BL/6J and BTBR mice, but only in females.

Keywords: C57BL/6J, BTBR, preimplantation embryos, assisted reproductive technologies, *in vitro* culture, autism spectrum disorder, social behavior

РОЛЬ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ
K_v-КАНАЛОВ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ
ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ

© 2023 г. С. С. Лазуко¹, *, Л. Е. Беляева¹, О. П. Кужель¹

¹*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь*

*E-mail: lazuko71@mail.ru

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 10.02.2023 г.

Цель исследования – изучить вклад супероксидного радикала ($O_2^{\bullet -}$) в механизмы нарушения функциональной активности K_v -каналов коронарных сосудов у крыс с посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР). Исследование выполнено на 117 беспородных белых крысах-самцах (*Rattus*, Muridae) массой 210–240 г. Для воспроизведения экспериментального аналога ПТСР использовали модифицированную модель “имитации присутствия хищника” (контакт с экскрементами кошек 10 дней по 15 мин ежедневно). О наличии ПТСР судили по изменению поведения животных в тесте “Открытое поле”. Тонус коронарных сосудов изучали на сердцах крыс, изолированных по методу Лангендорфа, перфузируемых раствором Кребса–Хензелейта в условиях постоянного потока и сокращающихся в изотоническом режиме. Вклад $O_2^{\bullet -}$ в регуляцию тонуса коронарных сосудов изучали путем введения в перфузионный раствор “ловушки” супероксидного радикала тирона (4,5-дигидрокси-1,3-бензолдисульфоновой кислоты). Функциональную активность K_v -каналов оценивали по степени прироста коронарного перфузионного давления (КПД) при введении блокатора 4-аминопиридина (4-АП). Для выяснения роли $O_2^{\bullet -}$ в механизмах функционирования K_v -каналов изолированного сердца крыс в раствор для перфузии вводили тирон и 4-АП. В сыворотке крови животных спектрофотометрическим методом определяли содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, активность каталазы и супероксиддисмутазы, методом иммуноферментного анализа – концентрацию С-реактивного белка и содержание интерлейкина 1 β (ИЛ-1 β). В изолированных сердцах крыс с ПТСР при объемной скорости коронарного потока 10 мл/мин КПД было на 30% меньше по сравнению с группой “Контроль”. Под влиянием 4-АП КПД увеличивалось на 70% в группе контрольных животных и на 24% в группе “ПТСР”. При добавлении тирона в группе “ПТСР” КПД при объемной скорости коронарного потока 10 мл/мин было ниже на 52% по сравнению с таковым в контроле. В группе “ПТСР + тирон + 4-АП” прирост КПД был сопоставим с таковым в сердцах группы “Контроль” под влиянием 4-АП и составлял 71.5%. В сыворотке крови крыс с ПТСР наблюдалось увеличение концентрации ИЛ-1 β в 3 раза, С-реактивного белка в 1.6 раза, диеновых конъюгатов в 3.3 раза и малонового диальдегида в 3.6 раза при уменьшении активности супероксиддисмутазы и каталазы на 27 и 59% соответственно по сравнению с контролем. В результате проведенных исследований установлено, что при ПТСР

снижается функциональная активность K_V -каналов коронарных сосудов, причем одним из важных механизмов такой “каналопатии” может быть гиперпродукция O_2^- , которая является результатом развития окислительного стресса.

Ключевые слова: ионный канал, тонус сосудов, супероксидный радикал, посттравматическое стрессовое расстройство

DOI: 10.31857/S0869813923030068, **EDN:** FSSONZ

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) представляет собой серьезный и часто инвалидизирующий синдром, развивающийся в ответ на стрессовое событие угрожающего или катастрофического характера. У многих пациентов, у которых изначально развивается это расстройство, впоследствии оно переходит в хроническую форму заболевания, которая в некоторых случаях может длиться много лет и сопровождаться соматическими расстройствами, среди которых – поражение сердечно-сосудистой системы. Аналоги ПТСР описаны и у животных, поэтому они могут быть использованы в качестве объекта исследования этого расстройства для понимания патогенеза симптомов, обусловленных ПТСР, и разработки новых подходов к его лечению [1].

Как в остром, так и в отдаленном периодах ПТСР нередко развиваются ишемические повреждения миокарда, обусловленные коронарospазмом. Одним из его механизмов может быть нарушение функционирования потенциалзависимых калиевых каналов (K_V -каналов) клеток коронарных сосудов. K_V -каналы образуют самое большое семейство калиевых каналов, которые кодируются у человека 40 генами [2]. Функционально K_V -каналы представляют собой гомо- или гетеротетрамерные комплексы, состоящие из шести трансмембранных доменов (S1–S6) и порообразующих α -субъединиц [3]. Положительно заряженные аминокислоты в трансмембранном домене S4 реагируют на изменения мембранного потенциала и служат в качестве потенциалзависимого “сensors” в этом канале [4, 5]. N-концевой домен канала содержит цистеиновые аминокислотные остатки, которые могут образовывать дисульфидные мостики с другой тиоловой группой данного белка и тем самым изменять его конформацию, что может приводить к нарушению функциональной активности K_V -каналов [6]. При действии активных форм кислорода (АФК) сам цистеин может быть окислен до сульфеновой, сульфиновой или сульфоновой кислоты [7]. Деполяризация мембраны клеток сопровождается открытием K_V -каналов, что приводит к выходу ионов K^+ через эти каналы по концентрационному градиенту, далее к гиперполяризации мембраны и, в конечном счете, к расширению сосудов. Модуляция активности этих каналов осуществляется как вазоконстрикторами, так и вазодилаторами [8]. Доказано, что низкие концентрации активных форм кислорода способны активировать K_V -каналы, расположенные в гладкомышечных клетках сосудов, а высокие – подавлять активность этих каналов, это наблюдается, например, при гипергликемии и сахарном диабете [9]. На изолированных сердцах мыши, сокращавшихся в изометрическом режиме при постоянном потоке, было показано, что блокатор 4-аминопиридина (4-АП) приводит к увеличению развиваемого внутрижелудочкового давления. Такое влияние 4-АП авторы объясняют его действием на калиевые каналы, определяющие фазу реполяризации потенциала действия кардиомиоцитов. Предполагают, что более медленная скорость реполяризации во время фазы 1 потенциала действия кардиомиоцитов в присутствии 4-АП приводит к увеличению амплитуды и продолжительности тока Ca^{2+} через каналы L-типа [10], что потенциально может сопровождаться увеличением образования в митохондриях метаболитов с сосудорасширяющим действием. Учитывая этот факт, для минимизации влияния 4-АП на

сократительную функцию миокарда тонус коронарных сосудов изучали на изолированных сердцах крыс, сокращающихся в изотоническом режиме (без введения в левый желудочек латексного баллончика постоянного объема).

Ранее нами было показано, что ПТСР приводит к снижению функциональной активности K_v -каналов [11], однако механизмы нарушения функции этих каналов изучены недостаточно.

В связи с этим, цель исследования – изучить вклад супероксидного радикала в механизмы нарушения функциональной активности K_v -каналов коронарных сосудов у крыс с ПТСР.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 117 беспородных крысах-самцах (*Rattus*, Muridae) массой 210–240 г, разделенных по группам “Контроль” ($n = 46$) и посттравматическое стрессовое расстройство (“ПТСР”) ($n = 39$). Последняя группа была сформирована из экспериментальных животных ($n = 71$), в клетках которых имитировали присутствие хищника. Все животные находились в стандартных условиях вивария (12-часовой световой режим, температура $20 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность 40–60%), получали стандартный рацион и имели свободный доступ к воде. Все экспериментальные исследования были выполнены в первой половине дня. Для воспроизведения экспериментального аналога ПТСР у крыс использовали модифицированную модель “имитации присутствия хищника”, которая в настоящее время считается адекватной моделью ПТСР [12]. Присутствие хищника имитировали путем помещения экскрементов кошек в клетки животных на 15 мин в течение 10 дней, в разное время суток. Следующие 14 дней крысы не подвергались действию стрессора [13]. Поведенческая и исследовательская активность крыс в тесте “Открытое поле” были отслежены и записаны с помощью видео-системы SMART с последующим анализом изучаемых показателей с помощью программного обеспечения SMART 3.0. Признаки ПТСР наблюдались у 55% крыс (таким образом, в эксперименте на изолированном сердце использовалось 20 животных, для биохимического исследования – 19), в клетках которых имитировали присутствие хищника. У крыс с ПТСР обнаружили снижение исследовательской активности и повышение тревожности (уменьшение количества вертикальных стоек на 50%, увеличение времени замирания на 60% и увеличение времени пребывания их в периферической зоне поля на 19%), а также сокращение времени удержания на валике ротарода на 76%, что свидетельствует о нарушении их моторно-координационных функций. Сокращение времени ответной реакции при воздействии на хвост луча от галогеновой лампы у крыс с ПТСР свидетельствует об увеличении их болевой чувствительности. Адекватность используемой модели ПТСР подтверждается и изменением массы стрессореагирующих органов: снижением относительной массы селезенки на 15.4% и увеличением относительной массы надпочечников на 54% (табл. 1).

Животных с признаками ПТСР наркотизировали уретаном (0.1 г/100 г массы тела, внутривенно). После этого вскрывали брюшную полость, пересекали диафрагму и с двух сторон по реберным углам делали 2 разреза, предварительно наложив зажимы Кохера. Переднюю стенку грудной полости отбрасывали к голове; пинцетом захватывали сосудистый пучок сердца и одним движением ножниц его пересекали. Выделенное сердце останавливали в течение нескольких секунд погружением в чашку Петри с охлажденным до 0°C изотоническим раствором. В аорту вводили металлическую канюлю, соединенную с системой перфузии коронарных сосудов.

Тонус коронарных сосудов изучали на изолированных по методу Лангендорфа сердцах, сокращающихся в изотоническом режиме в условиях постоянной объем-

Таблица 1. Масса стресс-реагирующих органов у экспериментальных животных

	Группы экспериментальных животных	
	контроль	ПТСР
Масса селезенки на 100 г массы тела	0.337 ± 0.050 (0.293; 0.365)	0.285 ± 0.020* (0.280; 0.292)
Масса надпочечников на 100 г массы тела	0.015 ± 0.002 (0.015; 0.017)	0.024 ± 0.003* (0.022; 0.026)

Показатели представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей; * $p < 0.05$.

ной скорости коронарного потока (ОСКП). Эксперимент проводили в два этапа. На первом – сердца перфузировали раствором Кребса–Хензелята стандартного состава (мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.8, NaHCO₃ – 25.0, CaCl₂ – 2.5, KH₂PO₄ – 1.2, MgSO₄ – 1.18, глюкоза – 5.5, насыщенным карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂); pH раствора составлял 7.3–7.4 при температуре 37°C. На втором этапе в раствор для перфузии добавляли один из блокаторов либо 4-АП, либо тирон, или их сочетание. Для перфузии сердца использовали установку для изолированных органов мелких лабораторных животных ИH-SR типа 844/1 (HSE-НА, Германия), оборудованную датчиками для измерения аортального давления (Isotec pressure transducer). Компьютерную регистрацию и обработку результатов измерения коронарного перфузионного давления (КПД) при ОСКП, составлявшей 6, 8, 10 и 15 мл/мин, осуществляли при помощи программного обеспечения ACAD (HSE, Германия). Для изучения роли супероксидного радикала в регуляции тонуса коронарных сосудов использовали его “химическую ловушку” – 4,5-дигидрокси-1,3-бензолдисульфоновую кислоту (тирон, Sigma, США), который добавляли в раствор для перфузии изолированного сердца в концентрации 10 мМ. Функциональную активность потенциал-зависимых калиевых каналов (K_v-каналов) оценивали по степени прироста КПД (после повышения КПД рассчитывали процент его прироста от исходной величины) в ответ на введение в перфузионный раствор 4-АП, 1.5 мМ, (Sigma, США), который добавляли в раствор при ОСКП 10 мл/мин, что соответствует диапозону значений хорошо выраженной ауторегуляции коронарного потока [14]. Под термином “функциональная активность” калиевых каналов понимают вклад этих каналов в поддержание базального тонуса коронарных сосудов, который устраняется введением блокатора этих каналов 4-АП. В этих условиях косвенно мы можем судить о функциональной активности исследуемых каналов (чем больше коронароконстрикторный эффект 4-АП, тем больше вклад K_v-каналов, напротив, снижение коронароконстрикторного эффекта под влиянием 4-АП указывает на снижение функциональной активности K_v-каналов) [15]. Для выяснения роли супероксидного радикала в механизмах функционирования K_v-каналов изолированного сердца экспериментальных животных в раствор для перфузии вводили тирон и 4-АП.

В сыворотке крови экспериментальных животных спектрофотометрическим методом определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) [16], малонового диальдегида (МДА) [17], активность каталазы (КАТ) [18] и супероксиддисмутазы (СОД) [19]. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли концентрацию С-реактивного белка, используя диагностический набор (Elabscience Rat hs-CRP (high-sensitivity C-Reactive Protein) ELISA Kit Catalog No: E-EL-R3002 с минимальной определяемой концентрацией вещества 4.69 пг/мл) и содержание интерлейкина 1β (ИЛ-1β) с помощью набора Elabscience Rat IL-1β (Interleukin 1 Beta) ELISA Kit Catalog No: E-EL-R0012 с минимальной определяемой концентрацией вещества 18.75 пг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoftinc., STA999K347156-W) и MS Excel. Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%; 75%]. Проверку отклонения распределения вероятностей от нормального среди изучаемых признаков проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Выбор непараметрических статистических методов обработки данных был обусловлен малыми размерами выборок (экспериментальных групп) и распределением данных, отличным от нормального. При сравнении независимых количественных и качественных признаков в двух группах использовали непараметрический критерий U Манна–Уитни, для одновременных сравнений 3 и более переменных применили непараметрический аналог ANOVA (ранговый однофакторный анализ Краскела–Уоллиса). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5% ($p < 0.05$) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ступенчатое повышение объемной скорости коронарного потока от 6 до 8, затем до 10 и до 15 мл/мин приводило к закономерному увеличению коронарного перфузионного давления в сердцах животных группы “Контроль” и составило: 30.0 (24.7; 30.2); 36.5 (35.2; 48.2); 79.5 (78.7; 86.5); 119.0 (113.7; 123.2) мм рт. ст. соответственно. В сердцах крыс с посттравматическим стрессовым расстройством (группа “ПТСР”) повышение ОСКП в диапазоне от 6 до 15 мл/мин также приводило к повышению коронарного перфузионного давления. Однако значения КПД в сердцах группы “ПТСР” были ниже, чем в сердцах группы “Контроль”: при ОСКП 10 мл/мин – на 30%, а при ОСКП 15 мл/мин – на 8% (рис. 1а). Таким образом, в сердцах животных с ПТСР наблюдалось снижение тонуса коронарных сосудов.

Перфузия сердец группы “Контроль” раствором с “ловушкой” супероксидного радикала тироном (“Контроль + тирон”) также сопровождалась закономерным приростом КПД при повышении ОСКП от 6 до 15 мл/мин. Однако КПД при ОСКП 10 и 15 мл/мин было меньше на 46 и 36% соответственно, чем в контроле при аналогичных уровнях (рис. 1б). Этот факт указывает на то, что супероксидный радикал, постоянно образующийся в гладкомышечных клетках и эндотелиоцитах коронарных сосудов в физиологических условиях, играет важную роль в механизмах, обеспечивающих поддержание должного тонуса сосудов сердца, а устранение действия $O_2^{\cdot -}$ сопровождается снижением тонуса коронарных сосудов.

При перфузии сердец крыс группы “ПТСР” с добавлением в раствор тирона (“ПТСР + тирон”) КПД закономерно выросло при увеличении ОСКП от 6 до 15 мл/мин. Однако значения КПД при всех уровнях ОСКП были снижены на 20, 18, 52 и 51% по сравнению с аналогичными уровнями ОСКП в контроле, что свидетельствовало о снижении тонуса коронарных сосудов в группе “ПТСР + тирон” (рис. 1с). Показатели КПД группы “ПТСР + тирон”, в сравнении с группой “ПТСР”, при ОСКП 8, 10, 15 мл/мин были ниже на 25, 32 и 46% соответственно, как и в сравнении с группой “Контроль + тирон”, при аналогичных уровнях ОСКП на 10, 12, 23% соответственно (рис. 1с). Вероятно, увеличение вазодилатирующего эффекта тирона на коронарные сосуды сердец (и, как следствие, снижение тонуса сосудов), выделенных из организмов животных с ПТСР, может свидетельствовать об увеличении продукции супероксидного радикала в клетках коронарных сосудов в этих условиях. Пример оригинальных записей показателей датчика для измерения коронарного перфузионного давления представлен на рис. 2.

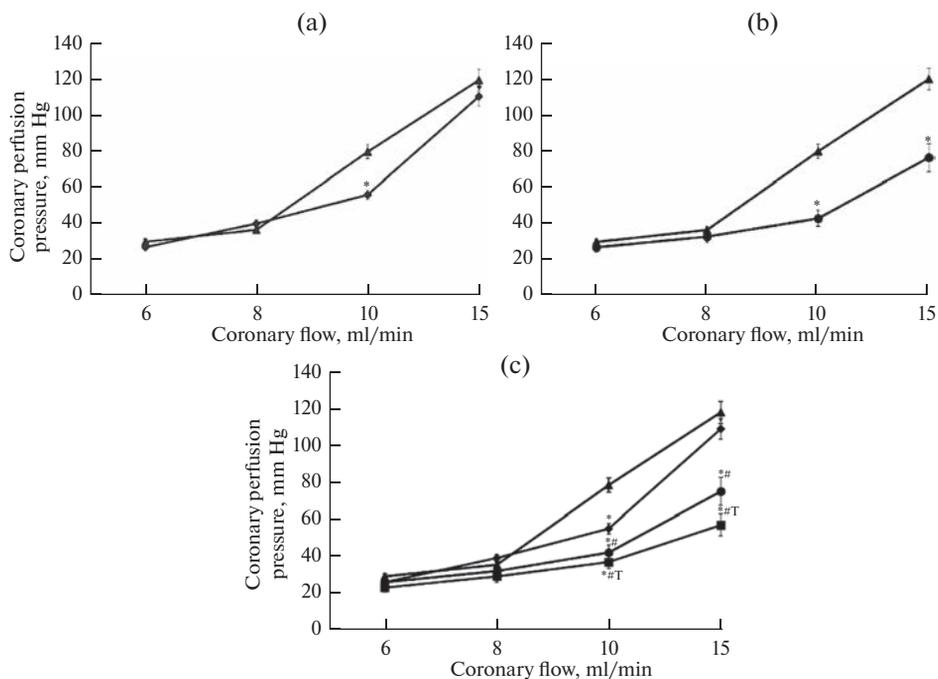


Рис. 1. (a, b, c) – Динамика изменения коронарного перфузионного давления (КПД) в изолированных сердцах крыс при ступенчатом увеличении объемной скорости коронарного потока (ОСКП) и при введении тирона в перфузионный раствор.

Обозначения: по оси абсцисс: Coronary perfusion pressure, mm Hg – коронарное перфузионное давление в мм рт. ст. По оси ординат: Coronary flow, mL/min – объемная скорость коронарного потока (ОСКП) в мл/мин. * – $p < 0.05$, по сравнению с группой “Контроль”; # – $p < 0.05$, по сравнению с группой “ПТСП”; T – $p < 0.05$, по сравнению с группой “Тирон”. ▲ – “Контроль”, ◆ – “ПТСП”, ● – “Тирон”, ■ – группа “ПТСП + тирон”.

Вклад супероксидного радикала O_2^- в механизмы регуляции функциональной активности K_V -каналов коронарных сосудов изолированного сердца контрольных животных и крыс с ПТСП

Добавление в раствор для перфузии изолированных сердец контрольной группы животных блокатора K_V -каналов 4-АП (“Контроль + 4-АП”) при ОСКП 10 мл/мин сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления до 143.0 (135.0; 146.0) мм рт. ст., т.е. прирост КПД составлял 70% (табл. 2). Таким образом, K_V -каналы вносят большой вклад в механизмы поддержания базального тонуса коронарных сосудов контрольных животных в физиологических условиях, а их активация противостоит коронароконстрикции.

При совместном использовании 4-АП и тирона в группе “Контроль” (“Контроль + тирон + 4-АП”) выраженность прироста КПД статистически значимо не отличалась от соответствующего прироста в группе “Контроль + 4-АП” и составляла 89% (рис. 2). Следовательно, образующиеся в физиологических условиях супероксидный радикал не изменяет функциональную активность K_V -каналов клеток коронарных сосудов.

Добавление в раствор, которым перфузировали сердца группы “ПТСП”, блокатора K_V -каналов 4-АП (“ПТСП + 4-АП”) при ОСКП 10 мл/мин приводило к не-

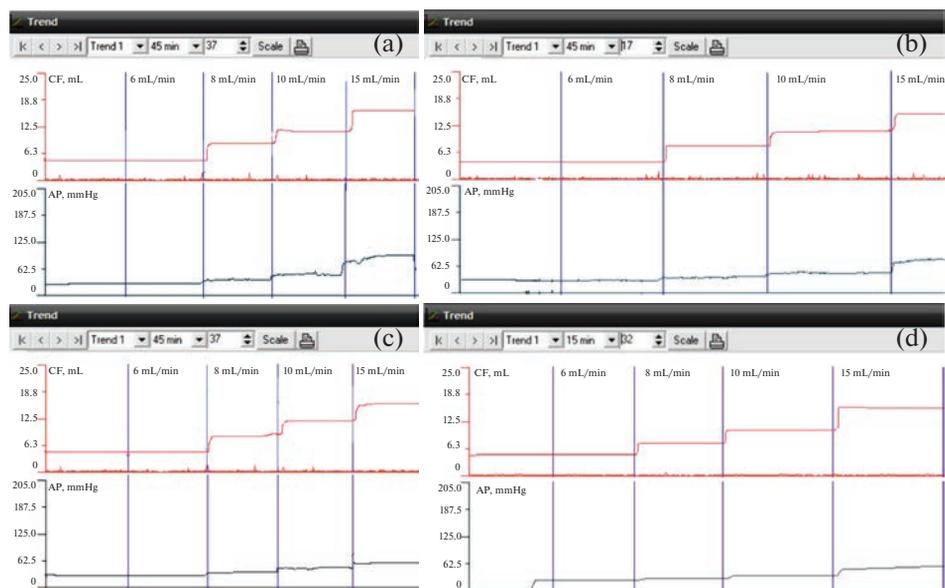


Рис. 2. Репрезентативные примеры оригинальных записей коронарного перфузионного давления в экспериментальных группах. (а) “Контроль”, (б) “ПТСР”, (с) “Тирон”, (д) “ПТСР + Тирон”. Обозначения: CF – объемная скорость коронарного потока; AP – коронарное перфузионное давление.

значительному повышению КПД, которое было на 54.2% ниже такового в группе “Контроль + 4-АП” (табл. 2). Прирост коронарного перфузионного давления в ответ на интракоронарное введение 4-АП составлял всего 23% против 70% в контроле (рис. 3). Следовательно, посттравматическое стрессовое расстройство приводило к снижению функциональной активности K_v -каналов клеток коронарных сосудов, что выражалось в уменьшении коронароконстрикторного действия блокатора этих каналов 4-АП.

Таблица 2. Динамика изменения коронарного перфузионного давления (КПД) в изолированных сердцах крыс при введении 4-аминопиридина (4-АП) и тирона в перфузионный раствор

ОСКП, мл/мин	КПД, мм рт. ст.			
	группа контроль $n = 12$	группа контроль + тирон $n = 15$	группа ПТСР $n = 10$	группа ПТСР + тирон $n = 10$
10	79.5 (78.7; 86.5)	43.0* (38.0; 57.0)	56.0* (42.0; 67.2)	38.0*# ^T (35.2; 38.0)
10 + 4-АП	143.0 (135.2; 146.7)	94.0* (74.0; 109.5)	65.5* (64.0; 86.0)	70.0* (58.0; 82.7)
% КПД	70.0 (62.5; 83.5)	89.0 (78.0; 141.0)	23.0* (14.3; 32.5)	71.5 (51.2; 100.0)

ОСКП – объемная скорость коронарного потока; КПД – коронарное перфузионное давление; * $p < 0.05$ – по сравнению с группой “Контроль”; # $p < 0.05$ – по сравнению с группой “ПТСР”; ^T $p < 0.05$ по сравнению с группой “Контроль + тирон”.

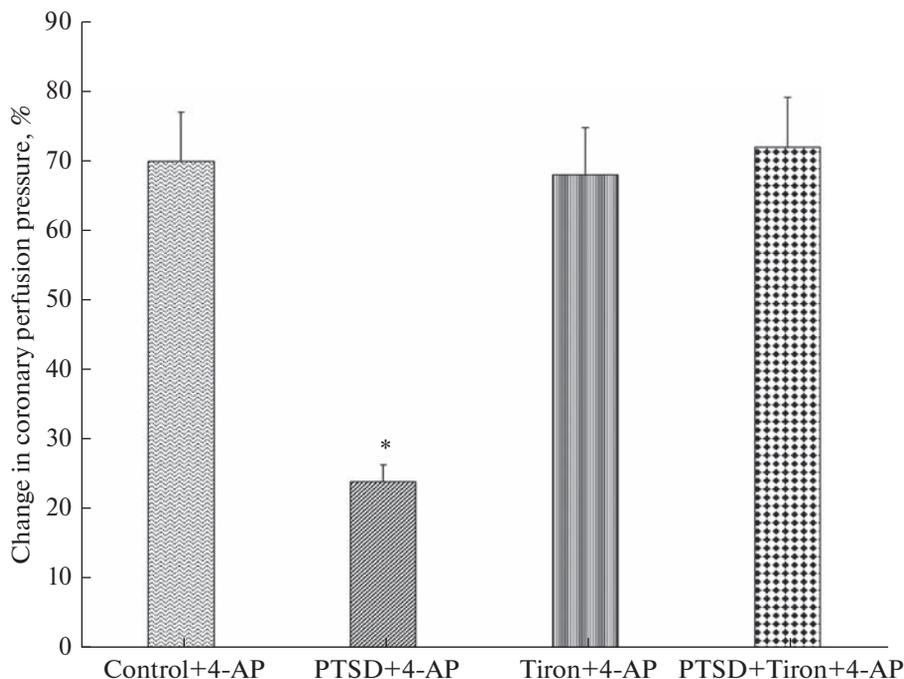


Рис. 3. Изменения коронарного перфузионного давления (КПД) (в %) изолированного сердца животных с посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР) в ответ на введение в перфузионный раствор 4,5-дигидрокси-1,3-бензолдисульфоновой кислоты (тирона), 4-аминопиридина (4-АП) или их сочетания. Обозначения: Change in coronary perfusion pressure, % – процент прироста коронарного перфузионного давления; 4-АП – 4-аминопиридин; Control – контрольная группа животных; PTSD – животные с посттравматическим стрессовым расстройством; Tiron – 4,5-дигидрокси-1,3-бензолдисульфоновая кислота (тирон). * – $p < 0.05$ по сравнению с группой “Control + 4AP”.

