

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 7

июль

2023



СО Д Е Р Ж А Н И Е

Обзорные и проблемные статьи

GCaMP — семейство однофлуорофорных генетически-кодируемых кальциевых индикаторов

А. И. Ерофеев, Е. К. Винокуров, О. Л. Власова, И. Б. Безпрозванный

819

Экспериментальные статьи

Дестабилизация генома клеток гиппокампа и костного мозга самцов мышей после действия иммобилизации и феромонального стрессора

В. Д. Щербинина, Б. В. Бакулевский, Т. С. Глинин, Е. В. Даев

844

Влияние гормональной стимуляции на хромосомный аппарат ооцитов травяной лягушки

И. О. Боголюбова, Д. С. Боголюбов

862

Вклад активности SERCA в изменение сократительных характеристик *m. soleus* крыс при функциональной разгрузке

К. А. Шарло, И. Д. Львова, С. А. Тыганов, К. А. Зарипова, С. П. Белова, Т. Л. Немировская

872

Нарушение регуляции ГАМК-ергической системы в нижних буграх четверохолмия крыс при развитии аудиогенной эпилепсии

С. Д. Николаева, А. П. Ивлев, А. А. Наумова, А. А. Куликов, М. В. Глазова, Е. В. Черниговская

890

Влияние метилобогащенной диеты матери на число дофаминовых нейронов в вентральной тегментальной области мозга у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij

Е. А. Федосова, Н. А. Логинова, К. Ю. Саркисова

902

Снижение мышечной массы при диет-индуцированном висцеральном ожирении у крыс-самцов линии Вистар: связь с гормонально-метаболическими показателями

Т. А. Митюкова, А. А. Басалай, Е. Н. Чудиловская, О. Е. Полулях, Я. В. Щербаков, Н. С. Костюченко

921

Реактивные изменения микроглиоцитов спинного мозга крысы при остром системном воспалении

Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский

933

Реакция ламинина мозгового вещества почки на продолжительную дегидратацию крыс

И. И. Хегай

946

ЭЭГ-анализ функционального состояния головного мозга у детей 5—7 лет

Ю. Н. Комкова, Г. А. Сугрובה, М. М. Безруких

954

Фибриновое покрытие способствует сохранению эндотелиального слоя в условиях пульсирующего потока

В. Г. Матвеева, Е. А. Великанова, Л. В. Антонова, Л. С. Барбараш

975

Клеточный состав эритроидных форм в крови и головной почке кефали-сингиля (*Chelon auratus* Risso, 1810) на протяжении годового цикла

А. А. Солдатов, В. Н. Рычкова, Т. А. Кухарева, А. Г. Рокотова

990

Поправка

Поправка

1002

C O N T E N T S

Reviews

GCaMP – a Family of Single-Fluorophore Genetically Encoded Calcium Indicators <i>A. I. Erofeev, E. K. Vinokurov, O. L. Vlasova, and I. B. Bezprozvanny</i>	819
---	-----

Experimental Articles

Genome Instability of Hippocampal and Bone Marrow Cells in Male Mice after the Action of Immobilization and Pheromonal Stressor <i>V. D. Shcherbinina, B. V. Bakulevskiy, T. S. Glinin, and E. V. Daev</i>	844
Influence of Hormonal Stimulation on the Oocyte Chromosome Apparatus of the Common Frog <i>I. O. Bogolyubova, and D. S. Bogolyubov</i>	862
Influence of the SERCA Activity on Rat's Soleus Contractile Properties during Functional Unloading <i>K. A. Sharlo, I. D. Lvova, S. A. Tyganov, K. A. Zaripova, S. P. Belova, and T. L. Nemirovskaya</i>	872
Dysregulation of GABAergic System in the Inferior Colliculi of Rats during the Development of Audiogenic Epilepsy <i>S. D. Nikolaeva, A. P. Ivlev, A. A. Naumova, A. A. Kulikov, M. V. Glazova, and E. V. Chernigovskaya</i>	890
The Effect of Maternal Methyl-Enriched Diet on the Number of Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area in Adult Offspring of WAG/Rij Rats <i>E. A. Fedosova, N. A. Loginova, and K. Yu. Sarkisova</i>	902
Decrease in Muscle Mass in Diet-Induced Visceral Obesity in Male Wistar Rats: Relationship with Hormonal and Metabolic Parameters <i>T. A. Mityukova, A. A. Basalai, K. N. Chudilovskaya, O. Y. Poluliakh, Ya. V. Shcherbakov, and M. S. Kastsyuchenko</i>	921
Reactive Changes of Rat Spinal Cord Microgliaocytes after Acute Systemic Inflammation <i>E. A. Kolos and D. E. Korzhhevskii</i>	933
Reaction of Kidney Medullary Laminin to Prolonged Dehydration of Rats <i>I. I. Khegay</i>	946
EEG Analysis of the Functional State of the Brain in 5- to 7-Year-Old Children <i>Yu. N. Komkova, G. A. Sugrobova, and M. M. Bezrukikh</i>	954
Fibrin Coating Contributes to the Retention of the Endothelial Layer in Pulsating Flow <i>V. G. Matveeva, E. A. Velikanova, L. V. Antonova, and L. S. Barbarash</i>	975
Cellular Composition of Erythroid Forms in the Blood and Head Kidney of the Golden Grey Mullet (<i>Chelon auratus</i> Risso, 1810) during the Annual Cycle <i>A. A. Soldatov, V. N. Rychkova, T. A. Kukhareva, and A. G. Rokotova</i>	990

Errata

Erratum	1002
---------	------

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

GCaMP – СЕМЕЙСТВО ОДНОФЛУОРОФОРНЫХ
ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ ИНДИКАТОРОВ

© 2023 г. А. И. Ерофеев^{1, *}, Е. К. Винокуров¹,
О. Л. Власова¹, И. Б. Безпрозванный^{1, 2}

¹Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Институт биомедицинских систем
и биотехнологий, Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр Техасского университета,
Даллас, Техас, США

*e-mail: alexandr.erofeev@gmail.com

Поступила в редакцию 04.05.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 17.06.2023 г.

Однофлуорофорные генетически кодируемые кальциевые индикаторы, такие как GCaMP, являются широко используемыми инструментами для изучения нейрональной активности. Их главным преимуществом является способность в режиме реального времени и с высокой чувствительностью реагировать на изменения концентрации ионов кальция в клетке. Это особенно важно для исследования нейрональных процессов и нейронных ансамблей, где кальциевые сигналы играют ключевую роль в передаче информации. Данный обзор рассматривает семейство кальциевых индикаторов GCaMP, описывает их разновидности, особенности и перспективы использования для визуализации нейронной активности. Особое внимание уделяется тенденции совершенствования GCaMP, в частности направленной на расширение их спектральных свойств и способности регистрировать высокочастотную спайковую активность.

Ключевые слова: кальциевые индикаторы, нейронная активность, динамика, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0869813923070038, **EDN:** ХНКЗНО

СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ

Апокальмодулин (apoCaM) — свободная от Ca^{2+} форма кальмодулина, которая может взаимодействовать с определенными белками в отсутствие кальция.

Биолюминесценция — это естественное явление, которое возникает в результате биохимической реакции, включающей окисление небольшой молекулы люциферина, внутри живых организмов.

ГекКИ (генетически-кодируемые кальциевые индикаторы) — тип биосенсоров, используемых для обнаружения и измерения концентрации ионов кальция в живых клетках.

Депляция — процесс уменьшения или истощения какого-либо вещества в клетке.

Кальциевый транзист — это изменение концентрации ионов кальция внутри клетки в ответ на определенный сигнал, например, сигнал от нейромедиатора или гормона.

Кальмодулин — это небольшой кальций-связывающий белок, который участвует во многих клеточных процессах, включая сокращение мышц, высвобождение нейротрансмиттеров и транскрипцию генов. Когда кальций связывается с кальмодулином, он претерпевает конформационные изменения, что позволяет ему взаимодействовать с различными целевыми белками, включая ферменты и ионные каналы.

Квантовый выход (Φ) — это показатель эффективности преобразования поглощенного света в флуоресценцию, представляет собой отношение числа испускаемых фотонов (флуоресцентный сигнал) к числу поглощенных фотонов (поглощенный свет). Квантовый выход измеряется в процентах или в долях единицы (от 0 до 1).

Константа диссоциации по кислотности (pK_a) — это значение pH, при котором половина молекул индикатора GCaMP находится в протонированной форме (несвязанной с кальцием) и половина в депротонированной форме (связанной с кальцием).

Коэффициент экстинкции (ϵ , молярный коэффициент экстинкции) — это мера, которая характеризует способность вещества поглощать свет определенной длины волны, определяется как отношение поглощенной интенсивности света к концентрации GCaMP в растворе. Коэффициент экстинкции позволяет оценить, насколько эффективно GCaMP поглощает свет определенной длины волны, что влияет на его способность обнаруживать изменения концентрации кальция в клетке. Коэффициент экстинкции измеряется в литрах, деленных на моль и на сантиметр ($\text{л моль}^{-1} \text{см}^{-1}$) или в молярных единицах экстинкции ($\text{M}^{-1} \text{см}^{-1}$).

Мотив — участок белка, который имеет определенную структуру и выполняет определенную функцию.

Нейриты (или аксоны) — это длинные, тонкие ветви нейрона, которые передают информацию в виде электрических импульсов от тела клетки (сомы) к другим нейронам, мышцам или железам.

Нейронный ансамбль — это группа нейронов, которые активируются синхронно и совместно участвуют в выполнении определенных функций и задач в мозге.

Нейропиль — это область нервной ткани, где нейроны устанавливают связи между собой и другими клетками.

Опсины — это белки, которые содержатся в глазах живых организмов и участвуют в процессе зрения. Они связываются с пигментами, такими как ретиналь, и образуют фотоприемники, которые способны реагировать на световые стимулы и транслировать их в нервные импульсы для дальнейшей обработки в головном мозге.

Оптическая электрофизиология (Оптофизиология) — это область научных исследований, которая объединяет методы оптики и электрофизиологии для изучения электрической активности клеток и тканей в организмах. Она использует оптические методы, такие как флуоресценция, для измерения электрических потенциалов и токов в нервной системе, мышечных тканях и других типах тканей, которые генерируют электрическую активность.

Пептид M13 — это последовательность из 13 аминокислот, которая обладает высоким сродством к кальмодулину и может специфически связываться с ним даже в присутствии других кальций-связывающих белков.

Пресинаптическая терминаль (бутон) — расширение конца нервного волокна, которое содержит мембранные белки (синаптические белки), необходимые для передачи нервного импульса на постсинаптический нейрон или эффекторную клетку.

Спайк — короткий электрический импульс, который генерируется нейроном и передается по аксону к другим нейронам или эффекторным клеткам, таким как мышцы или железы. Спайк часто используется для описания электрической активности нейронов на уровне целых нейронных сетей или организмов, в отличие от термина “потенциал действия”, который обычно используется для описания физиологических процессов, происходящих внутри нейрона.

Тропизм вируса — это способность вируса инфицировать определенные типы клеток или тканей в организме своего хозяина.

Тропонин-С — это белковый компонент тропонинового комплекса, состоящий из двух глобулярных доменов, каждый из которых связывает по два иона кальция, изменяя конформацию комплекса и вызывая сокращение мышечной клетки. Тропонин-С широко используется в диагностике острого коронарного синдрома и других сердечно-сосудистых заболеваний, так как его уровень в крови может указывать на повреждение миокарда.

ФБ — флуоресцентный белок.

Флуоресценция — это явление, при котором вещество поглощает свет определенной длины волны, а затем испускает свет большей длины волны, обычно с меньшей энергией.

Флуорофор — это молекула, которая поглощает свет определенной длины волны, а затем излучает свет большей длины волны. Флуорофоры могут быть естественного происхождения, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), обнаруженный в медузах, или синтетические, такие как флуоресцеин или родамин.

Цитоморбидность — нарушение функции клеток или их структуры, вызванное различными факторами, такими как инфекции, токсины, нарушения обмена веществ и другие.

Цитотоксичность — это способность вещества или микроорганизма повреждать или уничтожать клетки. Например, повышенный уровень кальция в нейроне может вызвать актива-

цию кальций-зависимых протеаз, таких как кальпаин и катепсин, которые могут разрушать клеточные белки, включая белки клеточного скелета.

Шипик (спайклет) — это маленький выступ на дендритах или соме нейрона, который может контактировать с окружающими клетками, в том числе и другими нейронами. Шипики обычно играют важную роль в формировании и поддержании синаптических контактов между нейронами.

Aequorin — это фотопротейн, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, кальций-чувствительный белок, который излучает синий свет, когда связывается с ионами кальция.

Arch (Archaeorhodopsin) — архродопсин, семейство ретиналь-содержащих фоторецепторов, обнаруженных у одноклеточных микроорганизмов *Halobacterium* и *Halorubrum*.

CaMKK (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase) — киназа кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы.

ChR2 (Channelrhodopsin-2) — каналородопсин-2, семейство ретиналь-содержащих фоторецепторов, обнаруженных у одноклеточных синих водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*.

ckkap (CaM-dependent kinase kinase peptide) — пептид CaM-зависимой киназы.

cpGFP (circularly permuted green fluorescent protein) — круговой пермутированный зеленый флуоресцентный белок. Вариант GFP, в котором аминокислотные последовательности были переставлены для создания круговой формы белка. Обладает более высокой интенсивностью флуоресценции и более коротким временем перехода между состояниями, что делает его более подходящим для регистрации быстрых процессов в клетках.

Cre-рекомбиназа — это фермент, который используется в генетической инженерии для управления экспрессией генов. Cre-рекомбиназа может распознавать специфические ДНК-последовательности, называемые “локусами”, и вызывать рекомбинацию между ними. Это позволяет исследователям удалять, вставлять или переставлять определенные гены в геноме организма.

EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) — улучшенный вариант GFP, который имеет более яркую и стабильную флуоресценцию. EGFP менее склонен к деградации, т.е. к потере флуоресценции с течением времени.

EGTA (Этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота) — органическое соединение, используемое в биохимии и молекулярной биологии в качестве хелатирующего агента. EGTA широко применяется для связывания и удаления дивалентных ионов металлов, особенно ионов кальция (Ca^{2+}), из растворов.

eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) — эндотелиальная синтаза оксида азота.

GFP — зеленый флуоресцентный белок, впервые обнаружен в медузе *Aequorea victoria* в 1962 г.

HR (Halorhodopsin) — галородопсин, семейство ретиналь-содержащих фоторецепторов, обнаруженных у одноклеточных микроорганизмов, известных как галобактерии.

mApple — один из видов мутантного зеленого флуоресцентного белка, имеющий красно-оранжевый цвет, более высокую стабильность и яркость, чем оригинальный GFP.