Блокада K_v -каналов коронарных сосудов крыс группы “ПТСР” при одновременном использовании тирона и 4-АП (“ПТСР + тирон + 4-АП”) приводила к увеличению КПД при ОСКП 10 мл/мин в той же степени, что и при перфузии сердец животных с ПТСР блокатором 4-АП (“ПТСР + 4-АП”) при аналогичном уровне ОСКП (табл. 2). Прирост коронарного перфузионного давления у крыс с ПТСР в условиях совместной блокады K_v -каналов и применения “ловушки” супероксидного радикала был сопоставим с таковым в сердцах группы “Контроль” под влиянием 4-АП и составлял 71.5% (рис. 3, для сравнения, прирост КПД у животных группы “ПТСР + 4-АП” – 23%). Таким образом, можно предположить, что избыточная продукция супероксидного радикала в клетках коронарных сосудов крыс с ПТСР может быть одним из механизмов постстрессорного нарушения функциональной активности K_v -каналов коронарных сосудов в этих условиях.

В сыворотке крови животных с ПТСР определялось увеличение концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в 3.3 и 3.6 раза соответственно в сравнении с показателями контрольной группы животных (рис. 4а, 4б).

Увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов сочеталось с уменьшением активности СОД и КАТ в крови на 27 и 59% соответственно (рис. 4с, 4д). Кроме того, в крови увеличивались концентрации С-реактивного белка в 1.6 раза от 2.55 (2.54; 3.57) до 4.25 (3.57; 4.92), $p < 0.05$) и ИЛ-1 β в 3 раза (от

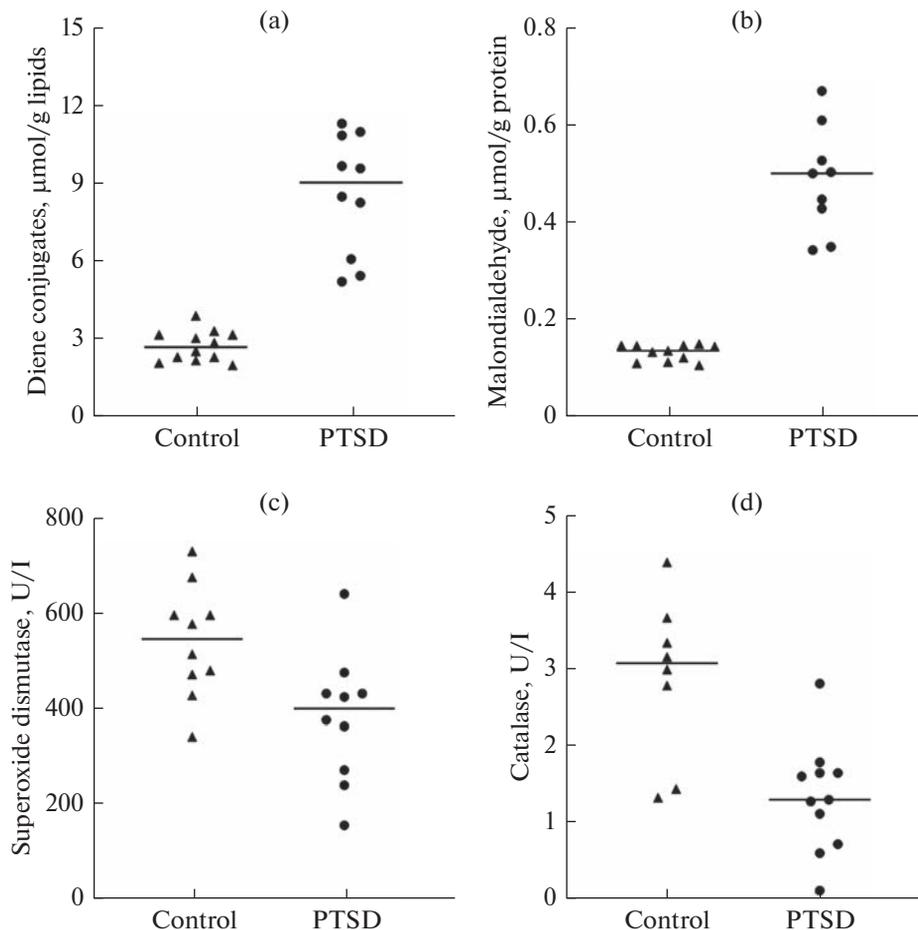


Рис. 4. (а) – Изменение концентрации диеновых конъюгатов (ДК, $\mu\text{моль/г}$ липидов); (б) – малонового диальдегида (МДА, $\mu\text{моль/г}$ белка); (с) – активности супероксиддисмутазы (U/l); (д) – активности каталазы (U/l) в сыворотке крови экспериментальных животных. Обозначения: по оси абсцисс – Control – группа “Контроль”; PTSD – группа “ПТСР”; по оси ординат – концентрация вещества: Diene conjugates, $\mu\text{mol/g lipids}$ - концентрации диеновых конъюгатов, $\mu\text{моль/г}$ липидов; Malondialdehyde, $\mu\text{mol/g protein}$ - малоновый диальдегид, $\mu\text{моль/г}$ белка; Superoxide dismutase, U/l – супероксиддисмутазы, U/l; Catalase, U/l – каталаза, U/l; статистические значимые различия $p < 0.001$.

1.71 (1.43; 2.38) до 5.34 (2.29; 6.76), $p < 0.05$) по сравнению с контрольными значениями.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перфузия сердец, выделенных из организмов контрольных животных, раствором с “химической ловушкой” супероксидного радикала тироном приводила к меньшему приросту КПД при ОСКП 10 мл/мин, чем в контроле, при аналогичном уровне ОСКП. Этот факт указывает на то, что супероксидный радикал, постоянно образующийся в гладкомышечных клетках и эндотелиоцитах коронарных сосудов в физиологических условиях, играет важную роль в механизмах, обеспечивающих

поддержание должного базального тонуса сосудов сердца, а устранение действия $O_2^{\cdot -}$ сопровождается снижением тонуса коронарных сосудов. Известно, что действие тирона в качестве антиоксиданта комплексное: помимо его способности выступать в роли сквенджера NO, тирон подавляет образование $O_2^{\cdot -}$ в электронно-транспортном комплексе митохондрий, является хелатором железа, увеличивает содержание восстановленного глутатиона, а также снижает активность индуцибельной NO-синтазы, экспрессию ядерного фактора транскрипции NF- κ B и фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), что косвенно может влиять на образование и/или биодоступность NO [21]. Однако в наших ранее опубликованных работах показано, что действие тирона в коронарных сосудах как контрольных крыс, так и крыс, перенесших стресс, не обусловлено изменением продукции оксида азота [22].

В наших исследованиях установлено, что в сердцах контрольной группы животных потенциалзависимые калиевые каналы играют важную роль в регуляции тонуса коронарных сосудов. Тот факт, что при совместном использовании 4-АП и тирона в группе “Контроль” (“Контроль + тирон + 4-АП”) выраженность прироста коронарного перфузионного давления статистически значимо не отличалась от соответствующего прироста КПД в группе “Контроль + 4-АП”, свидетельствует о том, что образующийся в физиологических условиях супероксидный радикал не изменяет функциональной активности K_v -каналов клеток коронарных сосудов. Другими исследователями показано, что регуляция активности K_v -каналов является редокс-зависимой [23], и в ней участвуют активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА), причем низкие концентрации АФК активизируют эти каналы [24].

Уменьшение констрикторного действия 4-АП в сердцах животных с ПТСР указывает на снижение функциональной активности K_v -каналов клеток коронарных сосудов, то есть ПТСР приводит к развитию постстрессорной “каналопатии”. У крыс с ПТСР в сыворотке крови увеличена концентрация диеновых конъюгатов и малонового диальдегида на фоне сниженного содержания антиоксидантных ферментов (СОД и КАТ), что может указывать на развитие в этих условиях окислительного стресса. По-видимому, окислительный стресс сопровождался избыточной продукцией АФК и в клетках сосудов сердца. Этот вывод подтверждается большим приростом КПД при перфузии сердец раствором, содержащим тирон (процент прироста в группе “ПТСР + тирон” составлял 71.5%), по сравнению с приростом КПД в сердцах животных с ПТСР без добавления в раствор для перфузии “химической ловушки” $O_2^{\cdot -}$ (для сравнения, процент прироста в группе “ПТСР” составлял 24.0%).

Развившееся воспаление низкой интенсивности при ПТСР способно увеличить образование индуцибельной NO-синтазы, а также привести к так называемому “разобщению” эндотелиальной NO-синтазы. При этом эндотелиальная NO-синтаза, наряду с монооксидом азота, способна продуцировать пероксинитрит, нитрозотиолы и супероксидный анион [25]. Как правило, окислительный и нитрозилирующий стресс развиваются одновременно [26] и сопровождаются S-нитрозированием и S-тионилированием белков, входящих в состав K_v -каналов, тем самым нарушая конформацию белковых молекул и функциональную активность каналов. В условиях окислительного стресса основными субстратами S-тионилирования белков являются CysSH и GSH [27].

Обнаруженное нами увеличение концентрации С-реактивного белка и ИЛ-1 β в сыворотке крови свидетельствует о развитии у животных с ПТСР системного воспаления низкой интенсивности. Системное воспаление низкой интенсивности, наряду с окислительным стрессом, развивающиеся при ПТСР, могут объяснить высокую вероятность развития при этом сосудистых “катастроф”. Предполагает-

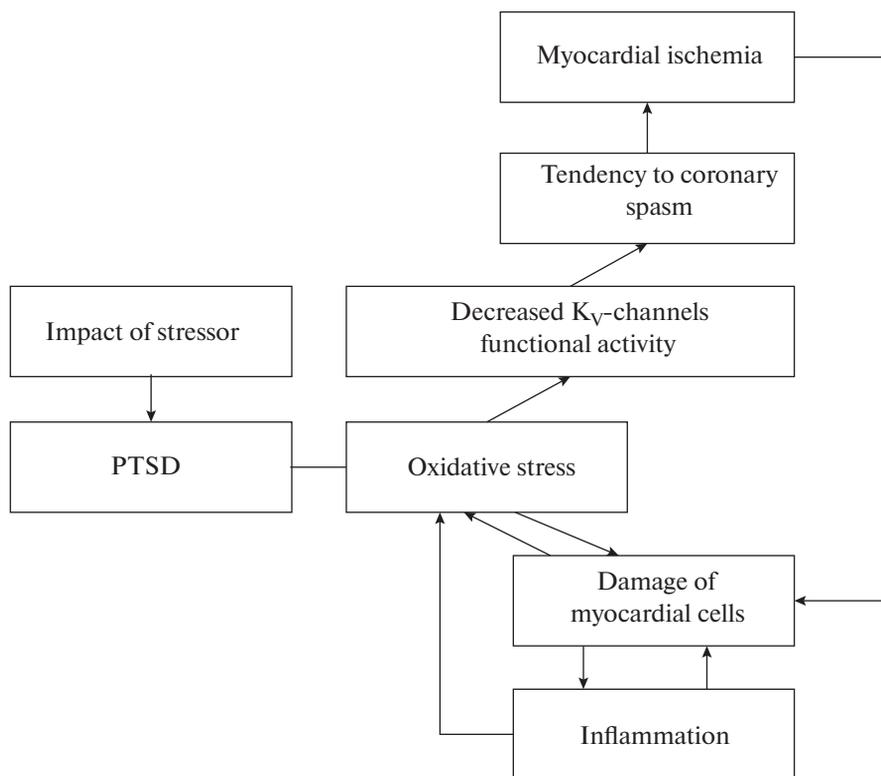


Рис. 5. Причины и следствия нарушений активности K_v -каналов коронарных сосудов у крыс с экспериментальным аналогом посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).

мые причинно-следственные связи между обнаруженными нами событиями упрощенно представлены на рис. 5.

Рассуждая таким образом, можно предположить, что последовательность событий, приводящих к уменьшению функциональной активности K_v -каналов у крыс с ПТСР, может быть следующей: развитие окислительного стресса и запуск асептического воспаления с образованием медиаторов воспаления интерлейкина- 1β , фактора некроза опухоли- α и белка острой фазы воспаления – С-реактивного белка, усиливающих действие друг друга с последующим окислением SH-групп K_v -каналов и снижением их активности [24].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующий вывод: ПТСР сопровождается снижением активности K_v -каналов коронарных сосудов, причем одним из важных механизмов такой “каналопатии” является окислительный стресс.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в соответствии с Хельсинкской Декларацией о гуманном обращении с животными (1986). Протокол проведения экспериментов был утвержден Комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Витебского государственного медицинского университета.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы кафедры нормальной физиологии Витебского государственного медицинского университета: “Роль K_v -каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов при посттравматическом стрессовом расстройстве” (№ госрегистрации 20210065 от 21.01.2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.С.Л., О.П.К.), сбор данных (О.П.К.), обработка данных (О.П.К.), написание и редактирование манускрипта (С.С.Л., Л.Е.Б., О.П.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Richter-Levin G, Stork O, Schmidt MV* (2019) Animal models of PTSD: a challenge to be met. *Mol Psychiatry* 24:1135–1156. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0272-5>
2. *Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X* (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57(4): 473–508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
3. *González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R* (2012) K^+ channels: function-structural overview. *Comprehens Physiol* 2: 2087–2149. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
4. *Nelson MT, Quayle JM* (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: 799–822. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799>
5. *Park SW, Noh HJ, Sung DJ, Kim JG, Kim JM, Ryu SY, Kang K, Kim B, Bae YM, Cho H* (2015) Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive K_v currents through S-glutathionylation. *Pflug Arch* 467: 285–297. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1513-3>
6. *Jerng HH, Dougherty K, Covarrubias M, Pfaffinger PJ* (2009) A novel N-terminal motif of dipeptidyl peptidase-like proteins produces rapid inactivation of $KV4.2$ channels by a pore-blocking mechanism. *Channels (Austin)* 3(6): 448–461. <https://doi.org/10.4161/chan.3.6.10216>
7. *Gamper N, Zaika O, Li Y, Martin P, Hernandez CC, Perez MR, Wang AY, Jaffe DB, Shapiro MS* (2006) Oxidative modification of M-type K^+ channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. *EMBO J* 25(20): 4996–5004. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601374>
8. *Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF* (2017) Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 7(2): 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
9. *Nieves-Cintrón M, Syed AU, Nystoriak MA, Navedo MF* (2018) Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders. *Microcirculation* 25(1): 10.1111/micc.12423. <https://doi.org/10.1111/micc.12423>
10. *López Alarcón MM, Rodríguez de Yurre A, Felice JJ, Medei E, Escobar AL* (2019) Phase 1 repolarization rate defines Ca^{2+} dynamics and contractility on intact mouse hearts. *J Gen Physiol* 151(6): 771–785. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812269>
11. *Lazuko SS, Kuzhel OP, Belyaeva LE, Manukhina EB, Downey HF, Tselikman OB, Komelkova MV, Tselikman VE* (2018) Posttraumatic Stress Disorder Disturbs Coronary Tone and Its Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 38(1): 209–217. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0619-0>

12. *Verbitsky A, Dopfel D, Zhang N* (2020) Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Transl Psychiatry* 10(1): 132.
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-0806-x>
13. *Tselikman OB, Lapshin MS, Komelkova MV, Kondashevskaya MV, Dremencov EV, Manukhina EB, Downey H Fred, Lazuko SS, Kuzhel OP, Tseylikman VE, Kozochkin DA* (2017) Adrenal insufficiency in rats after prolonged exposure to the predator cue: A new animal model of post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 83: 83.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.07.460>
14. *Солодков АП, Дорошенко АС, Шебеко ВИ, Щербинин ИЮ* (2005) Эндотелий, ауторегуляция коронарных сосудов и стресс. *Вестн Фонда фундамент исследов* 1: 79–94. [*Solodkov AP, Doroshenko AS, Shebeko VI, Shcherbinin IYu* (2005) Endothelium, coronary autoregulation and stress. *Bull Found Fundament Res* 1: 79–94. (In Russ)].
15. *Ohya Y, Setoguchi M, Fujii K, Nagao T, Abe I, Fujishima M* (1996) Impaired Action of Levromakalim on ATP-Sensitive K^+ Channels in Mesenteric Artery Cells From Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens* 27: 1234–1239.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.27.6.1234>
16. *Гаврилов ВБ, Гаврилова АР, Хмара НФ* (1988) Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов кислот. *Лаб дело* 2: 60–64. [*Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF* (1988) Measurement of diene conjugates in plasma by ultraviolet absorption of heptane and isopropyl extracts with acid. *Lab business* 2: 60–64. (In Russ)].
17. *Андреева ЛИ, Кожмякин ЛА, Кишкун АА* (1988) Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб дело* 11: 41–43. [*Andreeva LI, Kozhemyakin LA, Kishkun AA* (1988) Modification of the method for determining lipid peroxides in a test with thiobarbituric acid. *Lab business* 11: 41–43. (In Russ)].
18. *Королюк МА, Иванова ЛИ, Маморова ИГ, Токарев ВЕ* (1988) Метод определения активности каталазы. *Лаб дело* 1: 16–19. [*Korolyuk MA, Ivanova LI, Mamorova IG, Tokarev VE* (1988) Method for determining catalase activity. *Lab business* 1: 16–19. (In Russ)].
19. *Костюк ВА, Потанович АИ, Ковалева ЖВ* (1990) Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр мед химии* 36 (2): 88–91. [*Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV* (1990) A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase based on the oxidation of quercetin. *Vopr Med Chem* 36(2): 88–91. (In Russ)].
20. *Красько ОВ* (2014) Статистический анализ данных в медицинских исследованиях: в 2 ч. Мн МГЭУ им Ад Сахарова. [*Krasko OV* (2014) Statistical analysis of data in medical research: in 2 parts. *Mn MGJeU im AD Saharova*. (In Russ)].
21. *Khaled S, Makled MN, Nader MA* (2020) Tiron protects against nicotine-induced lung and liver injury through antioxidant and anti-inflammatory actions in rats *in vivo*. *Life Sci* 260: 118426.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118426>
22. *Дорошенко АС, Солодков АП, Шебеко ВИ* (2005) Значение супероксид-анионов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда на фоне измененного редокс-состояния миокарда. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 91(12): 1428–1440. [*Doroshenko AS, Solodkov AP, Shebeko VI* (2005) The value of superoxide anions in the regulation of coronary vascular tone and myocardial contractile function against the background of an altered myocardial redox state. *Russ J Physiol* 91(12): 1428–1440. (In Russ)].
23. *Gutterman DD, Miura H, Liu Y* (2005) Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(4): 671–678.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000158497.09626.3b>
24. *Dwenger MM, Ohanyan V, Navedo MF, Nystoriak MA* (2018) Coronary microvascular Kv1 channels as regulatory sensors of intracellular pyridine nucleotide redox potential. *Microcirculation* 25(1): 10.
<https://doi.org/10.1111/micc.12426>
25. *Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL* (2012) Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: 481–495.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00540.2011>
26. *Ortega AL, Mena S, Estrela JM* (2010) Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers (Basel)* 2(2): 274–304.
<https://doi.org/10.3390/cancers2020274>
27. *Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I* (2009) Cysteinylolation and homocysteinylolation of plasma protein thiols during ageing of healthy human beings. *J Cell Mol Med* 13(9B): 31–40.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00417.x>

The Role of the Superoxide Radical in the Regulation of the K_V -Channels Function in the Coronary Vessels Following Posttraumatic Stress Disorder

S. S. Lazuko^{a, *}, L. E. Belyaeva^a, and O. P. Kuzhel^a

^aVitebsk State Order of Friendship of Peoples Medical University, Vitebsk, Belarus

*e-mail: lazuko71@mail.ru

The purpose of the research was to study the contribution of the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) to the mechanisms of the coronary K_V -channels functional activity impairment in rats with posttraumatic stress disorder (PTSD). The study was performed on 117 outbred white male rats (*Rattus*, Muridae weighing 210–240 g). To reproduce the experimental analogue of PTSD, the modified model of “a predator presence imitation” was applied (contact with cats’ excrements for 10 days, 15 minutes daily). The PTSD development was confirmed by behavioral changes of affected animals in the “Open Field” test. The coronary vessels’ tone was studied on the isolated by the Langendorf’s method isotonicity contracted hearts, which were perfused under constant flow with Krebs–Henseleit solution. The contribution of $O_2^{\cdot-}$ to the coronary vascular tone regulation was studied by infusion of the superoxide radical “scavenger” Tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid) in the perfusion solution. The functional activity of K_V -channels was assessed by the degree of increase in the coronary perfusion pressure (CPP) in response to 4-aminopyridine (4-AP), a blocker of K_V -channels. To elucidate the role of $O_2^{\cdot-}$ in the K_V -channels functional activity of coronary vessels, Tiron and 4-AP were infused in the perfusion solution. The concentration of diene conjugates (DCs), malondialdehyde (MDA), C-reactive protein (C-RP) and interleukin 1 β (IL-1 β) as well as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity were detected in the blood serum of experimental animals. The CPP in the isolated rats’ hearts after PTSD was 30% lower at coronary flow rate 10 mL/min compared to the control group. Under the influence of 4-AP, CPP increased by 70% and by 24% in the “Control” and “PTSD” groups, respectively. Under influence of Tiron, the CPP in the “PTSD” group at coronary flow rate 10 mL/min was 52% lower than in the control. In the “PTSD + Tiron + 4-AP” group the CPP augmentation (71.5%) was comparable to that in the hearts of the “Control” group after 4-AP exposure. The IL-1 β , C-RP, DCs and MDA concentration in the blood serum of rats with PTSD was 3, 1.6, 3.3 and 3.6 times higher than in the control rats’ blood serum, while SOD and CAT activity was by 27 and 59% lower, compared to control, respectively. In the course of the investigation, it was found that $O_2^{\cdot-}$ overproduction due to oxidative stress might be an important mechanism of a poststressor “channelopathy”, which is characterized by the decreased functional activity of the K_V -channels of coronary vessels following PTSD.

Keywords: ion channel, vascular tone, superoxide radical, posttraumatic stress disorder

НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ, КВАЗИХРОНИЧЕСКОГО ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И ИОНОВ УГЛЕРОДА У КРЫС

© 2023 г. А. А. Перевезенцев¹, К. Б. Лебедева-Георгиевская¹, О. С. Кузнецова¹,
В. С. Кудрин^{1, 2}, В. А. Пикалов³, А. С. Штемберг^{1, *}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова РАМН,
Москва, Россия

³Институт физики высоких энергий им. А.А. Логунова Национального
исследовательского центра “Курчатовский институт”, Протвино, Россия

*E-mail: andrei_shtemberg@mail.ru

Поступила в редакцию 29.06.2022 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Исследовали нейробиологические эффекты физических факторов, моделирующих в наземном эксперименте условия межпланетного космического полета: гипогравитации (модель антиортостатического вывешивания) и ионизирующих излучений (квазихроническое гамма-облучение и облучение головы животных ионами углерода ¹²C) с учетом типологических характеристик экспериментальных животных (самцов крыс линии Long Evans). Были изучены изменения в поведении животных, ЭЭГ и нейробиологических процессах в структурах мозга, ответственных за когнитивные и эмоциональные процессы (фронтальная кора, таламус, гипоталамус). Показаны различия в двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, а также когнитивных функций животных с преобладанием возбуждения или торможения под действием изученных факторов, в основе которых лежат различия в балансе основных тормозного и возбуждающего нейромедиаторов (ГАМК и глутамата). В частности, установлено, что крысы с преобладанием возбуждения быстрее обучаются, но хуже сохраняют навыки по сравнению с крысами преимущественно тормозного типа. Обнаружены изменения соотношения основных ритмов ЭЭГ в результате экспериментальных воздействий.

Ключевые слова: космические полеты, ионизирующее излучение, галактические лучи, тяжелые ионы, нервная система, нейробиология, поведение, грызуны

DOI: 10.31857/S086981392303007X, **EDN:** FSSYAL

Одной из основных проблем при подготовке межпланетных миссий является радиационный барьер – опасность воздействия галактических космических лучей, в состав которых входят тяжелые ионы высоких энергий, вплоть до 10²⁰ МэВ. При этом на первый план выходят возможные нарушения в центральной нервной системе (ЦНС) – так называемый эргономический риск, обусловленный возможными нарушениями операторской деятельности космонавтов и связанный с угрозой их жизни непосредственно в ходе полета. Существенные нарушения функций ЦНС при воздействии тяжелых ионов показаны в целом ряде работ [1–4]. Весьма важной и в то же время наименее изученной проблемой являются нейробиологи-

ческие эффекты комбинированного действия ионизирующих излучений и нерадиационных факторов космического полета, важнейшим из которых является микрогравитация. В наших предыдущих работах были изучены основные нейробиологические эффекты комбинированного действия моделируемой микрогравитации и различных видов ионизирующих излучений, входящих в состав галактических космических лучей, на разных уровнях организации ЦНС [5–8]. В частности, было показано, что при изучаемых воздействиях страдает в первую очередь эмоционально-мотивационная сфера, в основе чего лежит угнетение дофаминергической системы мозга; имеет место зависимость степени нарушений от сроков воздействия. Методологической основой этих работ было моделирование комбинированного действия длительного синхронного воздействия гамма-облучения и невесомости с помощью антиортостатического вывешивания (АнОВ) с последующим облучением головы животных протонами высоких энергий и/или ионами углерода ^{12}C . Кроме того, как показано в ряде работ [6, 9, 11], важную роль в модификации нейробиологических эффектов воздействия факторов космического полета играют индивидуальные и типологические особенности высшей нервной деятельности (ВНД). В нашем эксперименте с обезьянами было убедительно показано, что типологические характеристики ВНД могут играть определяющую роль в характере нарушений когнитивных функций, что диктует необходимость учета этих характеристик при отборе космонавтов для межпланетных полетов [7]. Исходя из этого, задачей наших исследований было изучение отдаленных эффектов комбинированного действия АнОВ и ионизирующих излучений на интегративном и нейрохимическом уровнях, а также роли типологических особенностей ВНД в модификации этих эффектов.