MOPS — это химическое соединение, используемое в биохимических и биологических исследованиях в качестве буфера. Он является слабой кислотой с pK_a около 7.2, что делает его эффективным для поддержания постоянного pH в диапазоне 6.5–7.9.

mRuby — один из видов мутантного зеленого флуоресцентного белка (GFP), имеющий красный цвет, более высокую стабильность и яркость, чем оригинальный GFP.

RFP (Red Fluorescent Protein) — это красный флуоресцентный белок, который используется в биологических исследованиях для маркировки клеток и белков.

SNR (Signal-to-Noise Ratio, соотношение сигнал–шум) — это показатель, характеризующий соотношение между уровнем сигнала и уровнем шума в измерении или эксперименте.

ВВЕДЕНИЕ

Визуализация кальция (Ca^{2+}), которая представляет собой оптическое измерение концентрации кальция с помощью специальных флуоресцентных индикаторов [1, 2], имеет долгую и богатую историю, восходящую к концу 1960-х — началу 1970-х годов. В то время исследователи впервые обнаружили, что изменения уровня внутриклеточного кальция связаны с активностью нейронов [3, 4], и начали использовать синтетические флуоресцентные кальций-чувствительные красители (например, Quin-2, Fura-2 или Fluo-3) в качестве индикаторов активности нейронов [5–7]. Хотя это была революционная технология, необходимость доставки этих молекул с помощью патч-пипетки или объемной внеклеточной загрузки в ли-

пофильных условиях ограничивала специфические для конкретного типа клеток условия доставки и визуализации [8]. В 1980-х и 1990-х годах достижения в области микроскопии и технологий визуализации, включая изобретение электронного микроскопа, развитие флуоресцентной микроскопии, изобретение усовершенствованных стереомикроскопов, развитие оптических и спектральных методов количественной визуализации, развитие методов маркировки флуоресцентных белков, позволили исследователям визуализировать изменения внутриклеточного уровня кальция в нейронах как *in vitro*, так и *in vivo* в режиме реального времени [9–11]. Впоследствии область визуализации кальция в нейробиологии продолжала развиваться и расширяться, что было обусловлено технологическим прогрессом и растущей потребностью в более сложных методах регистрации активности нейронов. Это привело к разработке новых кальциевых индикаторов, таких как генетически-кодировемые кальциевые индикаторы (ГеККИ), которые позволили регистрировать изменения уровня внутриклеточного кальция с высокой чувствительностью и специфичностью [12, 13]. Сегодня кальциевая визуализация широко используется в исследованиях для изучения синаптической передачи, регистрации активности нейронов и понимания влияния лекарств и заболеваний на мозг. Данный метод остается важнейшим инструментом для исследователей в этой области и продолжает играть важную роль в изучении нервной системы.

ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫЕ ИНДИКАТОРЫ КАЛЬЦИЯ

Ион кальция (Ca^{2+}) является распространенным вторичным посредником в клеточной передаче сигналов, с помощью которого регулируются многие биологические явления, в частности нейронная активность [3, 4, 14–16]. Уровень цитоплазматического кальция в состоянии покоя обычно составляет 50–100 нМ, однако активность нейронов стимулирует его приток [1, 13]. Во время распространения потенциала действия (ПД), потенциал-зависимые кальциевые каналы приводят к увеличению соматического кальция до ~ 1 мкМ [17, 18]. Поэтому ПД могут быть косвенно оценены путем измерения изменений внутриклеточного Ca^{2+} [1, 19–21]. Для получения более подробной информации о различных формах возбуждения Ca^{2+} , о том, как они различаются в разных типах нейронов, и о биохимических механизмах связывания Ca^{2+} с флуоресцентными изменениями читатели могут ознакомиться в обзорах [1, 13, 22].

Первые эксперименты по визуализации внутриклеточных изменений Ca^{2+} [23, 24] были проведены с использованием Ca^{2+} -чувствительного биолюминесцентного белка *aequorin* [25]. Эти эксперименты предшествовали появлению генетически-кодированных Ca^{2+} -индикаторов [26], так же, как открытие зеленого флуоресцентного белка (GFP) [25], создание различных вариантов GFP [27] и биохимическое изучение связывания Ca^{2+} путем слияния кальмодулина с его связывающим пептидом M13, полученным из киназы легкой цепи миозина [28]. Эра современных ГеККИ началась с появлением биосенсоров на основе флуоресцентных белков (ФБ), способных определять изменения уровня внутриклеточного кальция [21, 29], напряжения мембраны [30] и секреции синаптических пузырьков [31].

Генетически-кодировемые кальциевые индикаторы — это тип биосенсоров, используемых для измерения концентрации ионов кальция в живых клетках. ГеККИ создаются путем слияния кальций-связывающего белка, такого как кальмодулин или тропонин-С [26, 32], с флуоресцентным белком, например, GFP, для регистрации внутриклеточного уровня кальция. Существует несколько типов ГеККИ, включая однофлуорофорные ГеККИ (интенсифицированные), двухфлуорофорные ГеККИ (резонансного переноса энергии Фёрстера, FRET, ратиометрические) [33–

35] и GeKKI на основе флуоресцентных белков, отличных от GFP. GeKKI наиболее широко используются для прижизненной визуализации в модельных системах, включая червей [36, 37], зебрафиш [38], мух [39], грызунов [40, 41] и нечеловеческих приматов [42, 43].

В данном обзоре речь пойдет об интенсифицированных Ca^{2+} -сенсорах, таких как GCaMP, т.к. этот тип GeKKI является одним из самых распространенных сенсоров для визуализации нейронной активности [44]. Данный обзор будет полезен читателям, начинающим работать в области флуоресцентной визуализации нейронной активности.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ ИНДИКАТОРОВ

Преимущество GeKKI в том, что они позволяют проводить хроническую неинвазивную визуализацию определенных клеток и компартментов [45] за счет оптической флуоресцентной визуализации, которая в свою очередь позволяет одновременно исследовать большие популяции нейронов, избежать серьезного повреждения интересующих клеток [13]. GeKKI могут быть введены с помощью вирусной доставки генов или трансгеноза (постоянной геномной модификации). Генетический контроль снижает фоновый сигнал от источников, не являющихся объектом исследования, повышая соотношение сигнал–шум (SNR) [46] и позволяя исследовать популяцию клеток, которая анатомически или функционально связана. Например, GeKKI позволяют специфически маркировать нейроны прямых и непрямых путей в стриатуме [47], а также возбуждающие [48] и тормозные [49] нейроны. Также GeKKI позволяют одновременно регистрировать данные с большой популяцией клеток с лучшим пространственным разрешением, чем электрофизиологические методы [50, 51]. Это не означает, что оптическая визуализация устраняет необходимость применения электрических методов в нейробиологии. Напротив, методы электрической регистрации также прогрессируют и могут предложить лучшее или сопоставимое пространственное разрешение [52].

Возможность проводить хроническую регистрацию одних и тех же клеток в течение длительного периода времени [34, 41, 53] является одним из ключевых преимуществ GeKKI. Их применение дало возможность получать изображения динамики уровней внеклеточных нейротрансмиттеров и нейромодуляторов у свободно передвигающихся животных [54, 55]. Кроме того, важным преимуществом визуализации Ca^{2+} является совместимость этого метода с другими оптическими методами. Например, сочетание визуализации Ca^{2+} с оптогенетическими подходами позволяет реализовать оптическую электрофизиологию, в которой одновременно происходит визуализация и модуляция светом одних и тех же групп нейронов [56].

К недостаткам GeKKI можно отнести необходимость подбора уровня экспрессии. Низкий уровень экспрессии исключает визуализацию сенсора и снижает SNR. Он также требует визуализации с более высокой мощностью источника света и более длительным временем экспозиции, что может привести к фототоксичности, снижению скорости визуализации и увеличению фотообесцвечивания. С другой стороны, высокий уровень экспрессии подразумевает использование меньшей мощности источника возбуждения, но также увеличивает буферизацию кальция и может нарушить сигнальные пути клетки, что может привести к цитотоксичности и цитоморбидности [12, 41, 57, 58]. Проблема, как правило, решается выбором соответствующего задачам исследования серотипа вируса с различным тропизмом для разных типов клеток и эмпирическим подбором его концентрации [59, 60]. Среди новых серотипов с улучшенной трансдукцией и новыми свойствами доставки следует отметить AAV-PHP.eB. Данный серотип является производным AAV9,

который эффективно преодолевает гематоэнцефалический барьер после внутривенной инъекции [61], обеспечивая удобный способ экспрессии необходимых индикаторов в нескольких областях мозга грызунов [62]. Индикаторы с высоким сродством к Ca^{2+} могут нарушать собственные Ca^{2+} -зависимые процессы в клетке [63, 64]. Так, например, варианты ГеККИ на основе кальмодулина могут влиять на работу кальциевых каналов L-типа (Ca_v1), препятствуя как их открытию, так и передаче сигнала [65]. Решением данной проблемы может быть использование бескальциевой формы кальмодулина (apoCaM) [66]. Кроме того, ГеККИ могут связываться с кальцием не только в местах, где его концентрация повышена, но и там, где кальция нет, но есть другие катионы, например, магний. Это приводит к ложноположительным сигналам, которые могут искажать интерпретацию данных [67]. Одним из вариантов устранения проблемы высокого сродства ГеККИ к кальцию является создание новых версий индикатора с измененными свойствами [68]. Например, существуют индикаторы с низким сродством к магнию, такие как GCaMP6, которые позволяют снизить количество ложноположительных сигналов [69]. Также возможно использование индикаторов, которые реагируют на другие ионы, например, натрий [70] или калий [71]. ГеККИ, такие как GCaMP, имеют медленную (миллисекундную) кинетику, что может затруднять наблюдение быстро изменяющейся активности клеток, т.е. регистрацию высокочастотных потенциалов действия [72, 73].

В целом, несмотря на проблемы, ГеККИ в сочетании с современными методами микроскопии сегодня широко используются для исследования нейронной активности в самых разных условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [74].

ОДНОФЛУОРОФОРНЫЕ ГЕККИ

Первым однофлуорофорным (интенсиометрическим) ГеККИ был Camgaroo — индикатор кальция, реализованный на основе кальмодулина (CaM) и желтого флуоресцентного белка (YFP) [75]. Camgaroo был первым индикатором, в котором Ca^{2+} -зависимые конформационные изменения в CaM, вызывали ионизацию хромофора, которая приводила к увеличению флуоресценции [13]. Стоит отметить, что однофлуорофорные индикаторы отличаются от двухфлуорофорных, которые изменяют конформацию белка от вытянутой до более компактной при связывании кальция, что приводит к увеличению эффективности FRET от ФБ с короткой длиной волны к ФБ с большей длиной волны [21]. У однофлуорофорных индикаторов использовался дизайн, отличный от подхода, основанного на FRET, в случае Camgaroo кальций-связывающий домен CaM вставлен в середину YFP. В дальнейшем, индикаторы Pericams [76] и G-CaMP (позднее сокращенный до GCaMP) [77] расширили эту концепцию, присоединив CaM к C-концу и CaM-связывающий пептид к N-концу кругового пермутированного флуоресцентного белка [75, 78]. На текущий момент, основными представителями однофлуорофорных ГеККИ являются индикаторы семейства GCaMP [77], которые все чаще используются для визуализации кальция *in vivo* [39, 79, 80].

Как отмечалось выше, дизайн GCaMP основан на молекулярном слиянии быстрой кальций-связывающей части белка (CaM), кальмодулин-связывающего пептида из киназы легкой цепи миозина гладких мышц (RS20, также известного как M13 [77]) и одного кругового пермутированного флуоресцентного белка, как правило, зеленого (срEGFP) [44]. При связывании с Ca^{2+} мотив CaM (может связывать до четырех ионов кальция) вызывает конформационные изменения, которые обеспечивают связывание с M13. Эти взаимодействия вызывают депротонирование хромофора, что приводит к изменению спектральных свойств и увеличению интенсивности излучения сигнала (рис. 1) [41, 81, 82].

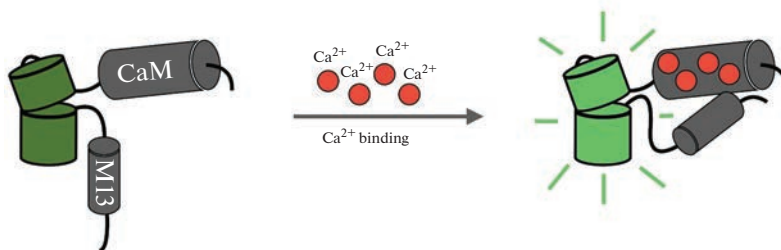


Рис. 1. Схематическое изображение однофлуорофорных генетически кодированных индикаторов кальция. Связывание Ca^{2+} (красные кружки) с кальций-связывающим доменом (CaM–M13) увеличивает флуоресценцию кругового пермьютированного флуоресцентного белка (изображен зеленым оттенком).

Оптический сигнал, создаваемый GCaMP, пропорционален доле молекул индикатора, связанных с Ca^{2+} [44]. Флуоресценцию GCaMP обычно регистрируют при возбуждении на длине волны 470–480 нм при однофотонном, 920–940 нм при двухфотонном и ~1300 нм при трехфотонном возбуждении [47, 83–85]. При этом скорость флуоресцентных конформаций GCaMP может быть ограничена не только скоростью связывания кальция, но и скоростью взаимодействия CaM и M13 [44]. Также стоит отметить, что для Ca^{2+} -индикаторов время включения обычно быстрее, чем затухания, поскольку первое обычно ограничено связыванием Ca^{2+} с индикатором, а второе — буферизацией и откреплением Ca^{2+} от индикатора [63].

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ, ХАРАКТЕРИЗИРУЮЩИЕ ОДНОФЛУОРОФОРНЫЕ ГЕККИ

Важными характеристиками ГЕККИ являются: динамический диапазон, соотношение сигнал–шум, отношение сигнала к базовому уровню, константа диссоциации и коэффициент Хилла.

Динамический диапазон (D) является одним из наиболее важных характеристик ГЕККИ, который для однофлуорофорных индикаторов определяется по формуле:

$$D = \frac{F_{\max}}{F_{\min}},$$

где D — динамический диапазон, а $F_{\max}$ и $F_{\min}$ — соответственно максимальная и минимальная интенсивности флуоресценции, полученные в условиях Ca^{2+} -насыщения или Ca^{2+} -деплеции.

Динамический диапазон также может быть выражен в процентах и может быть определен следующим образом:

$$D = \left(\frac{F_{\max}}{F_{\min}} - 1 \right) \times 100\%.$$

Как видно из уравнения, двукратное увеличение интенсивности флуоресценции соответствует 100%-ному увеличению динамического диапазона.