Настоящая работа является продолжением этих исследований. В ней мы применили несколько иные характеристики длительного гамма-облучения животных, приблизив его к хроническому.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Работа проводилась на самцах крыс линии Long Evans из собственного вивария Института медико-биологических проблем, на дату начала эксперимента возраст животных составлял 1.5–2 мес., а масса тела 150–180 г. Всего в эксперименте было использовано 22 животных: по 6 животных в двух экспериментальных группах и по 5 животных в двух контрольных группах. Содержание животных осуществлялось в стандартных домашних клетках (ГОСТ 33216-2014) размерами 40 × 60 × 20 см (одна группа – одна клетка) при температуре 23°C на протяжении всего эксперимента, световой день составлял 12 ч (искусственное освещение) с 9:00 до 21:00, крысы имели свободный доступ к воде и корму (синтетический полнорационный комбикорм для грызунов ПК 120-1_45, ГОСТ 33215-2014, МУ 1.2.2520-09), подстил по ГОСТ 33215-2014, п. 6.8, аналогично предыдущим исследованиям [5, 6]. Выбор линии крыс обусловлен применением сложных поведенческих методик, в частности, Y-лабиринта, в котором линейные крысы Wistar дают низкие результаты. Перед началом эксперимента все животные проходили трехдневное приучение к рукам (хэндлинг).

Экспериментальные воздействия

Факторы дальнего космического полета моделировались в две фазы: 7-суточное АнОВ синхронно с гамма-облучением, затем, на следующий день, отдельно воздействие тяжелых ионов.

При создании АнОВ использовали индивидуальные металлические секции размером 42 × 42 × 40 см, скомпонованные в трехъярусный стеллаж (15 секций). Жи-



Рис. 1. Крыса в установке АноВ.

вотных вывешивали за основание хвоста под углом 30° – 40° с расчетом снятия статической нагрузки с задних конечностей. При этом крыс крепили с помощью специальных карабинов, надевающихся на металлический стержень так, чтобы они могли свободно перемещаться в пределах клетки. Таким образом создавался анти-ортостаз, вызывающий перераспределение жидкостей в организме, и снималась статическая нагрузка с задних конечностей, что воспроизводит основные эффекты микрогравитации. Данная методика – принятая экспериментальная наземная модель невесомости для мелких лабораторных животных, описанная более подробно в [15, 16]. Общий вид отдельного отсека с вывешенной крысой представлен на рис. 1.

Стеллажи с животными были размещены в помещении для облучения: стеллаж с крысами, подвергавшимися воздействию АноВ и γ -излучения – в зоне облучения на расстоянии 4 м от источника излучения, с таким расчетом, чтобы облучение всех крыс было равномерным; крысы контрольных групп размещались в том же помещении в домашних клетках, но с тыльной стороны источника.

Для облучения использовали установку ГОБО-60 с источником ^{137}Cs (72 г-экв. Ra). Мощность дозы составила 0.7 сГр/ч. В данном эксперименте было проведено квазихроническое облучение в течение всех 7 дней вывешивания, что приближает условия проведения эксперимента к реальным условиям космического полета. Доза гамма-облучения составила 1.2 Гр. После окончания гамма-облучения и снятия крыс с вывешивания было проведено однократное облучение головы животных ионами углерода ^{12}C с энергией 455 МэВ/н в дозе 0.8 Гр на ускорителе У-70 на базе Института физики высоких энергий (Протвино).

Выбор режима облучения основывался на следующем: суммарная доза 2.0 Гр для крыс (исходя из их видовой радиочувствительности) примерно соответствует расчетной дозе, которая может быть получена космонавтами в межпланетном полете Земля–Марс–Земля. Снижение суммарной дозы относительно более ранних работ [5]

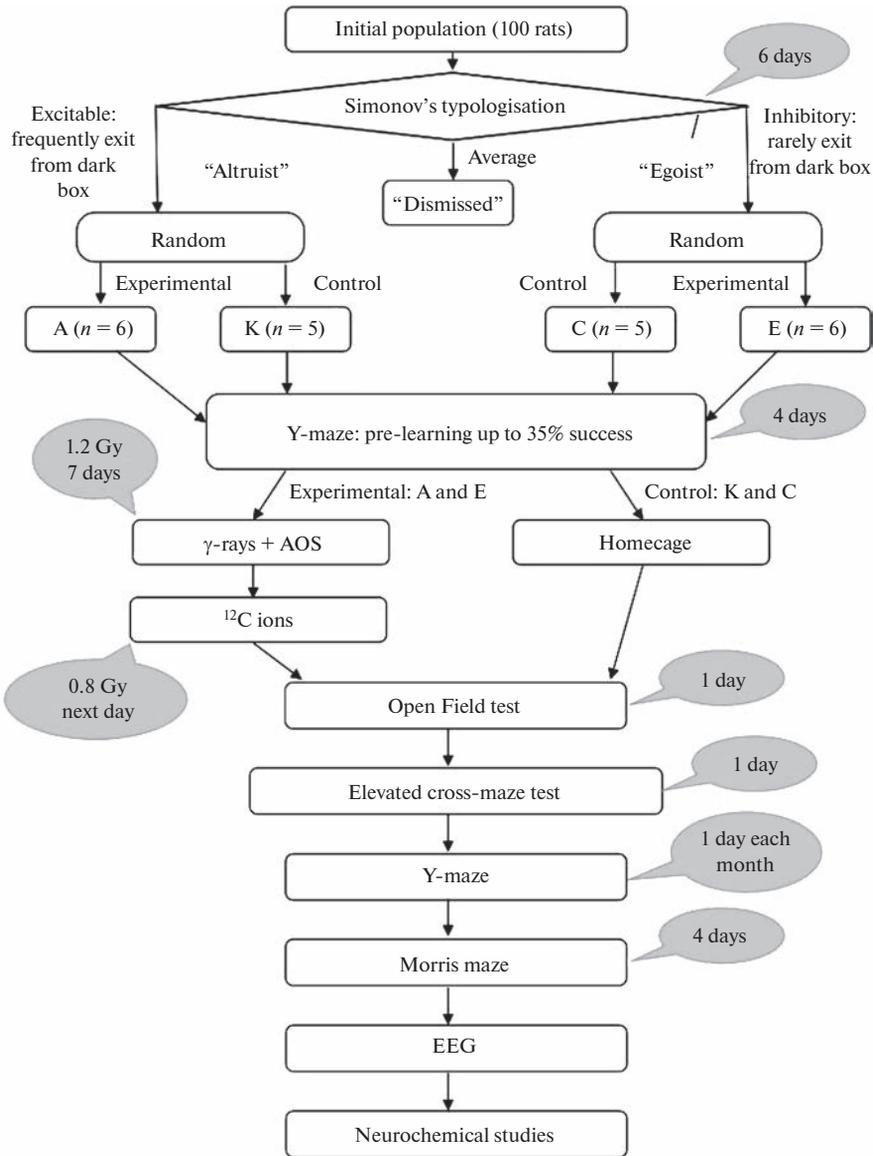


Рис. 2. Схема эксперимента.

было обусловлено большей эффективностью квазихронического облучения по сравнению с фракционированным. Общая схема эксперимента дана на рис. 2.

Методы исследования поведения животных

В целом эксперимент продолжался на протяжении 8 мес. До воздействия модельных факторов животные были типологизированы по особенностям ВНД и разбиты на группы. На следующий день после завершения воздействий начато обучение в Y-лабиринте, продолжавшееся 5 дней. Через месяц после воздействия начат основной этап поведенческого тестирования, в который вошли тесты “Открытое

поле” (ОП), “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), “Водный лабиринт Морриса” (ВЛМ). Наряду с этим ежемесячно проверялся выработанный в Y-лабиринте сложный рефлекс активного избегания. Спустя 6 месяцев после воздействий были сняты электроэнцефалограммы, далее крысы были умерщвлены для взятия проб на нейрохимические исследования.

Типологизация животных

Типологизация животных проводилась до начала основного эксперимента. Исходная выборка из 100 животных была протестирована в течение 2 недель (партиями, по 2 последовательных дня на каждое животное) с целью отбора однородных по типу ВНД животных – возбудимых (группы А и К) и тормозных (группы Е и С) соответственно. Для типологизации животных использовали модифицированную методику избегания закрытого темного пространства при крике раздражаемой особи (методика “эмоционального резонанса”) по Симонову [12]. Показана успешность применения этой методики для определения типологических характеристик животных [13, 14].

Тестирование проводилось в течение 2 дней по 5 мин (300 с) на каждое животное. Изначально крысу высаживали в дальний от входа в темный отсек угол светлого отсека. Регистрировали количество входов в темный отсек и общее время, проведенное в темном отсеке. Эти параметры имеют обратную зависимость. Животные, показавшие максимальную активность, считаются возбудимыми, минимальную – тормозными. При этом контрольные группы (К и С) подбирались таким образом, чтобы средние показатели в тесте совпадали с опытными (А и Е соответственно). Те животные из исходной выборки в 100 крыс, которые показали промежуточные результаты, выбраковывались.

Тестирование в “открытом поле”

Использовалась стандартная пластиковая установка (приказ Минздрава РФ № 281 от 30.04.2013) диаметром 90 см, пол которой размечен квадратами со стороной 10 см. В каждой “клеточке” посередине имеется отверстие диаметром 3 см. Продолжительность эксперимента составляла 5 мин. Животное аккуратно высаживалось в центр. Регистрировали двигательную активность (число пересечений линий) отдельно за первую и вторую половины времени тестирования, ориентировочно-исследовательскую активность (число заглядываний в отверстия, число стоек с опорой и без опоры), эмоциональность (число актов дефекации), а также время выхода в центральную часть поля и число замираний (freezing).

Тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ)

Приподнятый крестообразный лабиринт является общепринятым тестом для оценки тревожности экспериментальных животных. Критерием тревожности служит количество выходов в открытый отсек лабиринта и время пребывания в нем. Использовалась стандартная крестообразная установка размером 1.5 м, два противоположных рукава которой закрыты по бокам черными стенками высотой 50 см. Крыса первоначально высаживалась в темный рукав. Тест проводился на протяжении 2 мин, в ходе которых регистрировались число перебежек между темными рукавами, латентный период выхода в светлый рукав, количество выходов и общее время, проведенное в светлом рукаве.

*Выработка дифференцировочного условного рефлекса (УР)
активного избегания (УРАИ) в Y-образном лабиринте*

Лабиринт представлял собой три рукава (отсека) размером 25 (длина) × 20 (ширина) × 25 (высота) см из белого непрозрачного пластика, соединенных под углом 120 градусов. В каждом отсеке были установлены: управляемый светодиодный светильник, обеспечивающий освещенность 80 лк/см², управляемый источник звука различной частоты и электродный пол, позволяющий стимулировать крысу импульсами с частотой 4–5 Гц энергией 0.004 Дж. Параметры выработки условного рефлекса были следующими: 6 с – время изолированного действия условного сигнала; 30 с – время сочетания условного сигнала и электроболевого подкрепления; 10 с – пауза между сочетаниями. Регистрировали число реакций избегания (переходов по условному сигналу в правый отсек лабиринта); число реакций избегания (число переходов в правый отсек при сочетании условного сигнала и электроболевого подкрепления); число ошибок (переходов в левый отсек лабиринта); число отказов и число межсигнальных реакций. Проводилось по 15 сеансов обучения в течение 4 дней.

Водный тест Морриса

Водный тест (лабиринт) Морриса предназначен для исследования пространственной памяти и ориентации животных. Подробно методика была описана в предыдущих публикациях. Использовалась стандартная установка диаметром 150 см, расположенная в полузатемненной комнате с освещением по периметру, что исключает наличие ярко выраженных ориентиров. Животное высаживалось каждый раз с одной точки и должно было отыскать скрытую под водой платформу, также расположенную в постоянном месте. Температура воды составляла 20°C, воздуха – 23°C. Испытание записывалось на видео для последующей обработки в программе Bonsai (Open Ephys, США), определяющей временные характеристики прохождения теста, скорость, манеру поведения крысы.

Методы электроэнцефалографических исследований

Для анализа возможных электрофизиологических изменений в работе головного мозга крыс через 6 мес. после облучения, по достижении массы тела 350–400 г, проводили операцию для вживления интракраниальных энцефалографических электродов. Животное закреплялось в стереотаксической установке, операция происходила под общим наркозом (хлоралгидрат 350 мг/кг, концентрация 85 мг/мл). Голова крысы скальпировалась, после чего происходила очистка и сушка черепа. Электроды, представляющие собой позолоченные винты диаметром 1.5 мм и длиной 1.0 мм, закреплялись внутри кости с помощью пластмассы холодной быстрой полимеризации (протакрил). Расположение электродов: в области префронтальной коры – 2, в области моторной коры – 1, в области лимбической коры – 1; референтный и земляной электроды располагались в затылочной кости.

Спустя 7 дней после операции была произведена регистрация электроэнцефалограммы с помощью чипа Neurologger (TSE), запись проходила в свободном поведении в домашней клетке в течение одного часа, все животные записывались в течение одного дня, частота оцифровки 565 Герц.

Всего было прооперировано и записано 15 животных, в связи с техническими особенностями работы чипов Neurologger пригодными для описания оказались 7 записей, 3 контрольных и 4 экспериментальных животных. Анализировались данные, полученные для префронтальной коры как наиболее важной для реализации высших когнитивных функций.

Для оценки достоверности результатов был применен непараметрический критерий Уилкоксона.

Методы нейрохимических исследований

Для проведения нейрохимических исследований контрольных и подвергнутых экспериментальным воздействиям крыс декапитировали через 7 мес. после воздействий и выделяли следующие структуры мозга: префронтальную кору, гипоталамус, таламус. Структуры мозга замораживали в жидком азоте и взвешивали. Выделенные структуры гомогенизировали при 4°C в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком (0.2 мм) при скорости вращения пестика 3000 об./мин. В качестве среды гомогенизации и выделения использовали 0.1 Н HClO₄ с добавлением внутреннего стандарта ДОБА (3,4-диоксибензиламин) – вещество катехоламиновой природы, но не встречающегося в нативной ткани, в концентрации – 0.5 нмоль/мл. Структуры мозга гомогенизировали в 20 объемах среды выделения. Пробы центрифугировали при 4°C, 10000 g в течение 15 мин. Супернатант использовался в дальнейшем для определения моноаминов и их метаболитов.

Концентрацию моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304T (BAS, WestLafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов – 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4 × 100 мм, 3 мкм (Dr.Majsch GMBH, “Элсико”, Москва). Насос PM-80 (BAS, США), скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1.1 мМ октансульфоновой кислоты, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (pH 3.0). Скорость протока составляла 1 мл/мин. Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS, США) на стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1.5 (АМПЕРСЕНД). Все использованные для анализа реактивы были высокой степени чистоты: “ос. ч.”, “х. ч.” или “analytical grade”. Для калибровки хроматографа использовались смеси рабочих стандартов определяемых веществ в концентрации 500 пмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площади пиков в стандартной смеси и в образце. Определяли содержание ГАМК, глутамата, норадреналина (НА), дофамина (ДА) и его метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), 3-метокситирамина (3-МТ), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и его метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в 3 структурах мозга: префронтальная кора, гипоталамус и таламус.

Результаты нейрохимических исследований выражали в виде средних величин ± стандартная ошибка среднего. Полученные результаты анализировали с помощью односторонней ANOVA и posthoc теста Дункана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ*Результаты типологизации животных*

В первый день среднее время в темном отсеке составило 254 с (стандартное отклонение 36.5 с, медианное время – 266 с) с разбросом от 172 до 291 с при среднем количестве заходов в темный отсек 7.5.

На второй день общая тревожность крыс снизилась и среднее время составило 248 с (стандартное отклонение 45 с, но при этом медианное – 259 с) с разбросом от 134 до 299 с, что демонстрирует расхождения в поведении индивидуумов. Среднее количество входов составило 6.04.

Таблица 1. Параметры типологизации крыс

Параметр	Группа				
	Общая	А	Е	С	К
Время ср. (с)	260	221.5 (27.6)	288 (15.8)	297 (2.5)	211 (46)
Входы (количество)	6.04	8.83	3.67	2.6	7.6
Время медиана (с)	275	217	295	299	207

Цифры в скобках – величины стандартного отклонения.

Для третьего и четвертого дней (вторая партия крыс) цифры составили соответственно 266 и 272 с – среднее время, 7 и 4.5 – количество входов. Разброс в третий день был от 233 до 292 с, в четвертый – от 204 до 299 с.

Для дальнейшей работы из общего массива были отобраны четыре группы животных:

– группа А (“Альтруисты” по терминологии Симонова, 6 животных) – наименьшее время в темном отсеке, наибольшее число входов, соответственно: возбудимые, высокоэмоциональные, с повышенной тревожностью;

– группа Е (“Эгоисты”, 6 животных) – наибольшее время в темном отсеке, наименьшее число входов: преимущественно тормозные, низкоэмоциональные, с пониженной тревожностью;

– группа С (контроль – эгоисты, 5 животных) – подобраны таким образом, чтобы примерно соответствовать группе Е;

– группа К (контроль – альтруисты, 5 животных) – аналогично группе А.

Измеренные и усредненные параметры по группам (по второму дню, как более показательному) даны в табл. 1; можно видеть, что крысы групп Е и С практически не реагируют на крик раздражаемой особи, тогда как крысы групп А и К реагируют достаточно активно, совершая до 14 (в среднем 8.8 и 7.6 соответственно) кратковременных выходов из темного отсека.

Исследование поведенческих реакций крыс

Результаты тестирования животных в “открытом поле” в целом не выявили значимых различий в поведении крыс разных типологических групп. Различия между экспериментальными группами и контролем выражались лишь в виде тенденций, подтверждающих, однако, выводы предыдущих исследований. Они проявились в более высоких показателях двигательной активности крыс с высокой возбудимостью по сравнению с преимущественно тормозными животными и контролем.

По показателям латентного периода выхода в центр “открытого поля” и времени пребывания в нем существенных различий между экспериментальными группами получено не было, однако по времени пребывания в центре показатели крыс обеих экспериментальных групп были существенно ниже контрольных, что может свидетельствовать о повышении тревожности в результате экспериментальных воздействий.

Исследование тревожности животных в приподнятом крестообразном лабиринте

Тестирование крыс всех 4 групп было проведено через месяц после экспериментальных воздействий по стандартной методике приподнятого крестообразного лабиринта продолжительностью 5 мин.

Полученные результаты в целом укладываются в выдвинутую нами гипотезу о различиях в поведении крыс исследуемых групп с противоположными характеристика-

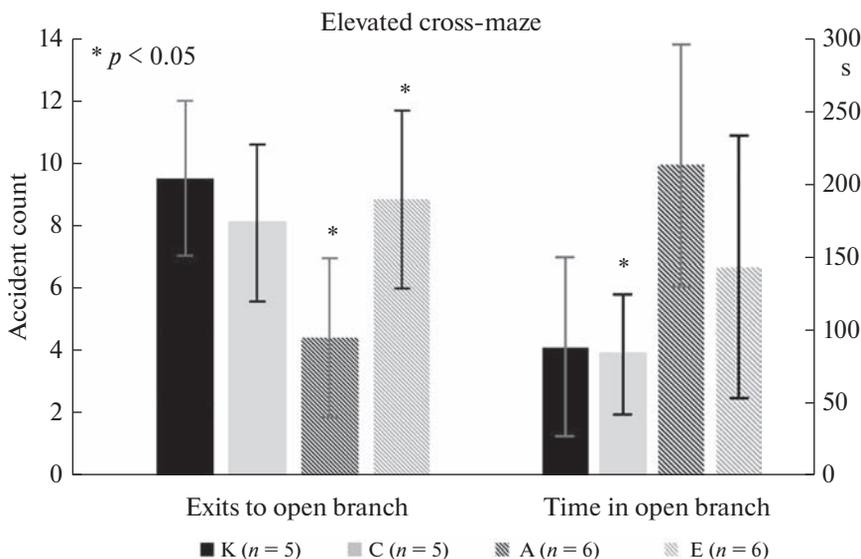


Рис. 3. Показатели тревожности крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.

ми ВНД. Экспериментальные крысы с повышенной возбудимостью (группа А) продемонстрировали самое низкое число выходов в открытый отсек ПКЛ по сравнению с животными с преобладанием торможения и контролем ($p < 0.05$, тест Левена) (рис. 3), что свидетельствует о сохраняющейся повышенной тревожности через месяц после экспериментальных воздействий.

Несколько неожиданными результатами явились более высокие (на грани достоверного, $p \sim 0.06$) показатели общего времени, проведенного в светлом отсеке, для обеих экспериментальных групп по сравнению с контролем. Предположительно, это может быть связано с угнетением исполнительных механизмов ориентировочной реакции в гипоталамусе и ретикулярной формации в результате облучения [11].

Таким образом, тестирование в ПКЛ в целом выявило тенденции, подтверждающие результаты исследования поведения животных в “открытом поле”. Экспериментальные воздействия приводят к повышению тревожности, различия между крысами разных типологических групп отчетливо выявляются в данном тесте. Как было показано ранее, эти различия, как между экспериментальными и контрольными животными, так и между крысами разных типологических групп, сохраняются в течение длительного времени после экспериментальных воздействий [6, 7].

Исследование когнитивных функций животных в Y-образном лабиринте

Исходный уровень обучения крыс составлял 35% правильных переходов. Целью исследования было закрепление либо утрата приобретенного рефлекса при редко повторяющемся тестировании.

В данном эксперименте тестирование повторялось после первоначального обучения по одному дню с интервалом в месяц, по 15 сеансов для каждого животного.

График, отражающий общую динамику обучения по группам, приведен на рис. 4. Для наглядности из данных исключены животные (по одному в каждой группе), продемонстрировавшие худшую обучаемость.

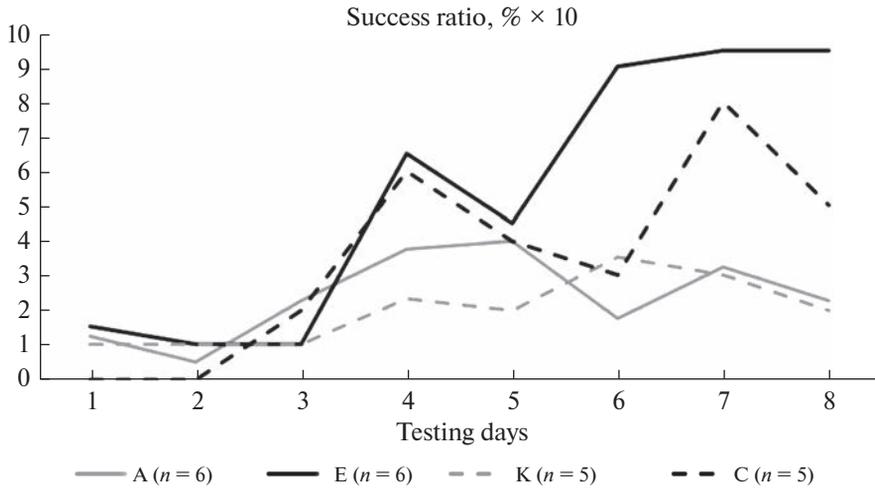


Рис. 4. Обученность (количество успешных переходов) животных в Y-лабиринте.

Можно видеть, что возбудимые крысы группы А за первый этап (пять дней последовательно) теста достигли уровня обучения 37%, превзойдя животных остальных групп.

При последующих тестированиях (один раз в месяц) крысы группы А не только медленнее обучались, но и демонстрировали частичную утрату выработанного УРАИ; аналогичный результат показала группа К. После 3-го месяца редкого (раз в месяц) повторения теста выработанный УРАИ начинает ослабевать у всех групп, особенно хорошо это заметно при измерении времени избегания. Тормозные облученные крысы группы Е, однако, демонстрировали практически линейное улучшение показателей вплоть до уровня обучения 40%, в итоге продемонстрировав наилучшие показатели среди всех животных. Облученные крысы из групп А и Е проходили исходное обучение наравне с контролем, однако последующие тесты выполняли лучше контрольных, что, по-видимому, свидетельствует о большей пластичности нервных процессов в период восстановления после экспериментальных воздействий.

В целом очевидно, что повторение теста с интервалом в месяц плохо укрепляет исходно приобретенный УРАИ, тормозные крысы некоторое время сохраняют уровень обученности, тогда как более возбудимые животные могут утрачивать навык.

Особо следует отметить “шестой день” теста, т.е. повтор через два месяца после воздействий. Данный день характеризовался крайне неблагоприятными метеорологическими условиями: если накануне атмосферное давление составляло 736 мм рт. ст., то к утру следующего дня оно поднялось до 753 мм рт. ст., скорость подъема достигала 1 мм рт. ст. в час (данные метеоархива gr5.ru). По-видимому, такое колебание погоды оказало сильное угнетающее действие на животных, однако следует констатировать, что группа Е опять-таки оказалась наиболее устойчивой и к этому воздействию.

Сходные результаты наблюдались в ранее проводившихся тестах УРАИ с “челночной камерой” [6, 9]. По-видимому, такие результаты свидетельствуют во-первых, о более высокой пластичности нервных процессов у крыс группы А в сравнении с группой Е, а во-вторых – о влиянии в долгосрочной перспективе регенерационных процессов в нервной ткани у облученных крыс (в сравнении с необлученными С и К).

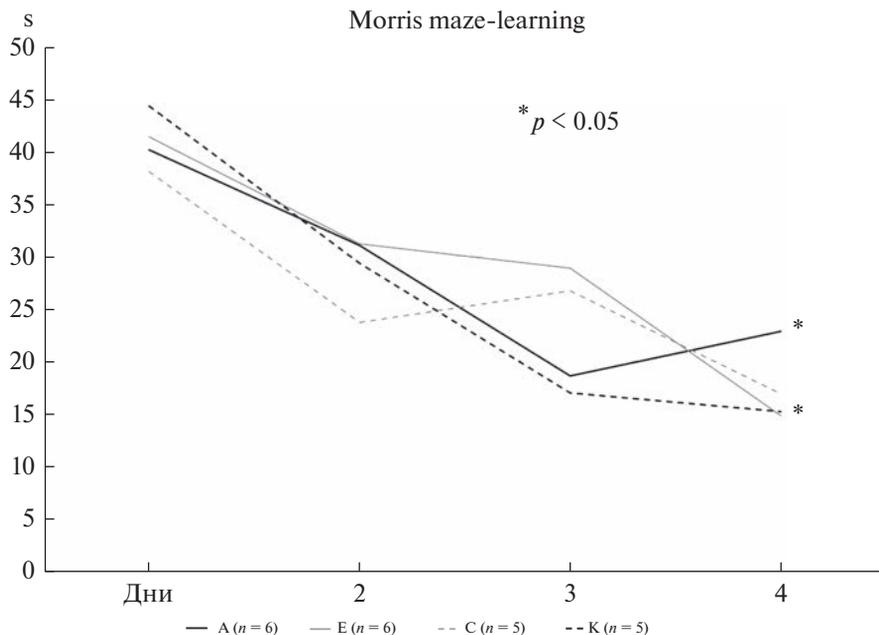


Рис. 5. Время отыскания платформы в лабиринте Морриса, с.