Отношение сигнала к базовому уровню (SBR) или мера сигнала, сообщаемого индикатором во время изменения внутриклеточной концентрации кальция для

интенсимоетрического индикатора, определяется отношением флуоресцентного ответа к базовой флуоресценции [19]:

$$SBR = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{(F - F_0)}{F_0},$$

где ΔF — изменение интенсивности флуоресценции, зарегистрированное при изменении Ca^{2+} , F_0 — средняя базовая флуоресценция в условиях покоя.

Как правило, способность индикатора регистрировать Ca^{2+} -транзистент на фоне флуоресценции определяется на основе соотношения сигнал—шум (SNR), характерного для индикатора, которое вычисляется как отношение между сигналом флуоресценции (ΔF) и дробным шумом базовой флуоресценции [19]:

$$SNR = \frac{\Delta F}{SD_{F_0}},$$

где SD_{F_0} — стандартное отклонение базовой флуоресценции (до изменения концентрации кальция в клетке).

Еще одной важной характеристикой интенсимоетрических индикаторов является фракционное насыщение (θ) [86], которое может быть определено следующим образом:

$$\theta = \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F_{\min})},$$

где F — интенсивность флуоресценции, $F_{\max}$ и $F_{\min}$ — соответственно максимальная и минимальная интенсивности флуоресценции, полученные в условиях Ca^{2+} -насыщения или Ca^{2+} -деплеции. Фракционное насыщение зависит как от концентрации Ca^{2+} в исследуемой среде, так и от свойств связывания Ca^{2+} индикатором. Если фракционное насыщение высокое, то дальнейшее увеличение Ca^{2+} приведет к незначительному изменению SNR .

Реакции, способствующие изменению оптических свойств ГеККИ при связывании Ca^{2+} в условиях равновесия, могут быть описаны с помощью константы диссоциации (K_d):

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}},$$

где k_{off} и k_{on} — скорости ассоциации и диссоциации между лигандом и рецептором, эти параметры определяют, насколько быстро и эффективно индикатор связывается и высвобождает ионы кальция в ответ на изменения концентрации кальция. Значение K_d позволяет качественно сравнивать ГеККИ между собой и дает представление о приблизительном диапазоне концентраций Ca^{2+} , в котором могут функционировать ГеККИ. Чем ниже значение K_d , тем меньше концентрация кальция, необходимая для насыщения индикатора, и, следовательно, тем более чувствительным является индикатор к изменениям концентрации кальция в клетке.

Связь между фракционным насыщением индикатора, концентрацией кальция и

K_d индикатора выражается с помощью уравнения Хилла [87]: $\theta = \frac{[\text{Ca}^{2+}]^n}{([\text{Ca}^{2+}]^n + K_d)}$,

где n — коэффициент Хилла, а остальные переменные имеют то же значение, что описано выше. Константа Хилла показывает кривизну зависимости между концентрацией кальция и сигналом (флуоресценцией индикатора). Коэффициент Хилла может принимать значения больше, меньше или равные 1. Если коэффици-

ент Хилла равен 1, то зависимость между концентрацией кальция и сигналом линейна. Если коэффициент Хилла больше 1, то зависимость имеет более крутой наклон и является сигналом с усилением, что может быть полезно для измерения кальция в более высоких концентрациях. Если коэффициент Хилла меньше 1, то зависимость имеет более плавный наклон и является сигналом с ослаблением, что может быть полезно для измерения кальция в более низких концентрациях.

Для определения коэффициента Хилла и константы диссоциации проводят калибровку GeKKI. Калибровка представляет собой процесс определения связи между флуоресцентным сигналом, который генерирует кальциевый индикатор, и концентрацией ионов кальция. В процессе калибровки GeKKI проводятся эксперименты, в которых измеряют флуоресцентный сигнал индикатора при различных известных концентрациях кальция. На основе полученных данных строится калибровочная кривая, которая позволяет обратно преобразовать флуоресцентный сигнал GeKKI в соответствующую концентрацию ионов кальция, необходимую для дальнейшего измерения кальциевой активности в биологических системах.

Для калибровки используют очищенный белок GeKKI [12]. Титрование кальция проводят по нескольким точкам, изменяя концентрацию кальция от 100 нМ до 10 мМ. Для этого разбавляют очищенный белок GeKKI в соотношении 1 : 50 в буферном растворе, содержащем 30 мМ MOPS (pH 7.2) и 100 мМ KCl. В зависимости от требуемой концентрации свободного кальция, в буфер добавляют либо 10 мМ EGTA (без свободного кальция), либо 10 мМ CaEGTA (~39 мкМ свободного кальция), смешивают в различных пропорциях. Далее, используя спектрофотометр с микропланшетным ридером, например, Safire 2 (Tecan), регистрируют флуоресценцию индикатора при определенных длинах волн. Например, для GCaMP возбуждение осуществляется на длине волны 485 нм, а эмиссия измеряется на длине волны 510 нм. Затем полученные данные используются для построения калибровочных кривых связывания индикатора с кальцием. Для аппроксимации этих кривых используют сигмоидальные функции, после чего определяют коэффициент Хилла и K_d .

Наряду с калибровкой GeKKI определяют значения ряда параметров, таких как константа диссоциации по кислотности (pK_a), коэффициент экстинкции (ϵ) и квантовый выход (Φ).

Определение константы диссоциации по кислотности (pK_a) осуществляется путем титрования по pH. pK_a представляет собой значение pH, при котором половина молекул GeKKI находится в протонированной форме (несвязанной с кальцием) и половина в депротонированной форме (связанной с кальцием). При pH ниже pK_a большая часть GeKKI будет находиться в протонированной форме, а при pH выше pK_a – в депротонированной форме. Для определения константы диссоциации очищенный белок GeKKI разбавляют в pH-буферах, содержащих либо 5 мМ CaCl_2 для индикатора в связанном с кальцием состоянии, либо 5 мМ EGTA для GeKKI в несвязанном с кальцием состоянии соответственно. Буферы готовят таким образом, чтобы получить двенадцать различных значений pH в диапазоне от 4.5 до 10.5 [12]. Значения pK_a определяют по точке перегиба кривой флуоресценции в зависимости от pH. Определение pK_a для GeKKI позволяет подобрать оптимальное pH, при котором будет достигнута наилучшая флуоресцентная активность и стабильность индикатора.

Коэффициент экстинкции (ϵ) GeKKI определяется как отношение поглощенной интенсивности света к концентрации индикатора в растворе и позволяет оценить, насколько эффективно флуорофор поглощает свет определенной длины волны. Коэффициент экстинкции GeKKI важен для вычисления концентрации кальция в клетке на основе изменений интенсивности флуоресценции, вызванных

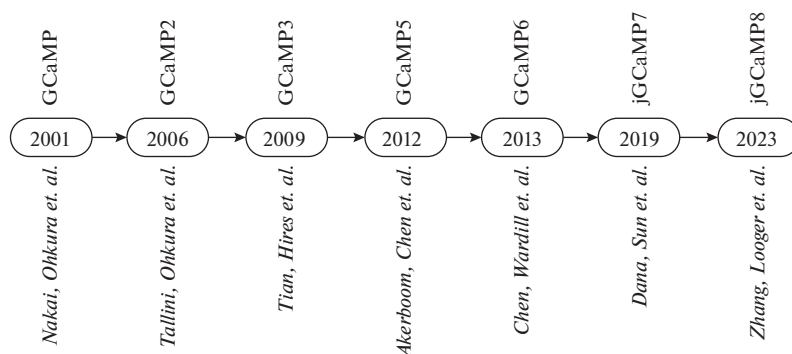


Рис. 2. Хронология развития основных представителей семейства GCaMP по датам соответствующих публикаций.

взаимодействием индикатора с кальцием. Чем больше значение коэффициента экстинкции, тем больше света поглощается флуорофором, и тем сильнее может быть его флуоресцентный сигнал. Значение коэффициента экстинкции можно определить экспериментально, используя известную концентрацию ГеККИ и значение поглощенной интенсивности света, измеренное с помощью спектрофотометра. Для определения коэффициента экстинкции индикатора в связанном и несвязанном с кальцием состояниях, очищенный белок ГеККИ растворяют в 50 мМ MOPS, 100 мМ KCl (pH 7.2), содержащем либо 5 мМ CaCl₂, либо 10 мМ EGTA соответственно. Затем измеряется поглощенная интенсивность света при соответствующей длине волны, например, для GCaMP – при 497 или 505 нм [12]. Концентрацию ГеККИ в растворе определяют путем денатурации белка в 0.1 М NaOH с использованием коэффициента экстинкции 44 000 М⁻¹ см⁻¹ при 447 нм для денатурированного хромофора GFP [12].

Квантовый выход (Φ) определяется как отношение количества испускаемых фотонов (флуоресцентного сигнала) к количеству поглощенных фотонов (возбуждающего света) и показывает, насколько эффективно ГеККИ преобразует энергию поглощенного света в флуоресцентный сигнал. Квантовый выход измеряется в процентах или в долях единицы (от 0 до 1). Например, если квантовый выход составляет 0.6, это означает, что ГеККИ испускает примерно 60% фотонов в виде флуоресцентного сигнала, а остаток энергии теряется в виде нагрева или других процессов. Чем выше значение квантового выхода, тем более эффективно флуорофор преобразует поглощенные фотоны в испускаемую флуоресценцию. Для определения квантового выхода, очищенный белок ГеККИ, насыщенный кальцием, растворяют в 50 мМ MOPS, 100 мМ KCl и 5 мМ CaCl₂. Затем, с помощью спектрофотометра анализируется количество испускаемых и поглощенных фотонов. Для GCaMP пики возбуждения/эмиссии без кальция и с кальцием составляют 505 нм/517 нм и 497 нм/515 нм соответственно [12].

РАЗВИТИЕ GCaMP

Оригинальная версия сенсора GCaMP [77] была итеративно усовершенствована несколькими группами исследователей путем многочисленных раундов мутагенеза и селекции (рис. 2, табл. 1) [13]. В результате появились следующие версии сенсора: GCaMP1.6 [88], GCaMP2 [89], GCaMP3 [41], высокочувствительные GCaMP, такие как GCaMP-HS [83], Fast-GCaMPs [90], GCaMP4.1 [91], GCaMP5 [92], GCaMP6

Таблица 1. Характеристики основных представителей семейства GCaMP

Вариант GCaMP	Кальций-связывающий домен	K_d (нМ)	Коэффициент Хилла	Источник
GCaMP	CaM-M13	235	3.3	[77]
G-CaMP2		146	3.8	[89]
GCaMP3		330	3.2	[100]
GCaMP5A		307	2.7	[92]
GCaMP5G		460	2.5	
GCaMP5K		189	3.8	
GCaMP6s		144	2.9	[12]
GCaMP6m		167	2.96	
GCaMP6f		375	2.27	
jGCaMP7f		174	2.3	[93]
jGCaMP7s		68	2.49	
jGCaMP7c		298	2.44	
jGCaMP7b		82	3.06	
jGCaMP8f	CaM-eNOS	334	2.08	[94]
jGCaMP8m		108	1.92	
jGCaMP8s		46	2.2	

(GCaMP6s, GCaMP6m и GCaMP6f) [12], jGCaMP7 (т.е. jGCaMP7s, jGCaMP7f, jGCaMP7b и jGCaMP7c) [93], jGCaMP8 (jGCaMP8f, jGCaMP8m и jGCaMP8s) [94]. Самыми востребованными версиями GCaMP за исключением последних модификаций индикатора были GCaMP3, GCaMP5, GCaMP6 [95].

Следует отметить, что некоторые научные группы используют отдельную систему нумерации для вариантов GCaMP [95], которые включают GCaMP6 [96], G-CaMP7 [96], GCaMP7a [97], G-CaMP7.09 [98] и GCaMP8 [96], GCaMP9a [99], GCaMP-X [65]. Однако эти GCaMP являются постепенным усовершенствованием не серии GCaMP6, а более ранних версий [12].

GCaMPs продемонстрировали свое применение для обнаружения ПД и определенных субклеточных событий *in vivo*. Одно из их первых применений *in vivo* – визуализация одорантных ответов у мух, где использовался GCaMP1 [39]. С тех пор GCaMPs использовались для визуализации активности в мозге червей и рыб, что позволило выявить специфические нейроны, участвующие в принятии решений или обучении [101–104]. Регистрация ПД в одной и той же популяции нейронов с течением времени с помощью GCaMP позволила выявить процесс, при котором определенные нейроны в мозге начинают работать вместе для выполнения определенной функции (рекрутирование) во время обучения у мыши [105–107]. GCaMP также использовались для локализации активности в определенных постсинаптических и пресинаптических компартментах [108].

С момента появления GCaMP2 ГеККИ на его основе стали регулярно использоваться для визуализации *in vivo*, поскольку GCaMP2, в отличие от предыдущих вер-

сий GCaMP, обладал пониженной чувствительностью к pH и был полностью функционален при 37°C [109]. Благодаря этим особенностям GCaMP2 использовался для отслеживания пресинаптических кальциевых транзиев, отдельных спайков и больших популяций нейронов [12, 110]. В результате GCaMP2 послужил шаблоном для создания высокочувствительных GCaMP с улучшенным временным и пространственным разрешением для *in vivo* исследований [73, 83].

Значительный прогресс был достигнут в версии GCaMP3, которая обладала повышенной яркостью, динамическим диапазоном и сродством к Ca^{2+} , что позволило регистрировать повышение Ca^{2+} , вызванное отдельными потенциалами действия *in vitro* [41]. GCaMP3 был первым вариантом ГеККИ, для которого были созданы трансгенные мыши, обеспечивающие неинвазивную, хроническую экспрессию с использованием Cre-рекомбиназы [111, 112]. Наличие таких мышей значительно расширило возможности использования GCaMP3. Кроме того, GCaMP3 был использован для обнаружения активности в больших популяциях нейронов в моторной коре [41], бочкообразной коре [113] и гиппокампе [80] мышей. Долгосрочная визуализация с использованием GCaMP3 выявила изменения в нейронной сети, связанные с обучением, *in vivo* [114]. GCaMP3 также использовался для исследования активности популяции нейронов в слое 5 (L5) соматосенсорной коры взрослой мыши [115], изучения сетчатки мыши на клеточном и субклеточном уровнях [116], зрительного тракта зебрафиш [117] и зрительно-моторного пути дрозофилы [118] и др. Тем не менее, на тот момент времени, GCaMP3 оставался несовершенным ГеККИ, т.к. не позволял стабильно регистрировать одиночные ПД *in vivo* и отставал по скорости обнаружения активных клеток от показателей синтетических кальциевых сенсоров [41].