Ввиду задействования в методике УРАИ элементов пространственного ориентирования и, как следствие, заметной схожести методик УРАИ и ВЛМ в части задействования гиппокампа, полученные результаты оказались ожидаемо схожи. Следует, однако, напомнить, что испытания по методике УРАИ проводились на протяжении 4 месяцев (с ноября по февраль) и отражают процессы восстановления ЦНС после воздействий, тогда как тест ВЛМ был выполнен фактически единовременно, в феврале, и больше отражает установившееся состояние ЦНС и отдаленные последствия воздействий. Результаты теста Морриса приведены на рис. 5.

Энцефалографические исследования

Обработка записей ЭЭГ производилась в программах Powergraph 3, EDFbrowser, Excel 10 и Statistica 8. Для улучшения качества сигнала были применены фильтры низких частот от 1 до 2 Гц.

Для визуального сравнения всех часовых записей строились спектральные плотности в программе EDFbrowser. Далее анализировались отрезки без артефактов длительностью 20–30 с. По данным отрезкам строились спектры мощности, определялась частота и амплитуда наибольшего пика. Значения амплитуды и частот спектра сохранялись для программы Excel. Для оценки достоверности результатов был применен непараметрический критерий Уилкоксона и критерий Стьюдента.

У всех животных вне зависимости от группы наблюдалась визуально нормальная картина ЭЭГ. При визуальном анализе записей никаких отклонений на ЭЭГ обнаружено не было, абсансная активность отсутствовала. Визуальный анализ спектральных плотностей показал уменьшение доли альфа-ритма относительно всего времени записи.

Было проведено сравнение средних амплитуд и частот по записям, очищенным от артефактов; различий в зависимости от типологических особенностей ВНД жи-

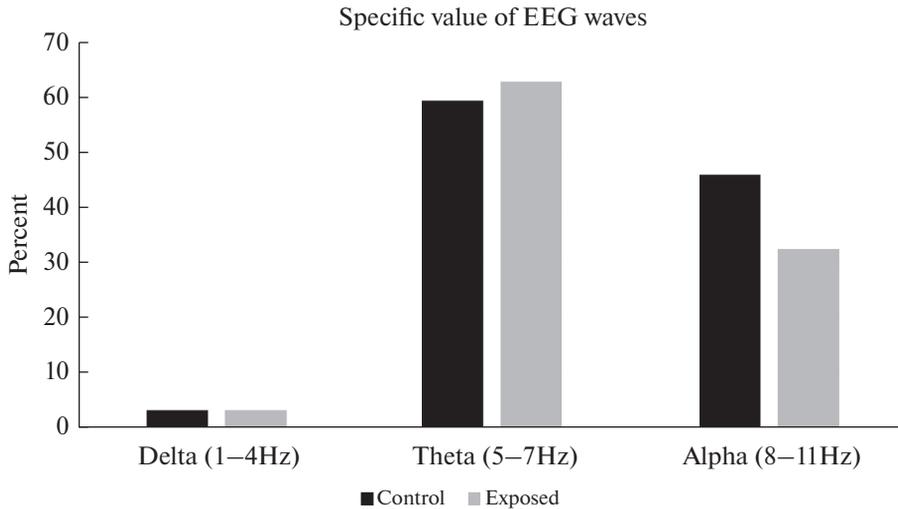


Рис. 6. Процентная доля различных ритмов в ЭЭГ контрольных и облученных животных.

вотных выявлено не было, поэтому дальнейший анализ проводили, сравнивая показатели контроля и всех крыс, подвергшихся экспериментальным воздействиям.

Исходя из проведенного анализа, наблюдали значимое ($p < 0.05$, t тест Стьюдента) уменьшение средней амплитуды и средней частоты ритма ЭЭГ у облученных крыс по сравнению с контрольными животными.

Для оценки изменения ритмов были посчитаны процентные соотношения вклада основных ритмов в электрическую активность мозга животных. Данные представлены на рис. 6.

Исходя из проведенного анализа, вклад дельта- и тета-ритмов несущественно увеличился, в то время как вклад альфа-ритма значительно снизился. Таким образом, после экспериментальных воздействий происходило ослабление альфа-ритма, наблюдаемое и при анализе спектральной плотности.

Нейрохимические исследования

В результате исследований в таламусе и фронтальной коре крыс экспериментальных групп были обнаружены существенные ($p < 0.05$, t -тест Левена) различия в концентрациях ГВК и соотношении ГВК/ДА, представленные на рис. 7 и 8.

Наиболее заметные различия между типологическими группами обнаружены в таламусе, который осуществляет передачу нервных импульсов коре в ответ на различные воздействия. Концентрация ГВК у крыс с преобладанием возбуждения (группа А) почти в 2 раза превышала таковую у крыс преимущественно тормозного типа (группа Е), что согласуется с результатами поведенческих исследований. Изменения затрагивали преимущественно дофаминергическую систему. Во фронтальной коре сохранялась та же тенденция, хотя и в значительной мере менее выраженная.

На данном этапе исследований мы также оценили соотношение основных тормозных и возбуждающих нейромедиаторов у крыс разных типологических групп после экспериментальных воздействий. Как и следовало ожидать, во фронтальной коре концентрация ГАМК – основного тормозного нейромедиатора оказалась выше у крыс с преобладанием торможения (группа Е) (рис. 9), однако без статистиче-

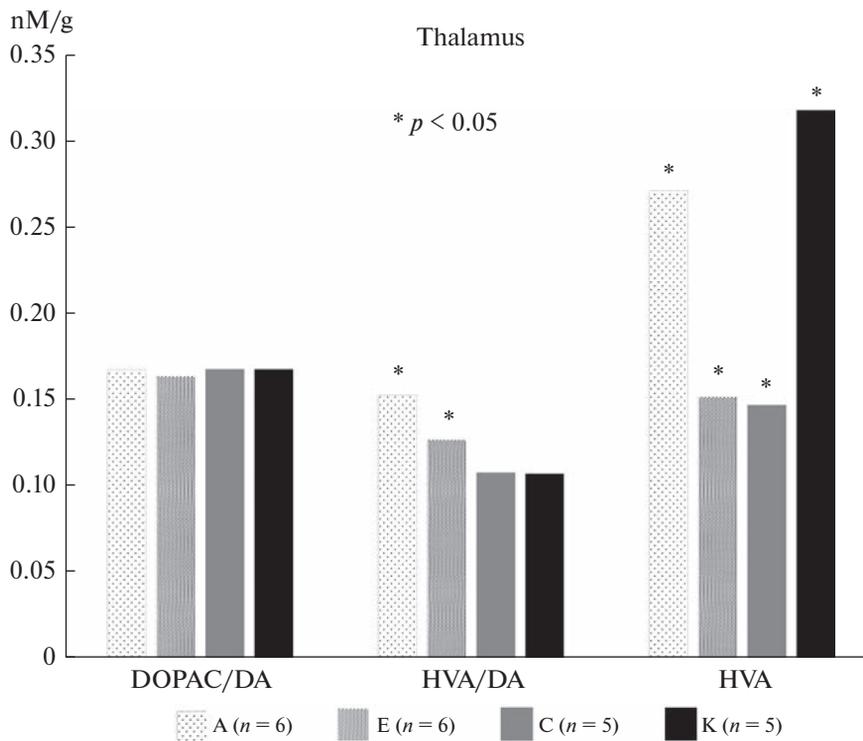


Рис. 7. Концентрации метаболитов моноаминов в таламусе крыс.

ски достоверного различия. Статистически достоверно ($p < 0.05$, t -тест Левена) концентрация ГАМК ниже у облученных животных по сравнению с экспериментальными. В то же время, в концентрации глутамата — основного возбуждающего нейромедиатора не было выявлено существенных различий между крысами разных типологических групп, однако было зарегистрировано существенное различие по этому показателю между соответствующими контрольными типологическими группами. Можно предположить, что сохраняющийся в течение длительного времени возбуждающий эффект экспериментальных воздействий нивелировал разницу между группами.

В таламусе и гипоталамусе существенных различий по этим показателям выявлено не было.

Ранее значительные изменения в концентрации моноаминов и их метаболитов были показаны в префронтальной коре при декапитации животных после предпринятых воздействий, в частности, после облучения крыс ионами углерода ^{12}C [13], но не в отдаленный период [14]. Аналогичные изменения происходили у крыс линии WAG/Raj на ранних этапах формирования абсансной эпилепсии, а также в ответ на фармакологическое воздействие — введение медапара, через 1 сутки после облучения протонами высоких энергий как на полете [15], так и в пике Брэгга [16].

Высокая чувствительность и реактивность как префронтальной, так и фронтальной коры относительно других исследованных структур мозга является фундаментальным свойством этой структуры. Повышенная реактивность этих структур к стрессу показана в ряде работ, в частности, в работе [17]. Медиальная префрон-

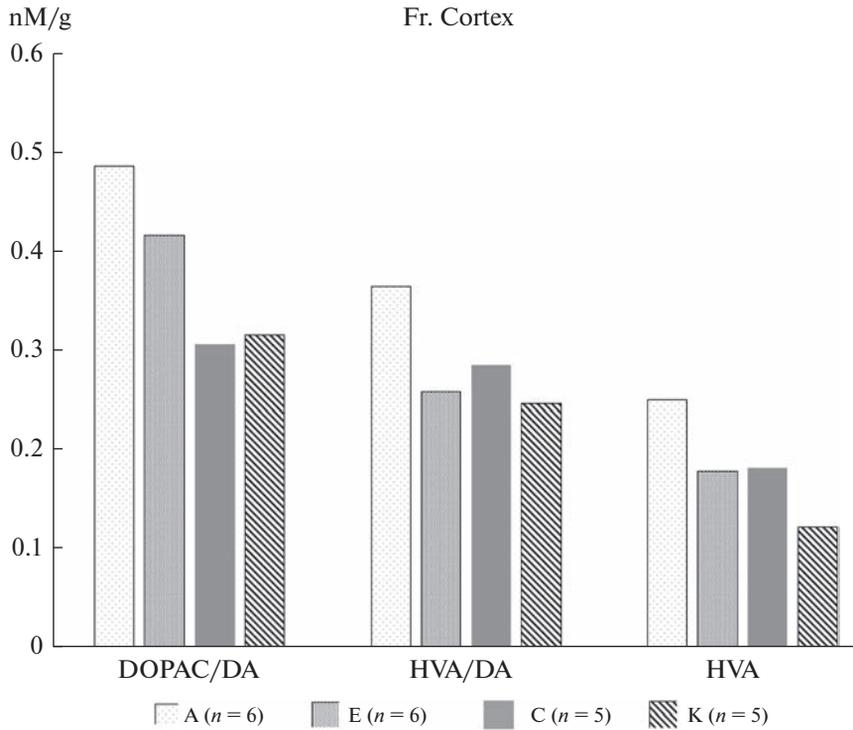


Рис. 8. Концентрации метаболитов моноаминов в фронтальной коре крыс.

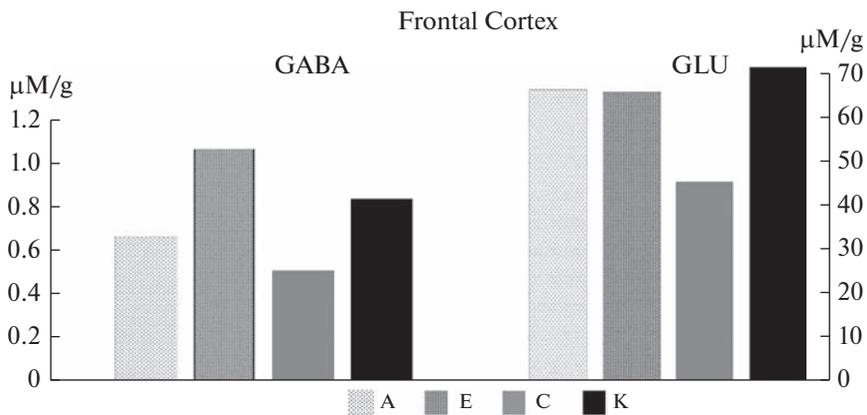


Рис. 9. Концентрации ГАМК и глутамата во фронтальной коре крыс.

тальная кора крыс является одним из важнейших узлов системы быстрого обучения, который извлекает недавние и отдаленные воспоминания [18]. Наблюдали быстрое усиление функционального сопряжения латеральной префронтальной коры, базальных ганглиев (хвостатого ядра – caudate nucleus и неостриатума – putamen) и орбитофронтальной коры, а также между латеральной префронтальной

корой и префронтальной корой [19]. Обнаружена быстрая реакция дорзо-латеральной верхней префронтальной коры к кодированию новых стимулов в ходе задач, требующих высокого уровня рабочей памяти [20].

Обнаружены также клеточные механизмы, способствующие реализации быстрых реакций нейронов префронтальной коры. Взаимодействие между ингибирующими быстрыми спайковыми интернейронами и возбуждающими пирамидальными нейронами крыс облегчает реализацию фундаментальных свойств корковых сетей. Ключевой функцией быстрых спайковых интернейронов является обеспечение быстрого торможения в локальных сетях сенсорной и моторной коры и обработки входной информации из таламуса в кору. Эти результаты свидетельствуют о наличии различных льготных подсетей или локальных сетей между быстрыми спайковыми интернейронами и пирамидальными клетками префронтальной коры крыс, которые могут быть специфическими для этой области коры [21]. Выявлена быстрая DA-ергическая модуляция содержания кальция и быстрых потенциалов в дендритах пирамидных нейронов префронтальной коры крыс [18]. В префронтальной коре DA-ергическая модуляция реализуется менее чем за 0.5 с, в то время как в других структурах эта реакция занимает несколько секунд.

Помимо того, что префронтальная кора формирует и контролирует эмоциональные и мотивационные состояния [22, 23], она играет ключевую роль в когнитивных процессах [24]. В то же время фронтальная кора отвечает за инициацию и контроль произвольных движений. Если у человека когнитивные процессы можно определить как приобретение знаний и опыта и их дальнейшее использование, то у животных это приобретение опыта и его дальнейшее использование. Еще одной из основных функций фронтальной и префронтальной коры при реализации поведения животными является принятие решения и выбор действия [25], также связанное с когнитивной деятельностью.

Таким образом, основной реакцией моноаминергических систем на примененные нами воздействия можно считать изменение активности дофаминергической системы, которая является одной из основных в процессе обучения. В то же время, изменение концентраций основных тормозного и возбуждающего нейромедиаторов вполне согласуется с поведенческими исследованиями и объясняет нейрохимические механизмы различий в поведении между животными разных типологических групп. Животные с изначально более низким метаболизмом дофамина и преобладанием ГАМК (“Эгоисты”) оказываются менее подверженными влиянию модельных факторов полета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Программа эксперимента утверждена Комиссией по биоэтике Института медико-биологических проблем РАН, протокол № 600 от 07.10.2021 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках базовой темы РАН 65.2.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов, явного или потенциального, который мог бы повлиять на публикацию результатов данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Методология и планирование эксперимента – А.С.Ш., А.А.П.; экспериментальные воздействия, поведенческое тестирование – В.А.П., А.А.П., О.С.К.; электроэнцефалографические исследования и обработка данных – К.Б.Л.-Г.; нейрохимические исследования – В.С.К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rabin BM, Joseph JA, Shukitt-Hale B* (2004) Heavy particle irradiation, neurochemistry and behavior: threshold, dose-response curves and recovery of function. *Advances in Space Res* 33: 1330–1333. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2003.09.051>
2. *Rabin BM, Joseph JA, Shukitt-Hale B* (2005) A longitudinal study of operant responding in rats irradiated when 2 months old. *Radiat Res* 164: 552–555. <https://doi.org/10.1667/rr3349.1>
3. *Britten RA, Davis LK, Johnson AM, Keeny S, Siegel A, Sanford LD, Singletary SJ, Lonart G* (2012) Low (2 cGy) doses of 1 GeV/u ^{56}Fe -particle radiation leads to a persistent reduction in the spatial learning ability of rats. *Radiat Res* 177: 146–151. <https://doi.org/10.1667/rr2637.1>
4. *Machida M, Lonart G, Britten A* (2010) Low (60 cGy) doses of ^{56}Fe HZE-particle radiation lead to a persistent reduction in the glutamatergic readily releasable pool in rat hippocampal synaptosomes. *Radiat Res* 174: 618–623. <https://doi.org/10.1667/RR1988.1>
5. *Лебедева-Георгиевская КБ, Кохан ВС, Шуртакова АК, Перевезенцев АА, Кудрин ВС, Штемберг АС, Базян АС* (2019) Нейробиологические эффекты комбинированного воздействия антиортостатического вывешивания и ионизирующих излучений различного качества. *Нейрохимия* 3: 254–264. [*Lebedeva-Georgievskaya KB, Kohan VS, Shurtakova AK, Perevezentsev AA, Kudrin VS, Shtemberg AS, Bazyan AS* (2019) Neurobiological effects of combined exposure to anti-orthostatic hanging and ionizing radiation of various quality. *Neurochemistry* 3: 254–264. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S1027813319030105>
6. *Штемберг АС, Перевезенцев АА, Лебедева-Георгиевская КБ, Митрофанова ОВ, Кудрин ВС, Базян АС* (2020) Роль типологических особенностей высшей нервной деятельности в нейробиологических эффектах комбинированного действия антиортостатического вывешивания, γ -излучения, протонов и ионов углерода ^{12}C . *Радиационная Биология Радиационная Биология* 1: 51–62. [*Shtemberg AS, Perevezentsev AA, Lebedeva-Georgievskaya KB, Mitrofanova OV, Kudrin VS, Bazyan AS* (2020) The role of typological features of higher nervous activity in the neurobiological effects of the combined action of anti-orthostatic hanging, gamma radiation, protons and carbon ions ^{12}C . *Radiat Biol Radioecol* 1: 51–62. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869803120010130>
7. *Семагин ВН, Зухарь АВ, Куликов МА* (1988) Тип нервной системы, стрессоустойчивость и репродуктивная функция. М. Наука. [*Semagin VN, Zuhar' AV, Kulikov MA* (1988) Type of nervous system, stress resistance and reproductive function. М. Nauka. (In Russ)].
8. *Штемберг АС* (1987) Роль индивидуальных типологических особенностей высшей нервной деятельности в формировании и радиационной устойчивости упроченных двигательных оборонительных условных рефлексов у крыс. *Изв АН СССР сер Биол* (4): 547–557. [*Shtemberg AS* (1987) The role of individual typological features of higher nervous activity in the formation and radiation stability of strengthened motor-defensive conditioned reflexes in rats. *Izv AN USSR ser Biol* (4): 547–557. (In Russ)].
9. *Симонов ПВ* (1976) Условные реакции эмоционального резонанса у крыс. В кн: Нейрофизиологический подход к анализу внутривидового поведения. М. Наука. [*Simonov PV* (1976) Conditional reactions of emotional resonance in rats. In: *Neurophysiological approach to the analysis of intraspecific behavior*. М. Nauka. (In Russ)].
10. *Айрапетянц МГ, Хоничева НМ, Мехедова АЯ, Ильяна Вильяр Х* (1980) Реакции на умеренные функциональные нагрузки у крыс с индивидуальными особенностями поведения. *Журн высш нервн деят* 5: 994. [*Ajrapetyanc MG, Honicheva NM, Mekhedova AYA, Il'jana Vil'yar X* (1980) Reactions to moderate functional loads in rats with individual behavioral characteristics. *J Higher Nerv Activity* 5: 994 (In Russ)].
11. *Хоничева НМ, Ильяна Вильяр Х* (1981) Характер поведения в ситуации избегания как критерий оценки типологических особенностей крыс. *Журн высш нервн деят* 5: 975–983. [*Honicheva NM, Il'jana Vil'yar H* (1981) The nature of behavior in a situation of avoidance as a criterion for assessing the typological characteristics of rats. *J Higher Nerv Activity* 5: 975–983.]
12. *Логановский КН* (2000) Невротические и психопатологические синдромы в отдаленном периоде воздействия ионизирующих излучений. *Журн неврол психиатр им СС Корсакова* 4: 15–21. [*Loganovskij KN* (2000) Neurotic and psychopathological syndromes in the

- long-term period of exposure to ionizing radiation. *J Neurol Psychiatr named after SS Korsakov* 4: 15–21. (In Russ)].
13. *Штемберг АС, Базян АС, Лебедева-Георгиевская КБ, Матвеева МИ, Кудрин ВС, Кохан ВС* (2013) Влияние облучения протонами высокой энергии на поведение крыс и его нейрохимические механизмы. *Авиакосм эколог мед* 6: 54–60. [*Shtemberg AS, Bazyan AS, Lebedeva-Georgievskaya KB, Matveeva MI, Kudrin VS, Kohan VS* (2013) The effect of high-energy proton irradiation on rat behavior and its neurochemical mechanisms. *Aerospace Ecol Med* 6: 54–60. (In Russ)].
 14. *Штемберг АС, Кохан ВС, Кудрин ВС, Матвеева МИ, Лебедева-Георгиевская КБ, Тимошенко ГН, Молоканов АГ, Красавин ЕА, Наркевич ВБ, Клодт ПМ, Базян АС* (2015) Воздействие высокоэнергетических протонов в пике Брэгга на поведение крыс и обмен моноаминов в некоторых структурах мозга. *Нейрохимия* 1: 78–85. [*Shtemberg AS, Kohan VS, Kudrin VS, Matveeva MI, Lebedeva-Georgievskaya KB, Timoshenko GN, Molokanov AG, Krasavin EA, Narkevich VB, Klodt PM, Bazyan AS* (2015) The effect of high-energy protons at Bragg peak on rat behavior and monoamine metabolism in some brain structures. *Neurochemistry* 1: 78–85. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S1027813315010100>
 15. *McGregor IS* (1991) Contrasting effects of stress on medial and sulcal prefrontal cortex self-stimulation. *Brain Res Bull* 27(2): 225–229.
 16. *Ruge H, Wolfensteller U* (2013) Functional integration processes underlying the instruction-based learning of novel goal-directed behaviors. *Neuroimage* 68: 162–172.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.12.003>
 17. *Tulving E* (1972) Episodic and semantic memory. In: *Organization of Memory. E Tulving, W Donaldson* (Eds). New York. Acad. 381–403.
 18. *King D, Zigmund MJ, Finlay JM* (1997) Effects of dopamine depletion in the medial prefrontal cortex on the stress-induced increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens and shell. *Neurology* 1: 141–153.
 19. *Zaitsev AV, Lewis DA* (2013) Functional properties and short-term dynamics of unidirectional and reciprocal synaptic connections between layer 2/3 pyramidal cells and fast-spiking interneurons in juvenile rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 38 (7): 2988–2998.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12294>
 20. *Маркель АЛ* (1981) К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте “открытого поля”. *Журн высш нервн деят* 2: 301–307. [*Markel' AL* (1981) To assess the main characteristics of the behavior of rats in the “open field” test. *J Higher Activity* 2: 301–307. (In Russ)].
 21. *Zhou WL, Antic SD* (2012) Rapid dopaminergic and GABAergic modulation of calcium and voltage transients in dendrites of prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Physiol* 590 (16): 3891–3911.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.227157>
 22. *Белокопытова КВ, Белов ОВ, Кудрин ВС, Наркевич ВБ, Клодт ПМ, Базян АС, Красавин ЕА, Тимошенко ГН* (2015) Распределение моноаминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс в поздние сроки после облучения ионами ¹²C. *Нейрохимия* 3: 243–251. [*Belokopytova KV, Belov OV, Kudrin VS, Narkevich VB, Klodt PM, Bazyan AS, Krasavin EA, Timoshenko GN* (2015) Distribution of monoamines and their metabolites in rat brain structures in the late stages after irradiation with ¹²C ions. *Neurochemistry* 3: 243–251. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S1027813315030024>
 23. *Vechara A, Damasio AR* (2005) The Somatic Marker Hypothesis: A neural theory of economic decision. *Games Econom Behav* 52(2): 336–372.
<https://doi.org/10.1016/j.geb.2004.06.010>

Neurobiological Effects of Combined Exposure to Antiorthostatic Suspension, Quasi-Chronic Gamma Irradiation and Heavy Ion Irradiation in Rats

A. A. Perevezentsev^a, K. B. Lebedeva-Georgievskaya^a, O. S. Kuznetsova^a, V. S. Kudrin^{a, b}, V. A. Pikalov^c, and A. S. Shtemberg^{a, *}

^a*Institute of BioMedical Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Zakusov Institute of Pharmacology of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

^c*Logunov Institute for High Energy Physics of NRC KI, Protvino, Russia*

*e-mail: andrei_shtemberg@mail.ru

We have researched neurobiological effects of physical impacts, modeling conditions of interplanetary space flight: microgravity (modeled by AntiOrthostatic Suspension, AOS) and deep space radiation (modeled by quasi-chronic gamma irradiation and head irradiation).

ation by ^{12}C ions) taking into account typological characteristics of high nervous activity (HNA) of model animals (Long Evans male rats). Behavioral changes, as well as EEG and neurochemical changes in key brain areas are investigated. We have shown difference between control and exposed animals, as well as between animals of different HNA typologies (more or less excitable), in motoric and research activity aside as in cognitive abilities. Such difference is driven by shift in balance in main inhibition and excitation-related neurotransmitters, GABA and GLU and dopaminergic system. In particular, more excitable rats learn faster but are more vulnerable to mentioned model impacts. As a clear sign of HNA distortion we also found some changes in EEG waves.