На основе GCaMP3 был создан набор вариантов GCaMP5 путем целевого мутагенеза линкерных последовательностей, соединяющих M13/CaM с cрGFP [81, 92, 119]. Двенадцать GCaMP5 (5A, 5D, 5G, 5K, 5L и др.) были систематически охарактеризованы в культивируемых нейронах, астроцитах, а также в *Caenorhabditis elegans*, дрозофиле, зебрафиш и мыши в различных условиях. Все варианты GCaMP5 продемонстрировали улучшенный динамический диапазон по сравнению с GCaMP3, среди которых отдельно отмечались варианты GCaMP5A, GCaMP5G и GCaMP5K [95]. В результате улучшения характеристик, GCaMP5 использовался для локализации одиночных событий высвобождения нейромедиаторов в нервно-мышечном соединении мухи, показав, что спонтанные и вызванные события происходят на разных бутонах [120].

Впоследствии на основе GCaMP5 был создан GCaMP6 путем модификаций аминокислот между cрGFP-CaM и M13-CaM [12]. На диссоциированной культуре нейронов были проверены 447 вариантов GCaMP, в результате чего были получены три сверхчувствительных варианта GCaMP6 с различной кинетикой: GCaMP6s, GCaMP6m и GCaMP6f, характеризующиеся медленной, средней и быстрой кинетикой соответственно. По сравнению с GCaMP5, эти сенсоры имели 1.1–1.6-кратное увеличение динамического диапазона и в три раза более высокую аффинность связывания Ca^{2+} . Кроме того, GCaMP6f на то время демонстрировал самую быструю кинетику среди всего семейства GCaMP благодаря мутации в домене M13-CaM. Поколение генетически кодированных сенсоров GCaMP6 (GCaMP6s, GCaMP6m и GCaMP6f) стало самым востребованным и произвело прорыв в области прижизненной кальциевой визуализации [95]. Так, например, GCaMP6 использовался для регистрации кальциевых транзиев от дендритных отростков возбуждающих тормозных интернейронов, расположенных в первичной зрительной коре [12]. В экспериментах с использованием GCaMP6s было показано, что разные отростки на одном и том же нейроне зрительной коры отвечают на зрительные стимулы раз-

ной ориентации [12]. С помощью GCaMP6s было обнаружено, что локальные дендритные шипики коррелируют с синаптическим потенцированием в нейронах коры головного мозга [121] и приобретением специфичности места в нейронах гиппокампа [122]. Кроме того, GCaMP6s использовали для обнаружения ориентационной избирательности отдельных аксональных бутонов в проекциях зрительной коры [123]. В свою очередь, GCaMP6f использовался для изучения нейронных сетей у бодрствующих свободно передвигающихся мышей с высоким временным разрешением путем однофотонной широкопольной визуализации с помощью миниатюрных микроскопов [124]. В целом, можно сказать, что варианты GCaMP6 активно использовались для визуализации активности нейронов у бодрствующих животных [125–130].

Дальнейшая оптимизация GCaMP6 привела к созданию серий jGCaMP7 (Janelia GCaMP7) [93] и jGCaMP8 (Janelia GCaMP8) [94]. jGCaMP7 был создан путем модификаций аминокислот между cpGFP-CaM, M13-CaM и M13-cpGFP. На диссоциированной культуре нейронов были проверены 662 варианта GCaMP [93]. В результате были отобраны следующие варианты GCaMP7 с различными свойствами: jGCaMP7s (чувствительный), jGCaMP7b (яркий), jGCaMP7c (контрастный), jGCaMP7f (быстрый). jGCaMP7s показал более низкую константу диссоциации (более высокое сродство) для связывания Ca^{2+} по сравнению с GCaMP6s (68 против 147 нМ). jGCaMP7f, jGCaMP7b и jGCaMP7s продемонстрировали более высокую базовую флуоресценцию, а также большую амплитуду $\Delta F/F_0$ по сравнению с GCaMP6f. Кинетика jGCaMP7f оказалась быстрее, чем у других сенсоров jGCaMP7, и была сравнима с GCaMP6f. jGCaMP7s, в отличие от других версий jGCaMP7, имел более медленное время затухания. jGCaMP7b демонстрировал 50%-ное увеличение базового уровня флуоресценции по сравнению с GCaMP6s. В сравнении с семейством GCaMP6, индикаторы jGCaMP7 обеспечивали улучшенное обнаружение отдельных спайков (jGCaMP7s,f), визуализацию в нейритах и нейропиле (jGCaMP7b) и позволяли отслеживать большие популяции нейронов с помощью двухфотонной (jGCaMP7s,f) или широкопольной (jGCaMP7c) визуализации [93].

jGCaMP8 был разработан путем замены пептида M13 на пептид эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) [94]. Такая конструкция придавала сенсору более быструю кинетику, что улучшало отслеживание потенциалов действия. На диссоциированной культуре нейронов были проверены 32 варианта GCaMP. В результате было отобрано три перспективных варианта: jGCaMP8s (быстрое нарастание, медленное затухание, высокая чувствительность), jGCaMP8f (быстрое нарастание и быстрое затухание) и jGCaMP8m (быстрое нарастание и среднее затухание). Все индикаторы jGCaMP8 имели более быстрое время нарастания (~10 мс) и спада (~50–200 мс) флуоресценции, чем время нарастания (~50–200 мс) и спада (~150–500 мс) у GCaMP6 [12]. Варианты jGCaMP8 позволяли регистрировать отдельные спайки в нейронах с частотой до 50 Гц. $\Delta F/F_0$ и SNR для всех индикаторов jGCaMP8 были больше, чем для jGCaMP7, при этом jGCaMP8f в три быстрее jGCaMP7f. Семейство jGCaMP8 идеально подходит для отслеживания активности быстрospайкующих интернейронов. Из-за быстрого времени затухания флуоресценции индикаторы jGCaMP8 более предпочтительны для визуализации с более высокой частотой дискретизации, чем широко используемые индикаторы jGCaMP7s и GCaMP6s.

ЦВЕТОВЫЕ РАЗНОВИДНОСТИ GCaMP

С появлением GCaMP6, jGCaMP7 и jGCaMP8 оптимизация GeKKI типа GCaMP, по крайней мере для зеленой флуоресцентной разновидности, казалось, достигла стадии, когда дальнейшее улучшение труднодостижимо или невозможно.

Тем не менее были созданы варианты интенсиометрических кальциевых сенсоров с ФБ отличными от GFP [68, 69, 131]. В результате путем замены *srEGFP* на *sr-mApple* и *sr-mRuby* были созданы красные флуоресцентные Ca^{2+} -индикаторы, такие как R-GECO [68] и RCaMP [119]. Впоследствии в семействе GECO были созданы многоцветные варианты: B-GECO (синие), Y-GECO (желтые) и NIR-GECO (инфракрасные) [132–135]. Зеленые флуоресцентные Ca^{2+} -индикаторы, как правило, работают лучше всего, но наличие других цветовых вариантов позволяет пользователям одновременно получать изображения Ca^{2+} -активности различных типов клеток в разных цветах или выбирать ГеККИ, спектрально совместимые с другими индикаторами, используемыми в эксперименте. Стоит отметить, что флуоресцентные индикаторы со смещенными в красную область спектрами возбуждения обладают сниженной фоновой автофлуоресценцией, меньшей фототоксичностью и лучшим соотношением сигнал–шум благодаря меньшему поглощению красных длин волн в тканях мозга [68].