Keywords: space radiation, interplanetary space, flight galactic cosmic rays, microgravity, behavior, neurochemistry

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА ТРАНСПОРТ ВОДЫ В КЛЕТКАХ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО МЕЗОТЕЛИЯ КРЫС

© 2023 г. Г. С. Батурина^{1, 2, *}, Л. Е. Каткова¹, Е. И. Соленов^{1, 2, 3}

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный технический университет,
Новосибирск, Россия

*E-mail: baturina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 22.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Глюкоза широко применяется в качестве осмотического агента при изготовлении растворов для перитонеального диализа. Целью данной работы было изучение влияния глюкозы на экспрессию водного канала аквапорина-1 (AQP1) и транскрипционного фактора TopEBP, а также на водную проницаемость плазматической мембраны клеток первичной культуры мезотелия брыжейки крыс линии Вистар. В работе использовали метод флуоресцентной микроскопии с внутриклеточным красителем кальцеином. Содержание мРНК оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Предварительная инкубация клеток в среде DMEM, содержащей глюкозу (2.3%, 24 ч, 37°C, 5% CO₂), приводила к снижению экспрессии генов *aqp1* в среднем на 60% (контроль 0.87 ± 0.18 ; глюкоза 0.34 ± 0.12 , $n = 9$, $p < 0.05$) и *tonebp* на 20% (контроль 0.37 ± 0.024 ; глюкоза 0.30 ± 0.01 , $n = 9$, $p < 0.05$). Обнаружено также снижение проницаемости плазматической мембраны клеток перитонеального мезотелия для воды после суточной предварительной инкубации с глюкозой в среднем на 40% (контроль $7.3E-3 \pm 1.3E-3$ (см/с) ($n = 27$), глюкоза $4.3E-3 \pm 3.8E-4$ (см/с) ($n = 57$), $p < 0.01$). Результаты исследования свидетельствуют о том, что глюкоза может оказывать ингибирующий эффект на транспортные процессы в клетках мезотелия брюшины, что при многократных воздействиях может приводить к структурным и функциональным нарушениям перитонеальной мембраны.

Ключевые слова: перитонеальный диализ, водная проницаемость, мезотелиальные клетки брюшины, аквапорин 1, глюкоза

DOI: 10.31857/S0869813923030081, **EDN:** FSTGFP

Перитонеальный диализ (ПД) является общепринятой формой заместительной терапии в терминальной стадии почечной недостаточности, при котором происходит обмен растворенными веществами и водой между капиллярной кровью и диализной жидкостью в брюшинной полости через перитонеальную мембрану, состоящую из сосудистого эндотелия, интерстиция и мезотелиального монослоя. Длительное применение перитонеального диализа (по данным ВОЗ, 2–10 лет) вызывает различные морфофункциональные изменения брюшины, такие как фиброз, ангиогенез, снижение скорости переноса растворенных веществ – недо-

статочность ультрафильтрации [1, 2]. Одной из основных причин возникающих нарушений, приводящих к отравлениям “уремическими токсинами” и перитониту, считают воздействие диализной жидкости, имеющей низкий рН, повышенную осмолярность за счет содержания высоких концентраций глюкозы и продуктов ее термического распада [3–5]. Для достижения адекватного удаления воды и растворенных веществ из циркулирующей крови, жидкости для ПД содержат глюкозу в высоких концентрациях, создающую гипертоническую среду в диапазоне от 344 до 511 мОсм/кг Н₂О [6]. Гипертоничность диализных растворов, созданная глюкозой, рассматривается как ключевой фактор, способствующий структурным и функциональным изменениям перитонеальной мембраны [7–9]. Глюкоза требуется большинству клеток для метаболических функций, таких как дыхание, синтез белка или хранение энергии в виде гликогена. Кроме того, в клетке глюкоза играет роль сигнальной молекулы и может оказывать влияние на транскрипцию генов, активность ферментов, секрецию гормонов и другие клеточные функции [10]. Существует множество изоформ переносчиков глюкозы с различными кинетическими свойствами и различной регуляцией экспрессии, что обеспечивает тонкую настройку входа глюкозы в клетку и генерацию сигналов с целью сохранения метаболической целостности клеток и всего организма.

Гипертоническая среда вызывает быстрое снижение объема клетки, в результате чего активируются адаптационные механизмы регуляторного повышения клеточного объема, включающие в себя усиление поступления в клетку воды, органических и неорганических осмолитов и активацию транскрипционного фактора TonEBP. Транскрипционный фактор TonEBP (другое название NFAT5) регулирует экспрессию генов, обеспечивающих выживание клеток при гипертоническом стрессе. Гипертоническое воздействие индуцирует фосфорилирование TonEBP, которое коррелирует с повышенной ядерной локализацией этого фактора [11]. Известно, что осмотическая водная проницаемость клеток перитонеального мезотелия в значительной мере определяется водным каналом аквапорином-1 (AQP1) [12].

Исследование фундаментальных механизмов регуляции транспорта воды в мезотелиальных клетках брюшины является важным для понимания осмопротекторных механизмов и служит теоретической основой для создания более биосовместимых жидкостей для перитонеального диализа. С этой целью в настоящей работе изучался транспорт воды через плазматическую мембрану клеток мезотелиальной выстилки брюшины крыс при воздействии гипертонической среды, содержащей в качестве осмотического агента глюкозу. Кроме того, был проведен анализ содержания мРНК аквапорина 1 (AQP1) и транскрипционного фактора TonEBP при суточном воздействии на клетки перитонеального мезотелия среды, содержащей глюкозу в качестве осмотического агента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе использованы ткани взрослых крыс (150–200 г) линии Вистар обоих полов, выращенных на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН.

Выделение мезотелиальных клеток брюшины

Процедуру выделения мезотелиальных клеток брюшины проводили по протоколу, описанному нами ранее [13]. Фрагменты париетальной брюшины (200–300 мг) брали в стерильных условиях и инкубировали с минимальным объемом 0.25%-ного раствора трипсина (раствор трипсина-ЭДТА, Sigma, США) в течение 5 мин при

Таблица 1. Последовательности специфических праймеров для проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Прямая последовательность	Обратная последовательность	Литературный источник
<i>hprt1</i>	AGTTTGTGTGGATATGCCCTTG	TGTAGATTCAACTTGCCGCTGTC	[14]
<i>aqp1</i>	CTTACCTCCAGGACCCTTCC	AGCTCATCCACACGTGCTC	[15]
<i>tonebp</i>	GTCTCCTCTTTATCCCCACAG	TGCCAAATAAGAACATTCTGA	

37°C. Затем ткань переносили в 10–15 мл низкокальциевого фосфатно-солевого буфера (мМ: 137 NaCl; 4.7 Na₂HPO₄; 2.7 KCl; 1.5 KH₂PO₄; 0.5 MgCl₂; 0.05 CaCl₂; 5 глюкоза; 291 мОсм/кг H₂O; pH 7.4) и встряхивали в течение 2 мин. Остаточную ткань удаляли из раствора, а суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об./с. Процедуру повторяли 3 раза. Клеточный осадок ресуспендировали в 15 мл культуральной среды DMEM (Sigma Aldrich, США) с 20% эмбриональной бычьей сывороткой (Sigma Aldrich, США), после чего 2 мл аликвоты клеточной суспензии переносили в чашки Петри диаметром 35 мм и выращивали на покровных стеклах (22 × 22 мм) в среде DMEM в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO₂ при 37°C. За 24 ч до эксперимента в культуральную среду экспериментальной группы клеток добавляли глюкозу до конечной концентрации 2.3%.

Выделение мРНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Выделение тотальной РНК из клеточных культур проводили с помощью реагента TRIzol (Ambion, США) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили как описано нами ранее [14]. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе CFX96 real-time PCR (BioRad, США) с использованием “Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green” (Синтол, Россия) в объеме 25 мкл. Температурный профиль для проведения ПЦР в реальном времени: 95°C 5 мин, 39 циклов 60°C 45 с, 80°C 5 с, 95°C 15 с. В качестве гена внутреннего контроля использовали гипоксантин фосфорибозил-трансферазу 1 (HPRT1). Данные анализировались с помощью пакета программ CFXQ13 Manager Software version 1.5 (Bio-Rad). Последовательности праймеров для ПЦР приведены в табл. 1. Праймеры на *tonebp* были сконструированы в ЦКП “Геномика” ИХБФМ СО РАН. Специфичность амплификации фрагментов кДНК интересующих нас генов при проведении ПЦР анализа в режиме реального времени была подтверждена прямым секвенированием продуктов ПЦР по Сэнгеру в ЦКП “Геномика” ИХБФМ СО РАН.

Измерение водной проницаемости плазматической мембраны клеток

Непосредственно перед измерением клетки были сбалансированы в растворе фосфатно-солевого буфера (мМ: 137 NaCl; 4.7 Na₂HPO₄; 2.7 KCl; 1.5 KH₂PO₄; 0.5 MgCl₂; 1 CaCl₂; 5 глюкоза; 280 мОсм/кг H₂O; pH 7.4). Гипертонический раствор фосфатно-солевого буфера осмоляльностью 560 мОсм/кг H₂O получали добавлением 280 мМ маннитола. Измерения динамики объема клеток при набухании проводили методом, основанном на эффекте гашения флуоресценции красителя кальцеина белками цитоплазмы, как описано ранее [16]. Кривую входа воды в клетки записывали при изменении осмотического давления среды с 280 до 560 мОсм/кг H₂O. Начальные участки профилей величин относительной флуоресценции, отражающие процесс входа воды в клетку, аппроксимировали линейной функцией.

Расчет коэффициента линейной регрессии проводили, используя линейную аппроксимацию начального участка кривой методом наименьших квадратов. Методика расчета водной проницаемости опубликована нами ранее [17], ниже приведены основные тезисы для расчета.

Осмотическое движение воды представляет собой поток воды через плазматическую мембрану, вызванный градиентом осмотического давления, что приводит к изменению объема клетки:

$$\frac{dV}{dt} = -AV_w P_f \Delta C,$$

где (dV/dt) – скорость изменения объема клеток, A – площадь поверхности клетки, V_w – парциальный молярный объем воды ($18 \text{ см}^3/\text{моль}$), P_f – коэффициент осмотической водной проницаемости, ΔC – разность осмотических концентраций ($C_{\text{in}} - C_{\text{out}}$).

Осмотическую водную проницаемость мембраны клетки рассчитывали по скорости изменения клеточного объема во время осмотического воздействия по формуле:

$$P_f = K_r [AV_w (C_{\text{in}} - C_{\text{out}})]^{-1}.$$

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы OriginLab 2015 (Великобритания) для вычисления парного t -критерия Стьюдента. Количество образцов, взятых в реакцию – n . Количество животных, использованных в каждой экспериментальной группе, не менее 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перитонеальный диализ основан на введении гипертонического раствора в брюшную полость пациента с целью удаления избытка воды вместе с ионами и продуктами метаболизма. В этих условиях мезотелиальные клетки брюшины хронически подвергаются воздействию гипертонических условий. Обычные растворы для ПД имеют низкий рН и содержат токсичные продукты разложения глюкозы, образующиеся при температурной стерилизации. Были разработаны “биосовместимые” двухкамерные растворы для ПД, отделяющие глюкозу от буфера во время стерилизации и хранения. Они имеют рН, близкий к физиологическому, и в значительной степени лишены токсичных продуктов термического разложения глюкозы. Тем не менее, оказалось, что и “биосовместимые” диализные жидкости по-прежнему вызывают серьезную трансформацию перитонеальной мембраны во время хронического ПД, что приводит к перитонеальному фиброзу и гиперваскуляризации [18–21]. Механизмы, вовлеченные в структурные и функциональные изменения клеток мезотелия при ПД, остаются неясными, но длительное воздействие на перитонеальную мембрану гипертонического диализного раствора, содержащего глюкозу в высоких концентрациях, может играть важную роль в изменении метаболизма перитонеальных клеток [7–9]. Известно, что гипергликемия приводит к нарушению функции белков в результате процесса неферментативного гликозилирования и образования конечных продуктов ускоренного гликозилирования, тем самым изменяя их функциональные свойства [22]. Как сигнальная молекула, глюкоза может активировать сигнальные механизмы, регулирующие транскрипцию генов, активность ферментов, секрецию гормонов и нейрональную активность. Большинство клеток млекопитающих импортируют глюкозу посредством процесса облегченной диффузии, опосредуемого членами семейства мембранных транспортных белков Glut (SLC2A). Порядка 14 белков Glut экспрессируются в организ-

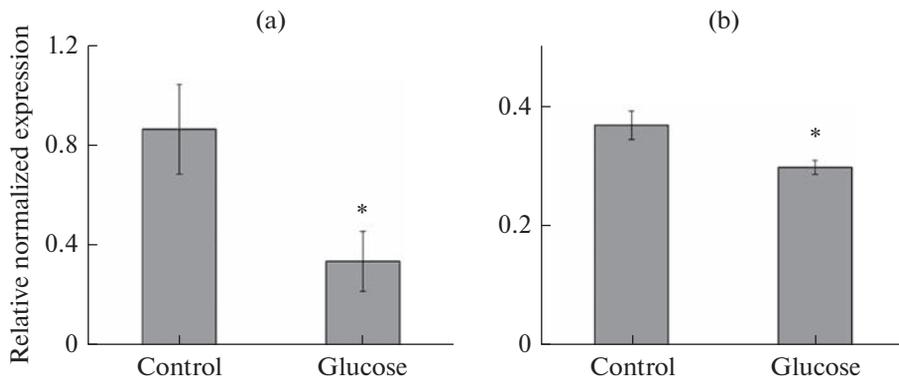


Рис. 1. Влияние суточной инкубации с глюкозой (2.3%) на уровень мРНК (а) аквапорина-1 (AQP1) и (б) транскрипционного фактора *tonebp* в мезотелиальных клетках брюшины крыс. * – $p < 0.05$, $n = 9$.

ме человека, и они включают переносчики субстратов, отличных от глюкозы (фруктоза, миоинозитол, урат и др.) [10]. Известно, что гипертоническое воздействие активирует транскрипцию многих транспортеров органических осмолитов, а также некоторых водных и ионных каналов, что рассматривается как общий механизм защиты клеток от снижения объема [23].

В проведенном нами исследовании методом ПЦР в реальном времени были выявлены изменения экспрессии чувствительного к тоничности среды транскрипционного фактора TonEBP и водного канала AQP1 в первичной культуре клеток перитонеального мезотелия после их инкубации в течение 24 ч в культуральной среде DMEM, содержащей глюкозу (2.3%). Результаты измерения уровня мРНК водного канала AQP1, нормализованные к уровню мРНК гена домашнего хозяйства *hprt1* свидетельствуют, что глюкоза вызывает подавление его экспрессии в клетках перитонеального мезотелия в среднем на 60% (контроль 0.87 ± 0.18 ; глюкоза 0.34 ± 0.12 , $n = 9$, $p < 0.05$) (рис. 1а).

Вопрос об экспрессии AQP1 в мезотелиальных клетках брюшины и его функциональной роли при ПД долгое время оставался дискуссионным. Рядом исследователей AQP1 был обнаружен только в эндотелии перитонеальных капилляров, но не в мезотелиальных клетках [24]. Другими авторами на клеточных линиях была обнаружена конститутивная экспрессия AQP1 в мезотелиальных клетках брюшины человека. Кроме того, было продемонстрировано ее повышение под воздействием осмотических агентов (глюкозы и маннитола) [12]. Эксперименты с использованием иммунофлуоресценции подтвердили экспрессию AQP1 в клетках мезотелия [25]. На мышах, нокаутных по гену *aqp1*, показано снижение водной проницаемости перитонеальной мембраны [26], что подтверждает важную роль этого водного канала в ПД. Механизмы регуляции экспрессии гена *aqp1* в клетках перитонеального мезотелия при гипертонических условиях нуждаются в дальнейшем исследовании.

Инкубация клеток перитонеального мезотелия в течение 24 ч в культуральной среде, содержащей 2.3% глюкозы, также приводила к небольшому, но достоверному снижению экспрессии *tonebp* по сравнению с контролем (контроль 0.37 ± 0.024 ; глюкоза 0.3 ± 0.012 , $n = 9$, $p < 0.05$), (рис. 1б). Влияние гипертонической среды, созданной глюкозой, на содержание мРНК транскрипционного фактора TonEBP в клетках перитонеального мезотелия в настоящей работе показано впервые. Механизм влияния фактора TonEBP на регуляцию клеточного объема в данных клетках не изучен и требует дальнейшего исследования.

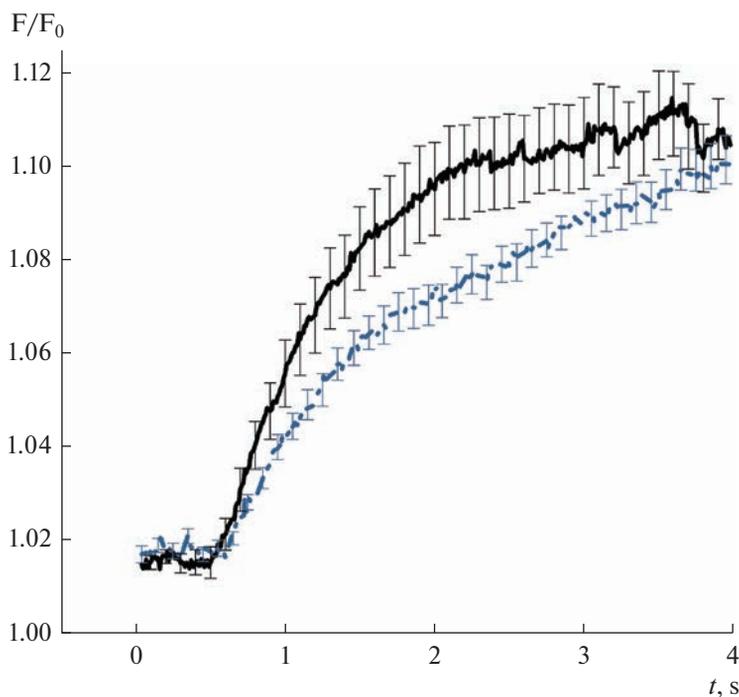


Рис. 2. Динамика увеличения клеточного объема, отражающая вход воды в мезотелиальные клетки брюшины, охарактеризованная по усредненным профилям флуоресценции кальцеина (F/F_0) ($M \pm SEM$). Контроль — сплошная линия ($n = 27$). Эффект 24-часовой инкубации в гипертонической среде (2.3% глюкозы) — пунктирная линия ($n = 57$).

Согласно полученным в настоящей работе данным, предварительная инкубация с глюкозой (2.3%) в течение суток достоверно замедляет поступление воды в мезотелиальные клетки брюшины при гипосмотическом воздействии. На рис. 2 представлены усредненные кривые флуоресценции, отражающие динамику поступления воды в клетки перитонеального мезотелия при осмотическом воздействии. Водная проницаемость клеток мезотелия брюшины была рассчитана с использованием значений коэффициента линейной регрессии начального участка кривой флуоресценции красителя кальцеина ($(F/F_0)/c$) и составила в контроле $7.3E-3 \pm \pm 1.3E-3$ см/с, $n = 27$, после предварительной инкубации с глюкозой — $4.3E-3 \pm \pm 3.8E-4$ см/с, $n = 57$, $p < 0.01$.

Таким образом, глюкоза приводит к снижению водной проницаемости клеток перитонеального мезотелия, к падению экспрессии водного канала AQP1 и транскрипционного фактора TonEBP. Данные результаты подтверждают факт ингибирующего воздействия глюкозосодержащих растворов на транспортные процессы в клетках перитонеального мезотелия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа проведена с соблюдением “Правил работ с использованием экспериментальных животных” (приложение к приказу Министерства здравоохранения. № 755 от 12.08.1977) и международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным EU (86/609/ЕЕС).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0019 и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-015-00147а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.И.С.), сбор данных (Г.С.Б., Л.Е.К., Е.И.С.), обработка данных и написание манускрипта (Г.С.Б., Л.Е.К.), обсуждение и редактирование манускрипта (Г.С.Б., Л.Е.К., Е.И.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yung S, Chan TM* (2012) Pathophysiological changes to the peritoneal membrane during PD-related peritonitis: the role of mesothelial cells. *Mediat Inflamm* 2012: 484167. <https://doi.org/10.1155/2012/484167>
2. *Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez BS, Jiménez-Hefernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A Gamallo CC, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M* (2003) Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 348: 403–413. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020809>
3. *Davies SJ, Bryan J, Phillips L, Russell GI* (1996) Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol Dial Transplant* 11: 498–506.
4. *Davies SJ, Phillips L, Naish PF, Russell GI* (2001) Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 12: 1046–1051. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1251046>
5. *Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT* (2002) Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 470–479. <https://doi.org/10.1681/ASN.V132470>
6. *Schmitt CP, Bakkaloglu SA, Klaus G, Schröder C, Fischbach M* (2011) Solutions for peritoneal dialysis in children: recommendations by the European Pediatric Dialysis Working Group. *Pediatr Nephrol* 26: 1137–1147. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1863-4>
7. *Ha H, Lee HB* (2000) Effect of high glucose on peritoneal mesothelial cell biology. *Peritoneal Dialysis Int* 20 (Suppl 2): S15–S18. <https://doi.org/10.1177/089686080002002S04>
8. *Perl J, Nessim SJ, Bargman JM* (2011) The biocompatibility of neutral pH, low-GDP peritoneal dialysis solutions: benefit at bench, bedside, or both? *Kidney Int* 79: 814–824. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.515>
9. *Hiay H, Johnson DW, Wiggins KJ, Badve SV, Craig JC, Strippoli G, Cho Y* (2018) Biocompatible dialysis fluids for peritoneal dialysis. *Meta-Analysis Cochrane Database Syst Rev* 10: CD007554. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007554.pub3>
10. *Thorens B, Mueckler M* (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E141–E145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>
11. *Kumar R, DuMond JF, Khan SH, Thompson EB, He Y, Burg MB, Ferraris JD* (2020) NFAT5, which protects against hypertonicity, is activated by that stress via structuring of its intrinsically disordered domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 20292–20297. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911680117>
12. *Lai KN, Li FK, Lan HY, Tang S, Tsang AWL* (2001) Expression of aquaporin-1 in human peritoneal mesothelial cells and its upregulation by glucose in vitro. *JASN* 12: 1036–1045. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1251036>
13. *Baturina GS, Katkova LE, Schmitt CP, Solenov EI, Zarogiannis SG* (2021) Comparison of Isotonic Activation of Cell Volume Regulation in Rat Peritoneal Mesothelial Cells and in Kidney Outer Medullary Collecting Duct Principal Cells. *Biomolecules* 11: 1452. <https://doi.org/10.3390/biom11101452>
14. *Ivanova LN, Babina AV, Baturina GS, Katkova LE* (2013) Effect of vasopressin on the expression of genes for key enzymes of hyaluronan turn over in Wistar Albino Glaxo and Brattleboro rat

- kidneys. *Exp Physiol* 98: 1608–1619.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.073163>
15. Yu D, Thelin WR, Randell SH, Boucher RC (2012) Expression profiles of aquaporins in rat conjunctiva, cornea, lacrimal gland and Meibomian gland. *Exp Eye Res* 103: 22.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.07.005>
 16. Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: 426–432.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>
 17. Zarogiannis SG, Ilyaskin AV, Baturina GS, Katkova LE, Medvedev DA, Karpov DI, AP, Ershov, Solenov EI (2013) Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypo-osmotic shocks. *Math Biosci* 2: 176–187.
<https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.007>
 18. Schaefer B, Bartosova M, Macher-Goeppinger, Ujszaszi A, Wallwiener M, Nyarangi-Dix J, Sallay P, Burkhardt D, Querfeld U, Pfeifle V (2016) Quantitative Histomorphometry of the Healthy Peritoneum. *Nat Publ Gr* 6: 21344.
<https://doi.org/10.1038/srep21344>
 19. Schaefer B, Bartosova M, Macher-Goeppinger S, Sallay P, Vörös P, Ranchin B, Vondrak K, Ariceta G, Zaloszye A, Bayazit AK (2018) Neutral pH and low-glucose degradation product dialysis fluids induce major early alterations of the peritoneal membrane in children on peritoneal dialysis. *Kidney Int* 94: 419–429.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.02.022>
 20. Schmitt CP, Nau B, Gemulla G, Bonzel KE, Hölttä T, Testa S, Fischbach M, John U, Kemper MJ, Sander A et al. (2013) Article Effect of the Dialysis Fluid Buffer on Peritoneal Membrane Function in Children. *Clin J Am Soc Nephrol* 8: 108–115.
<https://doi.org/10.2215/CJN.00690112>
 21. Blake PG (2018) Is the peritoneal dialysis biocompatibility hypothesis dead? *Kidney Int* 94: 246–248.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.04.014>
 22. Wautier JL, Schmidt AM (2004) Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 95: 233–238.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137876.28454.64>
 23. Tian W, Cohen DM (2001) Urea inhibits hypertonicity-inducible TonEBP expression and action. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F904–F912.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.5.F904>
 24. Devuyt O, Nielsen S, Cosyns JP, Smith BL, Agre P, Squifflet JP, Pouthier D, Goffin E. (1998) Aquaporin-1 and endothelial nitric oxide synthase expression in capillary endothelia of human peritoneum. *Am J Physiol* 275: H234–H242.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.1.H234>
 25. Corciulo S, Nicoletti MC, Mastrofrancesco L, Milano S, Mastrodonato M, Carmosino M, Gerbino A, Corciulo R, Russo R, Svelto M, Gesualdo L, Procino G (2019) AQP1-Containing Exosomes in Peritoneal Dialysis Effluent As Biomarker of Dialysis Efficiency. *Cells* 8: 330.
<https://doi.org/10.3390/cells8040330>
 26. Yang B, Folkesson HG, Yang J, Matthay MA, Ma T, Verkman AS (1999) Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice. *Am J Physiol* 276: C76–C81.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.1.C76>

Effect of Glucose on Water Transport in Rat Peritoneal Mesothelium Cells

G. S. Baturina^{a, b, *}, L. E. Katkova^a, and E. I. Solenov^{a, b, c}

^a*Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^c*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia*

*e-mail: baturina@bionet.nsc.ru

Glucose is widely used as an osmotic agent in the preparation of solutions for peritoneal dialysis. The aim of this work was to study the effect of glucose on the expression of the water channel aquaporin-1 (AQP1) and the transcription factor TonEBP, as well as on water permeability of cells in the primary mesothelial mesentery culture of Wistar rats. The method of fluorescence microscopy with intracellular dye calcein was

used in the work. The mRNA content was evaluated by real time RT-PCR. Preincubation of cells in a DMEM medium containing glucose (2.3%, 24 hours, 37°C, 5% CO₂) led to a decrease in the expression of the *aqp1* gene by approx. 60% (control 0.87 ± 0.18 ; glucose 0.34 ± 0.12 , $n = 9$, $p < 0.05$) and *tonebp* by 20% (control 0.37 ± 0.024 ; glucose 0.3 ± 0.012 , $n = 9$, $p < 0.05$). A decrease by 40% in the permeability to water of the plasma membrane of peritoneal mesothelium cells after 24 h preincubation with glucose was also observed (control $7.3E-3 \pm 1.3E-3$ (sm/s), $n = 27$; glucose $4.3E-3 \pm 3.8E-4$ (sm/s), $n = 57$, $p < 0.01$). The results of the study indicate that glucose can have an inhibitory effect on the transport processes in the cells of the peritoneal mesothelium, which, with multiple exposures, can lead to structural and functional disorders of the peritoneal membrane.

Keywords: peritoneal dialysis, water permeability, peritoneal mesothelial cells, aquaporin 1, glucose

ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ ФИБРИЛЛОГЕННОГО БЕЛКА β2-МИКРОГЛОБУЛИНА, КОНЪЮГИРОВАННОГО С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ПОЛИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ

© 2023 г. Р. Г. Сахабеев^{1, 2, *}, Д. С. Поляков², Е. С. Сеницына³,
Е. Г. Коржикова-Влах³, В. А. Коржиков-Влах^{3, 4}, М. М. Шавловский²

¹Санкт-Петербургский технологический институт (Технический университет),
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: helm505@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2023 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 10.02.2023 г.

В работе изучали влияние состава и размера полимерных частиц на иммуногенность фибриллогенного белка β2-микроглобулина, иммобилизованного на их поверхности. С этой целью использовали наночастицы (НЧ) на основе сополимера L-глутаминовой кислоты и L-фенилаланина (П(Глу-со-Фен)) и блок-сополимера поли(этиленгликоля) с поли(молочной кислотой) (ПЭГ-β-ПМК), а также микрочастицы (МЧ) на основе поли(молочной кислоты) (ПМК). НЧ на основе сополимера α-L-аминокислот получали методом градиентной инверсии фаз, а НЧ на основе ПЭГ-β-ПМК – методом наноосаждения. Для формирования полимерных МЧ на основе ПМК использовали метод двойной эмульсии. Рекombинантный химерный модельный белок бета-2-микроглобулин-зеленый флуоресцентный белок (β2M-sfGFP) использовали для ковалентной модификации всех типов полимерных частиц с последующей иммунизацией четырех равных по численности групп лабораторных животных. Для оценки гуморального иммунного ответа использовали метод иммуноферментного анализа. В трех экспериментальных группах проводили иммунизацию мышей с использованием НЧ на основе полиаминокислот (НЧ-ПАК) и ПЭГ-β-ПМК (НЧ-ПМК), а также МЧ ПМК, содержащих на поверхности иммобилизованный β2M-sfGFP. Иммунизацию контрольной группы проводили с использованием физической смеси НЧ ПЭГ-β-ПМК и свободного β2M-sfGFP. Наибольший уровень антител к sfGFP в сыворотке крови содержался в случае иммунизации мышей смесью белка и НЧ. При иммунизации мышей НЧ, модифицированными β2M-sfGFP, количество антител к sfGFP было значимо ниже ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. Однако между собой группы, иммунизированные НЧ схожего размера, но разного состава, конъюгированные с модельными белком, достоверно не отличались. Также установлено, что размер частиц влияет на иммуногенность связанного с ними белка. Аналогичная картина относительного содержания антител в сыворотках крови мышей сохранялась на всех этапах иммунизации.

Ключевые слова: иммунизация, иммунный ответ, белковый антиген, полимерные микро- и наночастицы, комплексные антигены

DOI: 10.31857/S0869813923030093, **EDN:** FSXLJI

В настоящее время микро- и наночастицы (МЧ и НЧ) на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров представляют значительный интерес в качестве систем адресной доставки лекарств [1, 2], создания ловушек для снижения вирусной нагрузки [3], а также создания вакцин нового поколения [4]. Во всех перечисленных случаях МЧ и НЧ являются носителями, на поверхности которых иммобилизуется соответствующий белок, играющий роль векторного лиганда, рецептора или антигена в зависимости от поставленной задачи. В всех случаях реализуется принцип молекулярного распознавания, основанный на взаимодействии белка, иммобилизованного на поверхности МЧ или НЧ, со специфической биологической мишенью *in vivo*.

В идеальном случае используемые полимерные частицы-носители должны быть нетоксичными, биоразлагаемыми, биосовместимыми и физико-химически стабильными *in vitro* и *in vivo* [5]. Ожидаемо, что физико-химические свойства полимерных частиц, такие как размер (гидродинамический диаметр, D_H), поверхностный заряд (ζ -потенциал) и химическая природа НЧ может оказывать влияние на ее поведение *in vivo*, и, прежде всего, на взаимодействие с белками плазмы крови и различными клетками организма.

Несмотря на то, что полимерные частицы представляют собой широко используемые платформы для доставки различных малых молекул и биологических субстанций и могут быть нацелены на клетки или органы с помощью функционализации поверхности частиц, вариации их размера, поверхностного заряда или природы полимера, до сих пор остается неясным, как полимерные частицы влияют на иммунный ответ. Например, имеются противоречивые сообщения о влиянии размера частиц на их адьювантность [6, 7]. Систематические и контролируемые исследования помогут выяснить роль различных свойств частиц с целью их последующей настройки для достижения желаемого терапевтического иммунного ответа.

В рамках данной работы изучено влияние физико-химических характеристик полимерных частиц на иммуногенность белка, иммобилизованного на их поверхности. С этой целью использовали НЧ на основе сополимера L-глутаминовой кислоты и L-фенилаланина (П(Глу-со-Фен)) и блок-сополимера поли(этиленгликоля) с поли(молочной кислотой) (ПЭГ-*b*-ПМК), а также МЧ на основе поли(молочной кислоты) (ПМК). ПМК и ПЭГ-*b*-ПМК являются хорошо известными и одобренными для медицинского использования полимерами [8, 9]. Ранее нами показано, что НЧ на основе сополимера поли(глутаминовой кислоты) с фенилаланином также являются биосовместимыми, нетоксичными и демонстрируют низкую скорость захвата макрофагами *in vitro* [10]. Данные частицы формируются благодаря самоорганизации П(Глу-со-Фен) в водной среде, вследствие чего остатки фенилаланина оказываются спрятанными внутри НЧ, тогда как на ее поверхности располагаются остатки глутаминовой кислоты. Известно, что поли(глутаминовая кислота) является биосовместимой и нетоксичной, в настоящее время применяется в косметологии и активно изучается для применения в составе лекарств [11–13]. В частности, на сегодняшний день данный полимер используется в качестве полимерного носителя в лекарственной форме Poliglumex[®], представляющей собой конъюгат поли(глутаминовой кислоты) с паклитакселом (Cell Therapeutics, Южная Корея) [14].

Все использованные в работе полимерные частицы имели отрицательный заряд поверхности. Из литературных данных известно, что в отличие от быстро опсонизирующихся катионных частиц, анионные и нейтральные системы демонстрируют сниженное внутриклеточное проникновение и захват макрофагами [15, 16]. Для изучения влияния природы и размера частицы на иммуногенные свойства белка, связанного с полимерным носителем, использовали модельный рекомбинантный фибриллогенный белок $\beta 2M$ -sfGFP.

Целью работы являлось изучение влияния размера и состава полимерных микро- и наночастиц на иммуногенность модельного белка. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: получение в очищенном виде рекомбинантного модельного белка β 2M-sfGFP; осуществление конъюгации выбранного модельного белка с разными типами полимерных частиц; осуществление иммунизаций мышей полученными модифицированными наночастицами и контрольным свободным белком, получение сыворотки крови иммунизированных мышей; изучение гуморального иммунного ответа у мышей на иммобилизованный белок при внутрибрюшинном введении препаратов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантного модельного белка слияния β 2-микροглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком

Белок β 2M-sfGFP получали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой, содержащей ген слитого белка β 2-микροглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком. Подробная методика синтеза, выделения и очистки опубликована ранее в работе [17]. Для определения концентрации белка в растворе использовали спектрофотометр Thermo Scientific NanoDrop 2000. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм. Молекулярная масса белка составляла 40 кДа.

Получение наночастиц на основе П(Глу-со-Фен)

Сополимер глутаминовой кислоты и фенилаланина синтезировали методом полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиянгидридов α -L-аминокислот в точности как описано ранее [18]. Структуру сополимера, состав и среднечисловую молекулярную массу (M_n) определяли методом ^1H ЯМР-спектроскопии [18] с использованием ядерного магнитного резонанса спектрометра Bruker Avance III 500 MHz (Германия).

НЧ на основе сополимера α -L-аминокислот формировали методом градиентной инверсии фаз (диализ) с органической фазы (диметилформамид) на воду, с последующим лиофильным высушиванием и редиспергированием заданной навески НЧ в воде или 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7.4) при кратковременном (30 с) воздействии ультразвука [18].

Получение наночастиц на основе ПЭГ-б-ПМК

Сополимер ПЭГ-б-ПМК получали методом полимеризации с раскрытием цикла D,L-лактода с использованием монометилового эфира ПЭГ-5000 в качестве инициатора. Структуру сополимера определяли методом ^1H ЯМР-спектроскопии [19]. Молекулярно-массовые характеристики сополимера изучали методом эксклюзионной жидкостной хроматографии в тетрагидрофуране с использованием стандартов полистирола. Анализ проводили с использованием хроматографической системы Shimadzu LC-20 Prominence (Япония), оснащенной рефрактометрическим детектором RID 10-A и колонкой Agilent PLgel MIXED-D (5 мкм, 7.5 мм \times 300 мм).

Формирование полимерных частиц на основе ПЭГ-б-ПМК осуществляли методом наноосаждения сополимера из раствора в ацетонитриле в воду при интенсивном перемешивании, как описано нами ранее [19]. Концентрация сополимера в органической фазе составляла 5 мг/мл. Соотношение органической фазы к водной составляло 1/5, скорость перемешивания 900 об./мин. Для удаления органического

растворителя систему оставляли открытой при перемешивании в течение 24 ч (25°C). Выход НЧ составил 93%.

Получение микрочастиц на основе ПМК

Получение МЧ осуществляли согласно ранее описанной методике [3, 20]. Кратко, для формирования полимерных МЧ на основе ПМК использовали метод двойной эмульсии. Органическая фаза представляла собой раствор ПМК в дихлорметане (50 мг/мл). Первая водная фаза представляла собой смешанный раствор 1% натрий лаурилсульфата и 5% Lutrol F68 в воде. Для получения эмульсии типа использовали ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS HD 2070, снабженный микрозондом MS 73 диаметром 3 мм (Bandelin, Германия). Органическую фазу добавляли в первую водную фазу с применением одноканального шприцевого насоса BYZ-810D (Byond, Китай); скорость введения 2 мл/мин. Соотношение объемов органическая фаза/водная фаза составляло 1/10. После завершения смешения фаз полученную эмульсию подвергали воздействию ультразвука в течение 30 с и перемешиванию со скоростью 800 об./мин.

Для компактизации капель эмульсии полученную первичную эмульсию в течение 10–15 с вносили в предварительно охлажденную до 4°C вторую водную фазу, представляющую собой 1%-ный раствор поли(винилового спирта) в воде. Соотношение объемов водная фаза 1/водная фаза 2 составляло 1/3. Удаление дихлорметана осуществляли с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Германия). После формирования суспензии частицы осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10000 g, 4°C). Далее частицы редицергировали под действием ультразвука в течение 5 с в дистиллированной воде и снова осаждали. Процедуру промывания частиц водой повторяли трижды с целью удаления поверхностно-активных веществ.

Изучение характеристик полученных полимерных частиц

Средний гидродинамический диаметр (D_H) МЧ и НЧ, а также электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) их поверхности определяли методом динамического и электрофоретического рассеяния света с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Ковалентная модификация поверхности частиц белком β 2M-sfGFP

НЧ на основе П(Глу-*co*-Фен) содержат в составе сополимера γ -карбоксильные группы глутаминовой кислоты, пригодные для активации и последующего ковалентного связывания белка.

Для активации частиц на основе ПМК и ПЭГ-*b*-ПМК на их поверхности предварительно генерировали карбоксильные группы путем частичного гидролиза сложноэфирных связей ПМК на поверхности частиц 0.1 М раствором NaOH, согласно ранее опубликованному протоколу [21]. После гидролиза частицы отделяли и промывали дистиллированной водой с использованием центрифугирования (14000 g, 10 мин).

В основе иммобилизации белка на поверхности частиц всех типов лежала реакция между аминокруппами белка и активированными сложноэфирными группами полимера. Карбоксильные группы всех типов полимеров активировали смесью N-гидроксисукцинимидом и (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида. Реакцию проводили в 0.05 М буферном растворе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, pH 5.6. После активации избытки реагентов и побочные продукты удаляли центрифугированием или ультрафильтрацией суспензии полимерных МЧ и НЧ соответ-

ственно. К активированным частицам добавляли раствор белка в 0.1 М боратном буферном растворе, pH 8.4 и инкубировали в течение 2 ч в условиях постоянного перемешивания при комнатной температуре (25°C). После окончания реакции иммобилизации МЧ промывали 5 раз водой с центрифугированием и удалением надосадочной жидкости, или использовали метод ультрафильтрации [18].

Количественный анализ белка

Количество иммобилизованного β 2M-sfGFP определяли по разнице количества белка в растворе до и после проведения реакции. Определение концентрации белка в растворе проводили спектрофотометрически при длине волны 490 нм, используя спектрофотометр для измерения оптической плотности в капле Thermo Scientific NanoDrop 2000 (США). Расчет проводили с использованием калибровочной зависимости, предварительно построенной по растворам β 2M-sfGFP с известной концентрацией.

Иммунизация и получение сыворотки крови мышей

В работе были использованы самки-гибриды F1 (СВА x C57BL) массой в среднем 20–25 г (возраст 4–6 мес.). Мышей содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 ч, с предоставлением корма и воды *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ препараты мышам вводили внутрибрюшинно. Количество НЧ для одной иммунизации во всех опытах составляло 0.1 мг на 1 мышь, количество β 2M-sfGFP – 1 мкг на 1 мышь. Препараты вводились в объеме 0.4 мл на животное.

Изучение сыворотки крови мышей и обработка данных

Анализ содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках крови иммунизированных мышей осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу иммуноферментного анализа (ИФА) [22]. Кратко, в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл 0.05%-ного раствора глутарового альдегида и инкубировали 1 ч при температуре 37°C. Удаляли из лунок глутаровый альдегид, и в лунки одной половины планшета вносили по 100 мкл раствора sfGFP в PBS с концентрацией 5 мкг/мл, а в лунки другой половины – PBS. Спустя 1 ч инкубирования планшетов в термостуруемом орбитальном шейкере вносили по 200 мкл 3%-ного раствора обезжиренного молока в PBS с добавлением 0.5% Tween 20. Спустя 1 ч инкубирования планшетов в термостуруемом орбитальном шейкере содержимое лунок заменяли на 100 мкл сыворотки крови мышей в 3%-ном растворе обезжиренного молока в PBST в разведениях 1 : 2000, 1 : 1000 и 1 : 500 и снова инкубировали в течение 1 ч. Затем лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST при помощи автоматического планшетного промывателя (Bio-Rad, США) и вносили специфические вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat anti Mouse-HRP, abcam, Великобритания), в разведении 1 : 50000 в 3%-ном растворе молока в PBST в количестве 100 мкл/лунка. Еще через 1 ч вносили по 100 мкл проявителя. Проявитель готовили следующим образом: 5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитриле, разбавляли 0.1 М цитрат-фосфатным буфером, pH 4.0, до 11 мл, после чего непосредственно перед внесением в планшет в полученный раствор добавляли 1 мкл 30%-ного H₂O₂. Спустя 10 мин инкубирования на орбитальном шейкере в темноте измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия).

Таблица 1. Характеристики полимеров и частиц на их основе до и после иммобилизации белка β 2M-sfGFP

Полимер	Тип частиц	M_n (D)	Характеристики исходных частиц			Характеристики модифицированных частиц	
			D_H (нм)	ИПД	ζ -потенциал (мВ)	D_H (нм)	ζ -потенциал (мВ)
П(Глу- <i>co</i> -Фен)*	НЧ	6800 (1.15)	120 \pm 3	0.19	-45 \pm 2	130 \pm 5	-44 \pm 2
ПЭГ- <i>b</i> -ПМК	НЧ	30 300 (1.20)	115 \pm 2	0.09	-33 \pm 5	128 \pm 5	-37 \pm 4
ПМК	МЧ	23 200 (1.13)	1400 \pm 10	0.22	-15 \pm 3	1427 \pm 12	-20 \pm 5

* Содержание мономерных звеньев в сополимере составляло: Глу/Фен = 4/1 (мол/мол).

Статистическая обработка данных

Для попарного сравнения групп использовали критерий Ньюмена–Кейлса. Проверку на нормальность осуществляли при помощи критерия Шапиро–Уилка. Все статистические расчеты и построение графиков были выполнены в программе Rstudio 1.1.453. Все графики “box plot” представлены в виде медиан с доверительными интервалами. Количество мышей в каждой группе было равным 40 особям. Иммуноферментный анализ делался в 3 повторностях для каждого образца. Стандартное отклонение для группы “контроль” составило 0.212, для группы “НЧ-ПАК” – 0.708, для “НЧ-ПМК” - 0.687, а для группы “МЧ-ПМК” – 0.102.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики полимеров, исходных частиц и частиц, модифицированных белком β 2M-sfGFP (комплексный антиген), представлены в табл. 1. Видно, что все использованные полимеры имели относительно невысокую M_n и узкую дисперсность (D). Полученные НЧ на основе П(Глу-*co*-Фен) и ПЭГ-*b*-ПМК имели близкий D_H около 120 нм и индексы полидисперсности (ИПД), не превышающие 0.2. Полученные полимерные НЧ имели значительный отрицательный заряд поверхности (дзета-потенциал ≤ -30 мВ), что в совокупности с небольшим размером ($D_H \leq 120$ нм) обеспечивало им высокую коллоидную стабильность. Несмотря на относительно невысокое абсолютное значение дзета-потенциала МЧ (15 мВ), данные полимерные частицы также характеризовались высокой коллоидной стабильностью. В этом случае коллоидная стабильность обеспечивалась совокупностью отрицательного заряда поверхности и наличием стабилизирующих ПАВ на поверхности МЧ.

Выбранный метод иммобилизации β 2M-sfGFP обеспечивал формирование гидролитически устойчивой амидной связи между белком и поверхностью полимерной частицы. Условия иммобилизации были оптимизированы так, чтобы получить иммобилизационную емкость, равную 10 мкг/мг частиц. Характеристики комплексов антигенов также представлены в табл. 1.

Иммобилизация белка на поверхности НЧ приводит к небольшому увеличению их D_H . Последнее может быть связано как с образованием дополнительных свободных карбоксильных групп ПМК при частичном гидролизе полимера на поверхности частиц во время модификации, так и со вкладом иммобилизованных молекул белка. В случае частиц на основе П(Глу-*co*-Фен) подобного эффекта не наблюдалось, что обусловлено наличием собственного избыточного содержания свободных карбоксильных групп в полимере.

Для изучения влияния частиц различного типа на иммуногенность модельного белка β 2M-sfGFP проводили иммунизацию 4 групп мышей, равных по численности. В качестве системы детектирования иммунного ответа использовали sfGFP и антитела к нему. Дизайн эксперимента и экспериментальные группы отражены в табл. 2.

Таблица 2. Состав антигенов и экспериментальные группы для иммунизации

Группа	Тип частиц	Модификация	Свободный белок
Контроль	ПЭГ- <i>б</i> -ПМК	Нет	β 2M-sfGFP
НЧ-ПАК	П(Глу- <i>co</i> -Фен)	Ковалентная иммобилизация β 2M-sfGFP	Нет
НЧ-ПМК	ПЭГ- <i>б</i> -ПМК	Ковалентная иммобилизация β 2M-sfGFP	Нет
МЧ-ПМК	ПМК	Ковалентная иммобилизация β 2M-sfGFP	Нет

В 3 экспериментальных группах проводили иммунизацию мышей с использованием НЧ на основе полиаминокислот (НЧ-ПАК) и ПЭГ-*б*-ПМК (НЧ-ПМК), также МЧ ПМК, содержащих на поверхности иммобилизованный β 2M-sfGFP. Иммунизацию контрольной группы проводили с использованием физической смеси НЧ ПЭГ-*б*-ПМК и свободного β 2M-sfGFP. Для оценки динамики образования антител проводили 4 иммунизации с интервалами по 2 недели. Забор крови мышей осуществляли из щечной вены через 13 дней после каждой иммунизации.

На основании результатов проведенного эксперимента установлено, что данные, характеризующие количество антител, не обладают нормальным распределением в каждой из четырех групп при каждой иммунизации (критерий Шапиро–Уилка). Также данные характеризовались неомогенностью дисперсий (критерий Бартлетта). Для попарного сравнения четырех групп внутри каждой иммунизации использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Сравнение уровня специфических антител в различных группах показало, что наибольший уровень антител к sfGFP в сыворотке крови содержался в случае иммунизации мышей смесью белка и НЧ (группа “контроль”). При иммунизации мышей НЧ, модифицированными β 2M-sfGFP (группы “НЧ-ПАК” и “НЧ-ПМК”), количество антител к sfGFP было значимо ниже ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. Однако между собой группы “НЧ-ПАК” и “НЧ-ПМК” достоверно не отличались ($p = 0.71$). Также было установлено, что размер частиц влияет на иммуногенность связанного с ними белка. Количество антител к sfGFP было значимо ниже в группе “МЧ-ПМК” по сравнению с другими группами (рис. 1).

На рис. 2 представлены суммарные результаты относительного содержания специфических антител к модельному белку во всех четырех иммунизациях в различных группах экспериментальных животных.

Как видно из представленных данных, в контрольной группе наблюдается более высокое содержание специфических антител к модельному белку. В то же время во всех группах, в которых иммунизация проводилась частицами с иммобилизованным на поверхности белком, содержание специфических антител к модельному белку было значительно ниже. Однако сравнение 3 опытных групп позволяет заключить, что комплексные антигены на основе НЧ, модифицированных β 2M-sfGFP, характеризовались большей иммуногенностью, чем комплексный антиген на основе МЧ. При этом природа НЧ (полиаминокислота или поли(молочная кислота)) не оказывала влияния на иммуногенность белка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что мономер белка β 2M-sfGFP в свободном от частиц состоянии вызывает сильно выраженный гуморальный иммунный ответ. Растворимый антиген с током лимфы эффективнее проникает в регионарные лимфоузлы, в которых вследствие процесса рециркуляции лимфоцитов растворимый антиген могут распознать своими иммуноглобулиновыми рецепторами В-лимфоциты, осуществить процессинг антигена и презент-

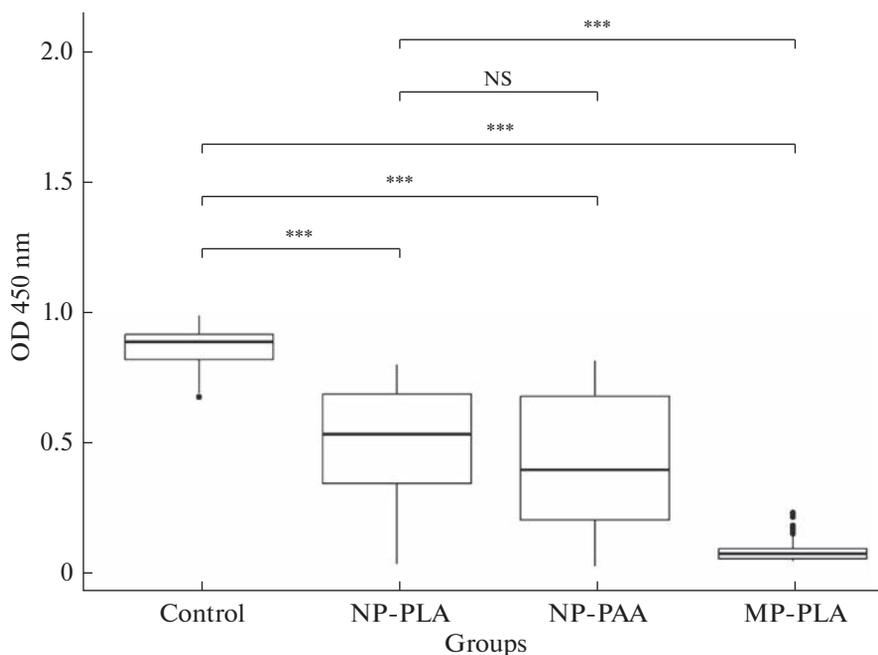


Рис. 1. Оценка относительного содержания специфических антител против модельного белка в сыворотках крови мышей, иммунизированных антигенами различного состава (3-я иммунизация). *** – $p < 0.001$.

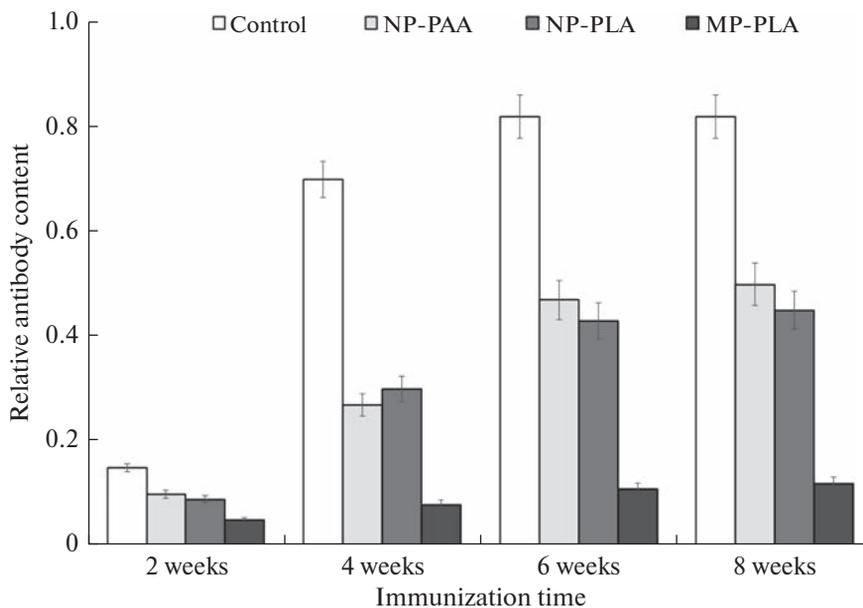


Рис. 2. Оценка относительного содержания специфических антител после введения контрольного и комплексных антигенов в четырех иммунизациях. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами. Обозначения: ■ – контроль; ● – НЧ-ПАК; + – НЧ-ПМК; ▲ – МЧ-ПМК.

тировать его Т-лимфоцитам-хелперам, распознающим своими Т-клеточными рецепторами этот же антиген. По этому же механизму образуются специфические антитела в случае иммунизации мышей конъюгатами белка с НЧ разных составов, однако количество таких антител было значимо ниже ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. В случае иммунизации мышей конъюгатом МЧ с модельным белком требуется дополнительный этап деградации макрофагами или дендритными клетками, который способствует активации клеточного иммунного ответа. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что наиболее сильный гуморальный иммунный ответ будет образовываться на мономер белка $\beta 2$ -микроглобулин человека, а крупные фибриллярные структуры белка $\beta 2$ -микроглобулина человека способны поглощаться клетками иммунной системы человека.

Выявленное в данной работе влияние размера полимерных частиц, содержащих на поверхности конъюгированный белок, согласуется с опубликованными ранее данными для частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК), несущих совместно инкапсулированный овальбумин и олигонуклеотид [23]. В частности, авторами было показано, что использование в качестве носителей НЧ диаметром 300 нм приводило к большему антигенспецифическому иммунному ответу у мышей по сравнению с частицами той же природы, но размером 1, 7 и 17 мкм. В указанной работе авторы отмечают, что чем меньше частицы ПМГК, используемые для доставки антигена, тем сильнее антигенспецифический Т-клеточный ответ. Схожая тенденция для овальбумина, конъюгированного на поверхности полистирольных частиц диаметром от 40 нм до 2 мкм, была показана в работе [24]. В данном случае, наибольший уровень антител детектировался для комплексного антигена на основе НЧ диаметром 40 нм, а наименьший на основе МЧ диаметром 2 мкм. Таким образом, независимо от природы полимера, влияние размера полимерной частицы имеет схожую тенденцию на иммуногенность комплексного антигена. В нашем случае схожий результат для НЧ на основе полиаминокислоты и поли(молочной кислоты) подтверждает данный вывод. В отличие от частиц на основе поли(молочной кислоты) и ее сополимеров, а также полистирольных частиц и липосом, в литературе практически отсутствуют данные о влиянии частиц на основе полиаминокислот на иммуногенность связанных с ними белков [7].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета Института экспериментальной медицины.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20104).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.С.П., В.А.К.-В., Е.Г.К.-В., М.М.Ш.), экспериментальная работа (Р.Г.С., Д.С.П., Е.С.С. и В.А.К.-В.), сбор данных (Р.Г.С., Д.С.П., В.А.К.-В.), обработка данных (Р.Г.С., Д.С.П., Е.Г.К.-В.), написание и редактирование манускрипта (Р.Г.С., Е.Г.К.-В. и М.М.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rawal S, Patel MM* (2019) Threatening cancer with nanoparticle aided combination oncotherapy. *J Control Release* 301: 76–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.015>
2. *Kumar B, Jalodia K, Kumar P, Gautam HK* (2017) Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* 41: 260–268.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.019>
3. *Polyakov D, Sinititsyna E, Grudinina N, Antipchik M, Sakhabeev R, Korzhikov-Vlakh V, Shavlovsky M, Korzhikova-Vlakh E, Tennikova T* (2021) Polymer Particles Bearing Recombinant LEL CD81 as Trapping Systems for Hepatitis C Virus. *Pharmaceutics* 13: 672.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050672>
4. *Pati R, Shevtsov M, Sonawane A* (2018) Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol* 9: 02224.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02224>
5. *Tewabe A, Abate A, Tamrie M, Seyfu A, Abdela Siraj E* (2021) Targeted Drug Delivery — From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. *J Multidiscip Health* 14: 1711–1724.
<https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968>
6. *Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z* (2010) Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines* 9: 1095–1107.
<https://doi.org/10.1586/erv.10.89>
7. *Ben-Akiva E, Est Witte S, Meyer RA, Rhodes KR, Green JJ* (2019) Polymeric micro- and nanoparticles for immune modulation. *Biomater Sci* 7: 14–30.
<https://doi.org/10.1039/C8BM01285G>
8. *Marin E, Briceno ML, Caballero-George C* (2013) Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *Int J Nanomedicine* 8: 3071–3091.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S47186>
9. *Elmowafy EM, Tiboni M, Soliman ME* (2019) Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *J Pharm Invest* 494 (49): 347–380.
<https://doi.org/10.1007/S40005-019-00439-X>
10. *Iudin D, Zashikhina N, Demyanova E, Korzhikov-Vlakh V, Shcherbakova E, Boroznjak R, Tarasenko I, Zakharova N, Lavrentieva A, Skorik Y, Korzhikova-Vlakh E* (2020) Polypeptide self-assembled nanoparticles as delivery systems for polymyxins B and E. *Pharmaceutics* 12: 868.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090868>
11. *Boddu SHS, Bhagav P, Karla PK, Jacob S, Adatiya MD, Dhameliya TM, Ranch KM, Tiwari AK* (2021) Polyamide/Poly(Amino Acid) Polymers for Drug Delivery. *J Funct Biomater* 12: 58.
<https://doi.org/10.3390/jfb12040058>
12. *Richard A, Margaritis A* (2001) Poly(Glutamic Acid) for Biomedical Applications. *Crit Rev Biotechnol* 21: 219–232.
<https://doi.org/10.1080/07388550108984171>
13. *Zhang Y, Song W, Lu Y, Xu Y, Wang C, Yu DG, Kim I* (2022) Recent Advances in Poly(α -L-glutamic acid)-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Biomolecules* 12: 636.
<https://doi.org/10.3390/biom12050636>
14. *Singer JW* (2005) Paclitaxel poliglumex (XYOTAXTM, CT-2103): A macromolecular taxane. *J Control Release* 109: 120–126.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.033>
15. *Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP* (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27: 4356–4373.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>
16. *He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C* (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31: 3657–3666.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>
17. *Solovov K V, Polyakov DS, Grudinina NA, Egorov VV, Morozova IV, Aleynikova TD, Shavlovsky MM* (2011) Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins ttr-sfgfp and β 2M-sfGFP. *Prep Biochem Biotechnol* 41: 337–349.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2010.548433>
18. *Zashikhina N, Sharoyko V, Antipchik M, Tarasenko I, Anufrikov Y, Lavrentieva A, Tennikova T, Korzhikova-Vlakh E* (2019) Novel Formulations of C-Peptide with Long-Acting Therapeutic Potential for Treatment of Diabetic Complications. *Pharmaceutics* 11: 27.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010027>
19. *Sinititsyna E, Bagaeva I, Gandalipov E, Fedotova E, Korzhikov-Vlakh V, Tennikova T, Korzhikova-Vlakh E* (2022) Nanomedicines Bearing an Alkylating Cytostatic Drug from the Group of 1,3,5-Triazine Derivatives: Development and Characterization. *Pharmaceutics* 14: 2506.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112506>

20. Korzhikov V, Averianov I, Litvinchuk E, Tennikova TB (2016) Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release. *J Microencapsul* 33: 199–208.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2016.1144818>
21. Korzhikov-Vlakh V, Averianov I, Sinitsyna E, Nashchekina Y, Polyakov D, Guryanov I, Lavrentieva A, Raddatz L, Korzhikova-Vlakh E, Scheper T, Tennikova T (2018) Novel Pathway for Efficient Covalent Modification of Polyester Materials of Different Design to Prepare Biomimetic Surfaces. *Polymers* 10: 1299.
<https://doi.org/10.3390/polym10121299>
22. Polyakov DS, Antimonova OI, Sakhabeev RG, Grudinina NA, Khodova AE, Sinitsyna ES, Korzhikov-Vlakh VA, Tennikova TB, Shavlovsky M (2017) Poly(lactic acid) nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Russ J Infect Immun* 7: 123–129.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-123-129>
23. Joshi VB, Geary SM, Salem AK (2013) Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J* 15: 85–94.
<https://doi.org/10.1208/s12248-012-9418-6>
24. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IFC, Plebanski M (2004) Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J Immunol* 173: 3148–3154.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3148>

Immune Response to the Introduction of Fibrillogenic β 2-Microglobulin Protein Conjugated with Different Types of Polymer Particles

R. G. Sakhabeev^{a, b, *}, D. S. Polyakov^b, E. S. Sinitsyna^c, E. G. Korzhikova-Vlakh^c,
V. A. Korzhikov-Vlakh^{c, d}, and M. M. Shavlovsky^b

^a*St. Petersburg Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia*

^b*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

^c*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^d*Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: helm505@mail.ru

The effect of the composition and size of polymeric particles on the immunogenicity of the fibrillogenic β 2-microglobulin protein immobilized on their surface was studied. For this purpose, nanoparticles (NP) based on a copolymer of L-glutamic acid and L-phenylalanine (P(Glu-co-Phe)) and a block copolymer of poly(ethylene glycol) with poly(lactic acid) (PEG-*b*-PLA) as well as microparticles (MP) based on poly(lactic acid) (PLA) were selected. α -L-amino acid copolymer-based nanoparticles were prepared by gradient phase inversion, and PEG-*b*-PLA-based nanoparticles by nanoprecipitation. Double emulsion method was used to form polymeric microparticles based on PLA. Recombinant chimeric model protein beta-2-microglobulin-green fluorescent protein (β 2M-sfGFP) was used to covalently modify all types of polymeric particles followed by immunization of four groups of laboratory animals equal in number. An enzyme immunoassay method was used to evaluate the humoral immune response. In three experimental groups, mice were immunized using poly(amino acid)-based nanoparticles (NP-PAA) and PEG-*b*-PMC (NP-PLA) as well as PLA microparticles containing immobilized β 2M-sfGFP on the surface. The control group was immunized using a physical mixture of PEG-*b*-PLA nanoparticles and free β 2M-sfGFP. The highest level of antibodies to sfGFP in blood serum was found when mice were immunized with a mixture of protein and nanoparticles. When mice were immunized with β 2M-sfGFP-modified nanoparticles, the amount of antibodies to sfGFP was statistically significantly lower ($p < 0.001$) compared to the control group. However, the groups immunized with nanoparticles of similar size but different composition conjugated to the model proteins did not differ significantly among themselves. It was also found that the size of the particles affects the immunogenicity of the associated protein. A similar pattern of relative antibody content in the sera of mice was maintained at all steps of immunization.

Keywords: immunization, immune response, protein antigen, polymeric micro- and nanoparticles, complex antigens

АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ГОНАД, ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛИЧИНОК МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* В ПЕРИОД НЕРЕСТА

© 2023 г. Л. Л. Капанова¹, *, В. И. Рябушко¹, С. В. Капанов¹

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

*E-mail: lar_sa1980@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2022 г.

После доработки 25.01.2023 г.

Принята к публикации 09.02.2023 г.

В настоящей работе исследован элементный состав гонад, яйцеклеток, сперматозоидов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis* в период нереста, когда концентрации биологически активных и минеральных веществ максимальны. Сравнительный анализ концентраций показал, что элементы по-разному вовлечены в гаметогенез мидии. Отмечены значимые различия в содержании Li, B, Mg, Si, P, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Mo, Pd, Sn, I, Ba, Ce в гонадах самцов и самок до и после нереста, в половых продуктах и личинках мидии. Вероятно, некоторые из перечисленных элементов не только пассивно накапливаются в организме моллюсков, но и являются эссенциальными, будучи непосредственно вовлечены в процесс размножения. Больше всего значимых различий в элементном составе обнаружено между яйцеклетками и личинками, а также между гонадами самцов до нереста и сперматозоидами. Во время нереста гонады мидий преимущественно накапливают р- и d-элементы, видимо, из-за способности ионов таких элементов к комплексообразованию и, следовательно, включения в структуру ферментов. Содержание B, Mg, Si, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Sr, Ba в гонадах самцов и самок, половых продуктах и личинках на порядок или несколько порядков выше, чем других элементов. Содержание Ca, Fe, Sr, Sn, I в личинках мидий достоверно выше, чем в гонадах и половых продуктах. Sn – технологический гидрополлютант, поэтому личинки могут служить биоиндикатором загрязнения водной среды этим элементом. Полученные данные представляют практический интерес для совершенствования биотехники воспроизводства морских гидробионтов и получения функциональных продуктов на их основе, что важно для оптимизации менеджмента аквакультуры и для решения проблем, связанных со здоровьем человека.

Ключевые слова: мидия *Mytilus galloprovincialis*, гонады, сперматозоиды, яйцеклетки, личинки, элементы, Черное море

DOI: 10.31857/S086981392303010X, **EDN:** FSZGDZ

В Черном море *M. galloprovincialis* широко культивируется и является одним из доминирующих видов моллюсков. Мидии – фильтраторы, поэтому обладают высокой способностью поглощать элементы из воды [1, 2] и подвергаются воздействию металлов, потребляемых с пищей [3, 4].

Роль элементов обычно выясняют двумя способами: применяя синтетические рационы, составленные из хорошо очищенных компонентов и не содержащие изучаемого элемента, или изучая болезни животных, обусловленные недостатком данного элемента [5]. Предложенные способы трудоемки и не применимы в есте-

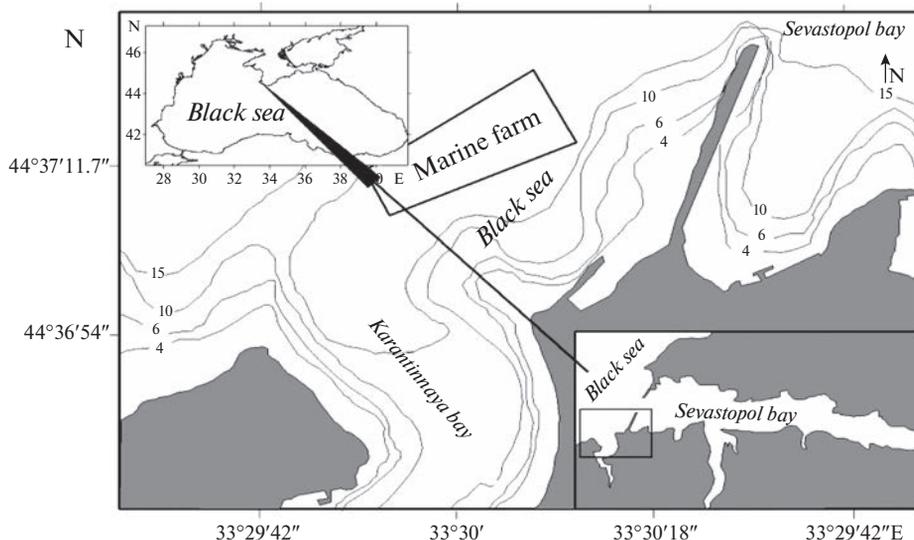


Рис. 1. Карта-схема места отбора проб в Чёрном море.

ственных условиях обитания. Новизна настоящего исследования заключается в изучении элементов, участвующих в размножении мидий, путем сравнения их концентраций, приведенных к единице сухой массы, в биологической системе: “гонады самцов и самок (до и после нереста) → половые продукты → личинки” в период нереста, когда концентрации биологически активных и минеральных веществ максимальны. Оценку элементного состава гонад до и после нереста, половых продуктов и личинок моллюсков еще не проводили, хотя элементный состав тканей и створок мидий хорошо изучен [6], а также описан элементный состав гонад мидий в зависимости от пола и стадии репродуктивного цикла [7]. Известно, что наиболее важным фактором снижения концентрации элементов в тканях является перераспределение элементов по всему организму в процессе интенсивного роста гонад и выведение с половыми продуктами [7]. Кроме того, состояние мидийных популяций в естественной среде обитания напрямую зависит от развития моллюсков на всех стадиях, в т. ч. на начальных стадиях личиночных форм *M. galloprovincialis* широко используется в качестве тест-объекта при биотестировании [8]. Воздействие металлов отражается в первую очередь на потомстве. Изучая элементный состав трохофор мидий, можно оценить состояние всей популяции на исследуемом участке морской акватории.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследований – мидия *Mytilus galloprovincialis* с длиной раковины 7–10 см, а также ее половые продукты и личинки, полученные в лабораторных условиях. Моллюсков отбирали водолазным способом с коллекторов мидийно-устричной фермы в Карантинной бухте г. Севастополя (44°61'83.46" N, 33°50'33.80" E) весной 2019 г. (рис. 1). Глубина отбора проб – 2–3 м, температуре воды – 8°C.

Раковины очищали от обрастаний и биоотложений и промывали чистой фильтрованной морской водой [7]. Выстилающие обе створки гонады отделяли от раковин с помощью пластмассового скальпеля и промокали фильтровальной бумагой.

Половую принадлежность и стадии репродуктивного цикла мидий определяли на свежих мазках гонад с помощью микроскопа [9].

Параметры морской воды, в которой проходил нерест и выращивание личинок: температура – $20 \pm 2^\circ\text{C}$; pH – 7.8–8.3; $[\text{Ca}^{2+}]$ – 210–290 мг/л; $[\text{Mg}^{2+}]$ – 460–640 мг/л; соленость – 18‰; насыщенность воды растворенным кислородом – 100–110%. Помещение, где проходил нерест, не содержало токсичных паров и газов, температура окружающего воздуха – $20 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенность (естественное и искусственное освещение) не превышала 750 лк.

Каждого моллюска помещали макушкой вниз в стаканы объемом 0.5 л и заливали профильтрованной через мембранный фильтр (3–5 мкм) морскую воду, нагретую до 26°C , стимулируя тем самым нерест. Через 1–3 ч после стимуляции яйцеклетки осаждались на дно в виде оранжевого осадка, сперма образовывала в воде белое облако. После выделения половых продуктов моллюсков удаляли из стаканов. Воду над осадком яйцеклеток сливали, остаток центрифугировали 5 мин при 1500 об./мин, а взвесь сперматозоидов центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин. В результате получали чистый однородный осадок яйцеклеток и сперматозоидов. Гонады и половые продукты от каждой особи высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C .

Оставшиеся растворы с яйцеклетками отфильтровывали от биоотложений, объединяли и переносили в трехлитровую емкость. В отдельную емкость собирали отфильтрованные от биоотложений растворы со спермой. Чтобы исключить полиспермию, к раствору с яйцеклетками добавляли 10 мл раствора со спермой. Личинок мидии выращивали трое суток, пока они находились на эндогенном питании. Биомассу личинок, полученную на третьи сутки эксперимента, отделяли от воды с помощью фильтра с размером пор 84 мкм, промывали деионизированной водой и высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 105°C . Высушенные образцы гонад, половых продуктов и личинок просеивали с помощью нейлонового волокнистого сита, отделяя фракцию с размером частиц менее 70 мкм.

Навески высушенных гонад, половых продуктов и личинок массой 100 мкг переносили во фторопластовые пробирки для мокрого сжигания. Добавляли 4 мл химически чистой азотной кислоты (63–65%), дополнительно очищенной в системе очистки кислот DST-1000 (США). Пробирки закрывали фторопластовыми крышками и два часа выдерживали в автоклаве при 120°C . После сжигания растворенные образцы разбавляли деионизированной водой с удельным сопротивлением 18.2 МОм см, полученной в деионизаторе Д-301 (Россия), чтобы разбавление было в пределах 1000–2000 мл г^{-1} (в пересчете на сухую массу).

Для приготовления стандартных растворов применяли многоэлементный стандарт IV-ICPMS-71A-C (Inorganic Ventures, США, 10 мг л^{-1}). Точность анализа ИСП-МС верифицирована измерениями концентраций элементов в стандартном образце тканей мидии *Mytilus edulis* ERM®-CE278k, Бельгия.

Количественный микроэлементный анализ проводили в ЦКП “Спектрометрия и хроматография” Института биологии южных морей РАН с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) Plasma Quant MS Elite, номер в ГРСИ РФ: 63680-16, по методике, предложенной ранее [7]. Градуировочные кривые строили по стандартным растворам, полученным путем разбавления деионизированной водой многоэлементного стандарта IV-ICPMS-71A-C (Inorganic Ventures, США, 10 мг л^{-1}). Коэффициенты детерминации R^2 для всех градуировочных графиков составляли не менее 0.998.

Статистические сравнения для каждого элемента осуществляли в среде Матлаб версии 8.2.0. Значимость различий оценивали при $p < 0.05$.

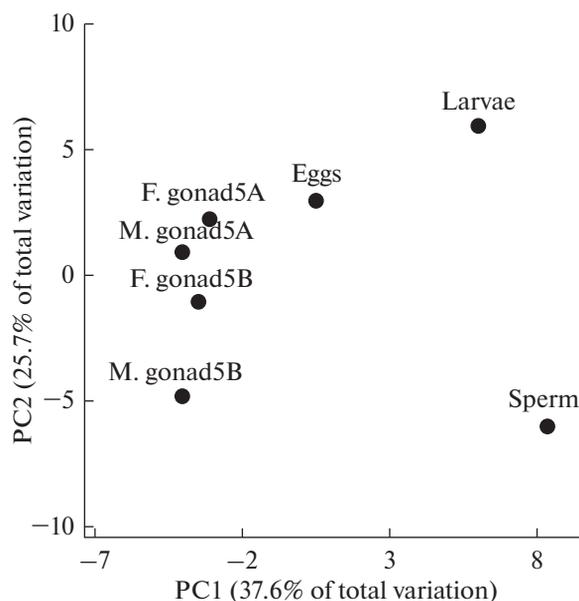


Рис. 2. Расположение полученных данных в проекции на плоскости первых двух главных компонент (метод главных компонент, Principal Component Analysis, PCA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Статистически различающиеся концентрации элементов в гонадах, половых продуктах и личинках мидии обобщены в табл. 1 и на рис. 2. Элементы, между содержанием которых в гонадах, половых продуктах и личинках не было обнаружено статистически значимых различий, не рассматривали. Не принимали во внимание элементы с большим разбросом полученных значений концентраций в выборке или с очень низким значением концентраций, что могло привести к неточным результатам исследований. Данные в таблицах приведены к единице сухой массы. Согласно применяемым средствам химического анализа, содержание Na в данной работе не определяли, так как морская вода, в которой выращивали личинок, является матрицей для этого элемента.

Самый удобный способ изобразить распределение элементов в гонадах, половых продуктах и личинках при помощи многомерного анализа. Анализ главных компонент, один из вариантов многомерных методов анализа, проводился с помощью программы PRIMER 6. На рис. 2 показана проекция счетов главных компонент данных по элементному составу для каждой ткани на координатную плоскость первых двух главных компонент. Первая главная компонента (PC1) показывает различия между элементным составом гонад самцов и самок до нереста и после нереста с половыми продуктами и личинками – 37,6% общей вариации, а вторая главная компонента (PC2), объясняющая 25,7% общей вариации, – между гонадами самцов и самок до и после нереста, а также между яйцеклетками и личинками со сперматозоидами. В работе Richir и Gobert [10] наблюдались различия между участками мягких тканей мидий до и после нереста.

Элементы во время нереста распределены в гонадах, половых продуктах и личинках неравномерно (табл. 1 и рис. 2). Статистически значимые различия элементного состава гонад самцов и самок до и после нереста, половых продуктов и

Таблица 1. Элементный состав (в мг кг⁻¹ сух. массы) гонад до и после нереста, половых продуктов и личинок мидии *Mytilus galloprovincialis*

Элемент	Г ♀♀ 5А		Яйцеклетки		Г ♀♀ 5Б		Личинки		Сперматозоиды		Г ♂♂ 5А		Г ♂♂ 5Б		
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	
Li	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e, j}	0.2 ± 0.1 ^{a, c, e, f, j}	0.1 ± 0.02 ^{b, d, e}	0.2 ± 0.01 ^{a, c, e, f, j}	0.2 ± 0.02 ^{a, c, d, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.2 ± 0.02 ^{a, c, d, f, j}	0.2 ± 0.02 ^{a, c, d, f, j}	0.2 ± 0.02 ^{a, c, d, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}	0.1 ± 0.01 ^{b, d, e}			
B	24 ± 8 ^{b, d, e}	75 ± 24 ^{a, c, f, j}	33 ± 14 ^{b, d, e}	67 ± 21 ^{a, c, f, j}	67 ± 21 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	96 ± 16 ^{a, c, f, j}	96 ± 16 ^{a, c, f, j}	96 ± 16 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	27 ± 9 ^{a, c, f, j}	30 ± 9 ^{b, d, e}	30 ± 9 ^{b, d, e}
Mg	4518 ± 2432 ^{b, d, e}	18675 ± 7451 ^{a, c, e, f}	5438 ± 3217 ^{b, d, e}	14200 ± 3443 ^{a, c, e, f, j}	14200 ± 3443 ^{a, c, e, f, j}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	22209 ± 3875 ^{a, c, d, f, j}	22209 ± 3875 ^{a, c, d, f, j}	22209 ± 3875 ^{a, c, d, f, j}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4426 ± 1338 ^{b, d, e}	4029 ± 598 ^{b, d, e}	4029 ± 598 ^{b, d, e}
Si	1238 ± 115 ^{3c}	129 ± 36 ^{c, e, f}	741 ± 298 ^{b, d, e}	215 ± 103 ^c	215 ± 103 ^c	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}	496 ± 384 ^{a, b, c, f, j}	496 ± 384 ^{a, b, c, f, j}	496 ± 384 ^{a, b, c, f, j}	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}	650 ± 103 ^{b, e}	888 ± 592 ^{d, e}	888 ± 592 ^{d, e}
P	6298 ± 1743 ^{d, e, j}	5340 ± 1577 ^{d, e, f, j}	7201 ± 1130 ^{d, e, j}	2294 ± 643 ^{a, b, c, e, f, j}	2294 ± 643 ^{a, b, c, e, f, j}	10182 ± 3559 ^{b, d}	10182 ± 3559 ^{b, d}	11802 ± 3274 ^{a, b, c, d, j}	11802 ± 3274 ^{a, b, c, d, j}	11802 ± 3274 ^{a, b, c, d, j}	10182 ± 3559 ^{b, d}	10182 ± 3559 ^{b, d}	10182 ± 3559 ^{b, d}	16775 ± 2750 ^{a, b, c, d, e}	16775 ± 2750 ^{a, b, c, d, e}
K	10764 ± 3363 ^j	13554 ± 3293	13925 ± 1522 ^j	6922 ± 1472 ^j	6922 ± 1472 ^j	14816 ± 2304	14816 ± 2304	15182 ± 2523	15182 ± 2523	15182 ± 2523	14816 ± 2304	14816 ± 2304	14816 ± 2304	17539 ± 2033 ^{a, c, d}	17539 ± 2033 ^{a, c, d}
Ca	13365 ± 7916 ^{d, e}	8145 ± 5172 ^{c, d, e, j}	1919 ± 1106 ^{b, d, e}	16880 ± 11244 ^{a, b, c, e, f, j}	16880 ± 11244 ^{a, b, c, e, f, j}	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d	15105 ± 2512 ^{a, b, c, d, j}	15105 ± 2512 ^{a, b, c, d, j}	15105 ± 2512 ^{a, b, c, d, j}	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d	16712 ± 11101 ^d	1533 ± 447 ^{b, d, e}	1533 ± 447 ^{b, d, e}
V	0.3 ± 0.2 ^e	0.7 ± 0.5 ^e	0.4 ± 0.2 ^e	1 ± 0.1 ^e	1 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	1 ± 0.9 ^{a, b, c, d, f}	1 ± 0.9 ^{a, b, c, d, f}	1 ± 0.9 ^{a, b, c, d, f}	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	0.3 ± 0.1 ^e	0.9 ± 0.6	0.9 ± 0.6
Cr	3 ± 2 ^e	2 ± 0.6 ^e	3 ± 1 ^e	2.3 ± 0.3 ^e	2.3 ± 0.3 ^e	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e	15 ± 9 ^{a, b, c, d, f}	15 ± 9 ^{a, b, c, d, f}	15 ± 9 ^{a, b, c, d, f}	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e	3 ± 1 ^e	8 ± 8	8 ± 8
Mn	11 ± 5 ^{d, f}	11 ± 3 ^{d, f, j}	12 ± 4 ^{f, j}	3 ± 0.3 ^{a, b, c}	3 ± 0.3 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	10 ± 7	10 ± 7	10 ± 7	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	3 ± 1 ^{a, b, c}	5 ± 5 ^{b, c}	5 ± 5 ^{b, c}
Fe	70 ± 45 ^{d, e}	81 ± 37 ^d	104 ± 63 ^d	432 ± 237 ^{a, b, c, f, j}	432 ± 237 ^{a, b, c, f, j}	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d	298 ± 247	298 ± 247	298 ± 247	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d	95 ± 81 ^d	139 ± 93 ^d	139 ± 93 ^d
Co	0.04 ± 0.01 ^{c, d}	0.04 ± 0.01 ^{c, d}	0.1 ± 0.02 ^{a, b, d}	0.1 ± 0.02 ^{a, b, c, j}	0.1 ± 0.02 ^{a, b, c, j}	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.05	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.04 ± 0.02 ^d	0.04 ± 0.02 ^d
Ni	1 ± 0.3 ^{d, e}	0.4 ± 0.2 ^{d, e}	0.4 ± 0.3 ^{d, e}	2 ± 1 ^{a, b, c, f, j}	2 ± 1 ^{a, b, c, f, j}	0.5 ± 0.3 ^{d, e}	0.5 ± 0.3 ^{d, e}	3 ± 2 ^{a, b, c, f, j}	3 ± 2 ^{a, b, c, f, j}	3 ± 2 ^{a, b, c, f, j}	0.5 ± 0.3 ^{d, e}	0.5 ± 0.3 ^{d, e}			
Cu	3 ± 2	4 ± 1 ^{f, j}	4 ± 1 ^{f, j}	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1 ^{b, c, e, j}	3 ± 1 ^{b, c, e, j}	4 ± 2 ^f	4 ± 2 ^f	4 ± 2 ^f	3 ± 1 ^{b, c, e, j}	3 ± 1 ^{b, c, e, j}			
Zn	56 ± 26 ^{d, e, f, j}	49 ± 12 ^{d, e, f, j}	54 ± 16 ^{d, e, f, j}	25 ± 4 ^{a, b, c}	25 ± 4 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}	19 ± 10 ^{a, b, c}	19 ± 10 ^{a, b, c}	19 ± 10 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}	28 ± 6 ^{a, b, c}
Ge	0.1 ± 0.0 ^e	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.0 ^e	0.1 ± 0.02 ^{f, j}	0.1 ± 0.02 ^{f, j}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{a, c, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{a, c, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{a, c, f, j}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}	0.1 ± 0.01 ^{d, e}			
As	40 ± 34 ^j	33 ± 7 ^{c, j}	23 ± 2 ^{b, j}	25 ± 9 ^j	25 ± 9 ^j	18 ± 9	18 ± 9	28 ± 5 ^j	28 ± 5 ^j	28 ± 5 ^j	18 ± 9	18 ± 9	18 ± 9	13 ± 5 ^{a, b, c, d, e}	13 ± 5 ^{a, b, c, d, e}
Se	10 ± 5	15 ± 4	14 ± 3 ^j	9 ± 4	9 ± 4	11 ± 3	11 ± 3	14 ± 3 ^j	14 ± 3 ^j	14 ± 3 ^j	11 ± 3	11 ± 3	11 ± 3	9 ± 2 ^{c, e}	9 ± 2 ^{c, e}
Br	257 ± 90	158 ± 54 ^{c, f, j}	65 ± 27 ^{b, d, e, j}	165 ± 74 ^{c, f, j}	165 ± 74 ^{c, f, j}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}	202 ± 40 ^{c, f, j}	202 ± 40 ^{c, f, j}	202 ± 40 ^{c, f, j}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}	60 ± 17 ^{b, d, e}	37 ± 12 ^{b, c, d, e}	37 ± 12 ^{b, c, d, e}
Rb	3 ± 1 ^j	3 ± 0.8 ^j	4 ± 1 ^{d, e}	2 ± 0.5 ^{c, f, j}	2 ± 0.5 ^{c, f, j}	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d	3 ± 1 ^{c, j}	3 ± 1 ^{c, j}	3 ± 1 ^{c, j}	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d	4 ± 1 ^d	5 ± 1 ^{a, b, d, e}	5 ± 1 ^{a, b, d, e}
Sr	92 ± 69 ^{b, d, e}	179 ± 107 ^{a, c, d, f, j}	44 ± 30 ^{c, d, e}	1615 ± 1037 ^{a, b, c, e, f, j}	1615 ± 1037 ^{a, b, c, e, f, j}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}	211 ± 52 ^{a, c, d, f, j}	211 ± 52 ^{a, c, d, f, j}	211 ± 52 ^{a, c, d, f, j}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}	54 ± 43 ^{b, d, e}	29 ± 8 ^{b, d, e}	29 ± 8 ^{b, d, e}
Mo	0.04 ± 0.02 ^d	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0 ^{a, f}	0.1 ± 0.0 ^{a, f}	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d	1 ± 0.5	1 ± 0.5	1 ± 0.5	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d	0.1 ± 0.01 ^d	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5
Pd	0.7 ± 0.1 ^j	0.7 ± 0.2	1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.08	0.1 ± 0.08	0.1 ± 0.08	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Sn	0.8 ± 0.4 ^d	1 ± 0.7 ^{d, f}	0.5 ± 0.2 ^{d, f}	8 ± 5 ^{a, b, c, e, f, j}	8 ± 5 ^{a, b, c, e, f, j}	0.7 ± 0.6 ^d	0.7 ± 0.6 ^d	1 ± 1 ^{d, f}	1 ± 1 ^{d, f}	1 ± 1 ^{d, f}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.1 ± 0.1 ^{b, c, d, e}	0.7 ± 0.6 ^d	0.7 ± 0.6 ^d
I	0.05 ± 0.05	17 ± 3 ^f	0.02 ± 0.01 ^f	19 ± 5 ^f	19 ± 5 ^f	0.02 ± 0.01 ^f	0.02 ± 0.01 ^f	27 ± 8 ^{b, c, d, j}	27 ± 8 ^{b, c, d, j}	27 ± 8 ^{b, c, d, j}	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01 ^f	0.02 ± 0.01 ^f
Ba	6 ± 3	3 ± 3	2 ± 1.5 ^d	3 ± 1.5 ^{c, e, f}	3 ± 1.5 ^{c, e, f}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}	3 ± 1 ^{d, f}	3 ± 1 ^{d, f}	3 ± 1 ^{d, f}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}	1 ± 0.3 ^{d, e}	2 ± 1 ^d	2 ± 1 ^d
Ce	0.2 ± 0.1 ^e	0.2 ± 0.1 ^e	0.2 ± 0.2 ^e	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	1 ± 1 ^{a, b, c}	1 ± 1 ^{a, b, c}	1 ± 1 ^{a, b, c}	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($p < 0.05$, $n = 15$, где n — количество измерений), разные буквы показывают статистические различия результатов; Г ♀♀ 5А и Г ♂♂ 5А — тонады самок и самцов до нереста на пятой стадии репродуктивного цикла; Г ♀♀ 5Б и Г ♂♂ 5Б — тонады самок и самцов после нереста на пятой стадии репродуктивного цикла.

личинок указывают на непосредственное участие элементов в процессе размножения или в процессах, сопутствующих ему.

Микроэлементы, имеющие низкие атомные номера (от 24 до 33) участвуют в функционировании клеток морских организмов в качестве минорных компонентов белков, углеводов, липидов. В частности, ионы каталитических элементов Cu, Zn, Co и Ni известны как активаторы ферментов – кофакторы [11]. Cu является кофактором многих ферментов, например, супероксиддисмутазы и цитохром *c*-оксидазы [12]. Установлено участие Cu в регуляции активности металлоэнзимов, способствующих ассимиляции Ca и P, что говорит о влиянии Cu на обмен макроэлементов как в гонадах, так и в половых продуктах [13–16]. Воздействие ионов Cu или Zn на сперматозоиды *Mytilus edulis* вызывает снижение их подвижности [17]. Известно, что ионы Cu в большей степени способны подавлять гаметогенез у мидий, чем ионы Zn [18, 19]. При исследовании влияния Cu на ранние стадии жизни мидии *Mytilus trossulus* чувствительность к Cu уменьшалась в ряду: эмбрионы > сперма > яйцеклетки. После воздействия 10 мкг л⁻¹ Cu наблюдали резкое увеличение аномального развития эмбрионов. Подвижность сперматозоидов значительно снижалась при воздействии 100 мкг л⁻¹ Cu из-за снижения митохондриальной активности сперматозоидов. Более низкие концентрации Cu не влияли на жизнедеятельность сперматозоидов. Воздействие Cu (при любой концентрации) не влияло также на жизнедеятельность яйцеклеток [20].

После 24-часового воздействия концентраций Cd (от 0.001 до 1 мг л⁻¹) и Cu (от 0.01 до 10 мг л⁻¹) на яйцеклетки мидии *Perna viridis* процент неоплодотворенных яйцеклеток возрастал по мере увеличения концентраций воздействия: от 5% до 25% – для Cd и от 2.5% до 25% – для Cu. Результаты экспериментов показали, что относительно невысокие концентрации Cu (менее 0.01 мг л⁻¹) и Cd (менее 0.001 мг л⁻¹) не влияли на процесс оплодотворения *Perna viridis* [21].

Биологическая роль Zn связана с функцией ферментов. Цинк является кофактором большой группы ферментов, катализирующих гидролиз пептидов, белков и сложных эфиров, полимеризацию ДНК и РНК в составе ДНК- и РНК-полимераз. Известна специфическая функция цинка в репродуктивной системе амфибий [22].

Меньше всего статистически значимых различий в элементном составе обнаружено между гонадами самок и самцов до нереста, гонадами самок до и после нереста и гонадами самцов до и после нереста. Так, в гонадах самок до нереста концентрации Mn и Zn (11 ± 5 и 56 ± 26 мг кг⁻¹) статистически выше, чем в гонадах самцов до нереста (3 ± 1 и 23 ± 7 мг кг⁻¹). По-видимому, в гонадах самок ферментативные процессы, включающие Mn, происходят интенсивнее. Mn широко распространен во всех растениях, поэтому наиболее вероятен путь поступления Mn в организм мидий вместе с микроводорослями. Zn играет существенную функциональную роль в гаметогенезе у самок моллюсков [1, 10]. Видимо, мидии поглощают микроэлементы, в том числе Zn, из окружающей среды с пищей или из загрязненной промышленными отходами воды, где они, подобно стероидным гормонам, депонируются в мягких тканях, а затем экскретируются вместе с половыми продуктами [23–25]. Концентрация Zn в сперматозоидах составляет 19 ± 10 мкг кг⁻¹, а в гонадах самцов до нереста – 23 ± 7 мкг кг⁻¹.

Статистически значимые различия в содержании Cu отмечены между гонадами самцов до и после нереста: 2 ± 0.2 и 3 ± 1 мг кг⁻¹ соответственно. Более высокая концентрация Cu в гонадах самцов после нереста объясняется уменьшением массы гонад за счет экскреции сперматозоидов. Cu или ее соединения, вероятно, участвуют в регуляции активности сперматозоидов. Известно, что ионы Cu, как и Zn, действуют как кофакторы некоторых ферментов у моллюсков [26].

Гонады самок мидии до и после нереста статистически различаются по содержанию Co: 0.04 ± 0.01 и 0.1 ± 0.02 мг кг^{-1} соответственно. Ионы биогенного d-элемента Co входят в структуру активных центров ферментов, по-видимому, участвующих в процессе посленерестовой перестройки гонад.

Концентрация Li, B, Mg, K, V, Fe, Cu, Sr, Sn, Se, Mo, I в яйцеклетках статистически выше, чем в гонадах самок до нереста (табл. 1). Мо является частью молибденового кофактора молибдопротеина, который входит в состав окислительно-восстановительных ферментов, а также является регулятором активности стероидных рецепторов [16].

Содержание Ca, Fe, Sr, Sn, I в личинках мидий достоверно выше, чем в гонадах и половых продуктах (табл. 1). Са необходим для формирования оболочек личинок. Концентрация Са в сперматозоидах мидий выше, чем в яйцеклетках: 15105 ± 2512 и 8145 ± 5172 мг кг^{-1} соответственно, т. к. яйцеклетки состоят преимущественно из липидов, а не белков [27]. Са модулирует движение жгутиков сперматозоидов [28].

Недавние исследования группы ученых из Института биологии южных морей показали, что содержание Cd, Cu, As, Hg, Pb, Zn в мягких тканях культивируемых мидий не превышало допустимых уровней [29]. В то же время Sn – технологический гидрополлютант, поэтому личинки могут служить индикатором загрязнения водной среды. Источником Sn в акватории Севастополя могут быть судоремонтные заводы, применяющие паяльные конструкции.

Следует отметить, что у моллюсков существует особый механизм связывания ионов тяжелых металлов, обеспечивающий им выживание в условиях, как природных геохимических аномалий, так и сильного антропогенного загрязнения вод этими токсикантами. Такой механизм обусловлен тем, что в цитоплазме клеток возрастает количество водорастворимых низкомолекулярных белков-металлоионофилов, обладающих высоким сродством к ионам металлов. Металлоионофины синтезируются в организме мидий в ответ на поступление ионов Cd, Zn, Cu и Hg [26].

В сперматозоидах мидий также отмечено повышенное содержание Sr, Mg, Cr, I. При этом Sr – аналог Са. Во время нереста в гонадах, где происходит интенсивный обмен веществ, ионы магния находятся в комплексе с АТФ [7]. Mg необходим для формирования половых продуктов и может служить источником энергии для обеспечения подвижности сперматозоидов [30].

Причины появления Cr в окружающей среде могут быть как антропогенными, так и естественными. Природный Cr встречается в основном в трехвалентном состоянии. В шестивалентном состоянии Cr является очень токсичным микроэлементом, мутагеном и представляет угрозу прибрежным экосистемам. Cr(VI) в 30 раз токсичнее Cr(III) [31].

Концентрация Ni в сперматозоидах и личинках мидий (3 ± 2 и 2 ± 1 мг кг^{-1} соответственно) статистически выше, чем в гонадах самок до нереста и яйцеклетках (1 ± 0.3 и 0.4 ± 0.2 мг кг^{-1} соответственно). Некоторые беспозвоночные продуцируют ферменты, содержащие Ni в активных центрах. Однако в высоких концентрациях Ni токсичен [32]. Известно, что Ni, наряду с Cd и As ингибирует механизмы репарации ДНК [6].

Роль V в моллюсках еще не известна, и гонады мидий, скорее всего, накапливают этот элемент в качестве фактора роста. Так, V способен ускорять рост крыс, содержащихся на высокоочищенном аминокислотном рационе [33].

Следует отметить, что период нереста или сильное загрязнение среды обитания могут вызывать изменения массы тела мидий и, следовательно, изменение концентрации микроэлементов металлов в гонадах, половых продуктах и личинках [34], но в биологической системе “гонады → половые продукты → личинки” будет от-

четливо проследиваться изменение соотношения эссенциальных элементов и гидрополлютантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценивая работу в целом, можно выделить теоретическую и практическую значимость выполненных исследований. Полученные данные демонстрируют, что в период нереста в биологической системе “гонады → половые продукты → личинки” происходит интенсивное перераспределение как биогенных элементов, так и гидрополлютантов. Элементный состав яйцеклеток и личинок мидий отражает состояние всей популяции. Личинки мидий накапливают Ca, Fe, Sr, Sn, I в количествах, превышающих содержание этих элементов в яйцеклетках и сперматозоидах. При этом очевидна эссенциальная роль Ca, Sr или Fe. Sn в Черном море является техногенным гидрополлютантом. Степень загрязнения популяции моллюсков следует оценивать не только мониторингом элементного состава моллюсков во время нереста (два раза в год), а также водной среды, в которой происходит нерест.

Практическая значимость полученных результатов заключается в применении мидий, собранных в период нереста, с целью получения биологически активных веществ, обогащенных макро- и микроэлементами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по темам: “Фундаментальные исследования популяционной биологии морских животных, их морфологического и генетического разнообразия” № 121040500247-0 и “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” № 121030300149-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят сотрудника Отдела аквакультуры и морской фармакологии Института биологии южных морей к. г. н., с. н. с. М.А. Попова за предоставленный рисунок карты района исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kapranova LL, Ryabushko VI, Kapranov SV, Lishaev VN, Nekhoroshev MV* (2021) Elemental composition of gonads, gametes and larvae in black and brown morphs of the Bivalve Mollusk

- Mytilus galloprovincialis* LAM. J Evol Biochem Physiol 57(6): 1290–1299.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021060090>
2. Wang W-X (2002) Interactions of trace metals and different marine food chains. Marine Ecol Progr Series 243: 295–309.
<https://doi.org/10.3354/meps243295>
 3. Ezgeta-Balic D, Najdek M, Peharda M, Blazina M (2012) Seasonal fatty acid profile analysis to trace origin of food sources of four commercially important bivalves. Aquaculture 334–337: 89–100.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.041>
 4. Ndiaye B, Ndiaye M, Cid B, Diop A, Diagne I, Cisse D, Dione C, Hanne M (2020) Trace metals in Mussels *Mytilus galloprovincialis* from Dakar Coast (Senegal). Am J Analyt Chem 11(3): 137–145.
<https://doi.org/10.4236/ajac.2020.113011>
 5. Крѣнс ЕМ (ред) (1982) Физиология животных. Приспособление и среда. М. Мир [Kreps EM (red) (1982) Animal physiology. Adaptation and environment. M. Mir. (In Russ)].
 6. Newton TJ (1995) A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. Ecotoxicology 4(6): 341–362.
<https://doi.org/10.1007/BF00118870>
 7. Kapranov SV, Karavantseva NV, Bobko NI, Ryabushko VI, Kapranova LL (2021) Sex- and sexual maturation-related aspects of the element accumulation in soft tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. collected off coasts of Sevastopol (southwestern Crimea, Black Sea). Environment Sci Pollut Res 28(17): 21553–21576.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-12024-z>
 8. Gupta SK, Singh J (2011) Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. ИОАБ J 2(1): 49–57.
 9. Nikonova LL, Nekhoroshev MV, Ryabushko VI (2017) Total testosterone and estradiol in the gonads and gametes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. J Evol Biochem Physiol 53(6): 519–522.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017060114>
 10. Richir J, Gobert S (2014) The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. Ecol Indic 36: 33–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.06.021>
 11. Horne BA (1969) Marine Chemistry: The structure of water and the chemistry of the hydrosphere. Wiley. New York.
<https://doi.org/10.1007/s10311-011-0343-1>
 12. Castruita M, Casero D, Karpowicz SJ, Kropat J, Vieler A, Hsieh SI, Yan W, Cokus S, Loo JA, Benning C, Pellegrini M, Merchant SS (2011) Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. Plant Cell 23: 1273–1292.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.084400>
 13. Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarubia L (2006) The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. Plant J 45: 225–236.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2005.02601.X>
 14. Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, CoHu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. New Phytologist 182: 799–816.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x>
 15. Page MD, Kropat J, Hamel PP, Merchant S (2009) Two Chlamydomonas CTR Copper Transporters with a Novel Cys-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation. Plant Cell 21: 928–943.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.064907>
 16. Wang D, Simons SS Jr (2005) Corepressor binding to progesterone and glucocorticoid receptors involves the activation function-1 domain and is inhibited by molybdate. Mol Endocrinol 19(6): 1483–1500.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0012>
 17. Earnshaw MJ, Wilson S, Akberali HB, Marriott KRM (1986) The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) – III. The effect of applied copper and zinc on sperm motility in relation to ultrastructural damage and intracellular metal localization. Marine Environment Res 20(4): 261–278.
[https://doi.org/10.1016/0141-1136\(86\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(86)90052-8)
 18. Akberali HB, Earnshaw MJ, Marriott KRM (1984) The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) – I. Copper-induced uncoupling of respiration in the un-

- fertilized egg. *Compar Biochem Physiol* 77C(2): 289–294.
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(84\)90015-x](https://doi.org/10.1016/0742-8413(84)90015-x)
19. Akberali HB, Earnshaw MJ, Marriott KRM (1985) The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.) – II. Uptake of copper and zinc and their effect on respiration in the sperm and unfertilized egg. *Marine Environment Res* 16(1): 37–59.
[https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90019-4)
 20. Fitzpatrick JL, Nadella S, Bucking C, Balshine S, Wood CM (2008) The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Compar Biochem Physiol* 147(4): 441–449.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.012>
 21. Chan GSL, Tan LYY (2013) Development of a toxicity bioassay using fertilisation in the green mussel, *Perna viridis*, from exposure to copper and cadmium. *Asian Youth J Biol* 1: 1–12.
 22. Seeler JF, Ajay S, Zaluzec NJ, Bleher R, Lai B, Schultz EG, Hoffman BM, LaBonne C, Woodruff TK, O'Halloran TV (2021) Metal ion fluxes controlling amphibian fertilization. *Nature Chem* 13: 683–691.
<https://doi.org/10.1038/s41557-021-00705-2>
 23. Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z (2014) Role of selenium in male reproduction – a review. *Animal Reprod Sci* 146(1–2): 55–62.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>
 24. Bezuidenhout J, Dames N, Botha A, Frontasyeva MV, Goryainova ZI, Pavlov D (2015) Trace elements in mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* from the South African West coast. *Ecol Chem Engineer Soc* 22(4): 489–498.
<https://doi.org/10.1515/eces-2015-0028>
 25. Liu F, Wang W-X (2015) Linking trace element variations with macronutrients and major cations in marine mussels *Mytilus edulis* and *Perna viridis*. *Environment Toxicol Chem* 34(9): 2041–2050.
<https://doi.org/10.1002/etc.3027>
 26. Христофорова НК (ред) (1994) Тяжелые металлы в промысловых и культивируемых моллюсках залива Петра Великого. Владивосток. Дальнаука. [Khrystoforova NK (red) (1994) heavy metals in commercial and cultivated mollusks in the Peter the Great Bay. Vladivostok. Dal-nauka. (In Russ)].
 27. Kapranova LL, Nekhoroshev MV, Malakhova LV, Ryabushko VI, Kapranov SV, Kuznetsova TV (2019) Fatty acid composition of gonads and gametes in the Black Sea Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lam. at different stages of sexual maturation. *J Evol Biochem Physiol* 55(6): 448–455.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060024>
 28. Ho HC, Suarez SS (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68: 1590–1596.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011320>
 29. Chelyadina NS, Kapranov SV, Popov MA, Smirnova LL, Bobko NI (2022) Trace elements in the detoxifying and accumulating body parts of *Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819 (Crimea, Black Sea): human health risks and effect of the sampling site location. *Environment Sci Pollut Res* 29(40): 61352–61369.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20186-1>
 30. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld CY (1980) Sperm motility. *Fertility and Sterility* 34(3): 197–215.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)44949-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)44949-6)
 31. Guillermo SN, Ammassari LL, Néstor G, Basso NG, Ronco AE (2006) Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *PubMed* 72(3): 61–67.
<https://doi.org/10.3354/dao072261>
 32. Chalkiadakis O, Paraskevopoulou V, Roussos I, Dassenakis M, Simantiris LN (2013) Comparative study of the accumulation of Ni in different tissues of mussels and soft clams. *E3S Web Conf* 1: 11003.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/20130111003>
 33. Shwarz K, Milne DB (1971) Growth effects of vanadium in the rat. *Science* 174: 426–428.
 34. Kumar V, Sinha AK, Rodrigues PP, Mubiana VK, Blust R, De Boeck G (2015) Linking environmental heavy metal concentrations and salinity gradients with metal accumulation and their effects: a case study in 3 mussel species of Vitoria estuary and Espirito Santo bay, Southeast Brazil. *Sci Total Environment* 523: 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.139>

Analysis of the Elemental Composition of Gonads, Gametes and Larvae of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Spawning Period

L. L. Kapranova^{a, *}, V. I. Ryabushko^a, and S. V. Kapranov^a

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

**e-mail: lar_sa1980@mail.ru*

In this work, we studied the elemental composition of gonads, eggs, sperm and larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* during spawning, when the contents of biologically active compounds and minerals are maximal. A comparative analysis of the contents showed that the elements are involved in the mussel gametogenesis in different pathways. There were significant differences in the contents of Li, B, Mg, Si, P, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Mo, Pd, Sn, I, Ba and Ce in male and female gonads before and after spawning, gametes and larvae of mussels. It is likely that some of the listed elements are not only passively accumulated in the mollusk body, but are also essential, being directly involved in the reproduction process. Most of significant differences in the element contents were found between eggs and larvae and between male gonads before spawning and sperm. By spawning, mussel gonads accumulated mainly p- and d-elements, apparently due to the ability of their ions to form complexes and, consequently, to be included in the structure of enzymes. The contents of B, Mg, Si, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Sr and Ba in male and female gonads, gametes and larvae were an order or several orders of magnitude higher than those of other elements. The contents of Ca, Fe, Sr, Sn and I in mussel larvae were significantly higher than in gonads and gametes. Sn is a technological hydropollutant, and thus, larvae can serve as a bioindicator of the aquatic environment pollution with this element. The data obtained are of practical interest for improving the biotechnology of reproduction of marine hydrobionts and obtaining functional products based on them, which is important for the optimization of aquaculture management and for addressing human health-related issues.

Keywords: mussel *Mytilus galloprovincialis*, gonads, sperm, eggs, larvae, elements, Black Sea