Сенсоры семейства GECO [68] были созданы на основе GCaMP3 путем случайного мутагенеза. GECO позволяли маркировать несколько клеточных популяций разными цветами и осуществлять визуализацию в глубоких слоях мозга. Однако эти варианты страдали слабой интенсивностью и ограниченным контрастом для визуализации *in vivo*.

Аналогично GCaMP, R-GECO был впоследствии оптимизирован и сконструирован в R-CaMP1.07, R-CaMP2, XCaMP-R, jRGECO и K-GECO1 [69, 131, 136]. Так, например, R-CaMP2 был создан путем замены фрагмента M13 в R-CaMP1.07 (в то время обладавшего наивысшими характеристиками красного ГеККИ) на пептид сккар из киназы CaMK (CaMKK) из 150 мутаций, которые были внесены в домен *srRFP*-CaM. R-CaMP2 имел в три раза более высокую чувствительность к Ca^{2+} ($K_d = 70$ нМ) и коэффициент Хилла 1.2. Этот подход был также использован при разработке красного флуоресцентного Ca^{2+} -индикатора K-GECO1, который включал сккар в качестве CaM-связывающего пептида и демонстрировал улучшенную чувствительность, быструю кинетику и линейный ответ на спайки [136].

Отдельно стоит упомянуть более поздний набор многоцветных ГеККИ, созданный на основе GCaMP4.1 и получивший название X-CaMP (синий: XCaMP-B, зеленый: XCaMP-G, желтый: XCaMP-Y, красный: XCaMP-R) [131]. В серии XCaMP был использован подход, аналогичный созданию R-CaMP2. В отличие от классических представителей GCaMP, в XCaMP пептид M13 был заменен на пептид сккар из CaMKK. Предыдущие биохимические анализы показали, что CaMKK обладает высоким сродством к Ca^{2+} и низким коэффициентом Хилла (~ 1), т.е. линейно реагирует на кальций [131]. XCaMPs позволяет обнаруживать одиночные спайки в течение 3–10 мс после начала спайка, что особенно важно для оценки быстроспайкующих интернейронов [131], в то время как у многих представителей семейства GCaMP коэффициенты Хилла для связывания Ca^{2+} больше единицы, что делает их менее чувствительными к одному или нескольким спайкам [22]. Кроме того, повышенная базовая флуоресценция X-CaMP облегчает использование кальциевой визуализации для оценки подпороговых событий в шипиках и синаптических терминалах [131]. Новые цветовые варианты (синий, желтый и красный) в серии X-CaMP облегчают многоцветную визуализацию с 1-фотонным или 2-фотонным возбуждением флуоресценции.

На сегодняшний день многоцветная визуализация с использованием кальциевых сенсоров становится все более актуальна. Например, использование различных многоцветных сенсоров может способствовать раскрытию взаимодействия между нейронами и астроцитами в процессе формирования нейронных связей [95]. Так, использование двухцветной одновременной двухфотонной визуализации

нейронов и астроцитов в зрительной коре бодрствующей мыши имело решающее значение для обнаружения зрительного ответа астроцитов, в частности того, как этот ответ связан с активностью соседних нейронов [137].

Еще одним преимуществом многоцветной Ca^{2+} -визуализации является одно-временная визуализация пре- и постсинаптических, субклеточных компартментов нейронов из перекрывающихся аксонов и дендритов или отростков астроцитов [69, 131, 138]. Двухцветные одновременные наблюдения в слое I бочковой коры мыши с использованием XCaMP-R в дендритах пирамидальных нейронов и XCaMP-Y в аксоне SST-нейронов позволили охарактеризовать обработку информации через синапсы [131]. Постсинаптические Ca^{2+} -события были подавлены только в дендритных сегментах с перекрывающимися аксонами. Дендритные события также достоверно подавлялись за секунду до и после активации аксона. В совокупности эти результаты определяют пространственные и временные масштабы локального дендритного торможения в апикальных отростках пирамидальных нейронов.

Кроме всего выше сказанного, отдельно стоит упомянуть использование многоцветных ГеККИ в оптогенетических экспериментах. Оптогенетическая модуляция в сочетании с мониторингом клеточной активности на основе GCaMP позволяет использовать полностью оптическую электрофизиологию (ОЭ). Первоначальные усилия по созданию ОЭ были затруднены из-за спектрального разделения индикаторов. Например, зеленые GCaMP не могут быть использованы в клетках, экспрессирующих каналородопсин-2 (ChR2), галородопсин (HR) или архродопсин (Arch), поскольку спектр возбуждающего света ГеККИ перекрывается со спектрами активации светочувствительных каналов [44]. Примером красного ГеККИ, который удалось использовать в сочетании с оптогенетикой, является вариант jRGECO1a [93]. Попытки еще больше сдвинуть спектр возбуждения ГЕККИ в красную область привели к созданию индикатора кальция ближнего инфракрасного (NIR) диапазона, NIR-GECO1, который состоит из кальцийсвязывающих доменов CaM и M13, вставленных в основанный на бактериофитохроме NIR-флуоресцентный белок mIFP [134]. Дополнительные спектры возбуждения ГеККИ обеспечивают гибкость в инструментарии оптофизиологии, позволяя анализировать различные нейронные ансамбли [68].

Расширение цветового спектра значительно увеличило потенциал ГеККИ в многоцветной визуализации. Применение красных флуоресцентных индикаторов позволили уменьшить рассеяние ткани, фототоксичность и фоновую флуоресценцию, способствуя визуализации в глубоких слоях мозга. Применение синих и желтых вариантов ГеККИ, помимо красных и зеленых, позволили исследователям проводить одновременную визуализацию различных нейронных ансамблей, а также комбинировать применение генетически кодируемых кальциевых индикаторов с оптогенетическими инструментами [119].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение генетически кодируемых кальциевых индикаторов представляет собой важный инструмент для изучения нейрональных процессов и нейронных ансамблей в реальном времени. В этом обзоре была представлена необходимая информация об однофлуорофорных ГеККИ: их преимуществах и недостатках, разновидностях, особенностях текущего использования и перспективах применения для визуализации нейронной активности. Один из главных плюсов ГеККИ заключается в том, что они позволяют получать детальную информацию о кальциевых сигналах в реальном времени. Современные тенденции совершенствования ГеККИ направлены на расширение их спектральных свойств и способности регистрировать

высокочастотную спайковую активность путем модификаций домена CaM-M13. Благодаря многоцветной *in vivo* визуализации с использованием ГеККИ и ее комбинированию с такими методами, как оптогенетика, нейробиологи вносят дополнительный вклад в наше понимание функций мозга. Очевидно, что в ближайшие годы мы увидим новые версии ГеККИ, учитывая большое количество CaM-связывающих белков (более 300) [139], которые могут быть полезны для дальнейшего усовершенствования этих индикаторов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ “Исследование кальциевой и электрофизиологической активности нейронов гиппокампа *in vivo* у мышей с моделью болезни Альцгеймера” (номер гос. регистрации 22-75-00028).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

А.И.Е., Е.К.В., О.Л.В., И.Б.Б. внесли существенный вклад в написание и редактирование статьи, а также одобрили финальную версию, подлежащую публикации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны Большаковой Анастасии Викторовне за административную помощь, а также сотрудникам Лаборатории молекулярной нейродегенерации за помощь и полезные советы в написании данного обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grienberger C, Konnerth A* (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73: 862–885.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
2. *Russell JT* (2011) Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 163: 1605–1625.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00988.x>
3. *Ghosh A, Greenberg ME* (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268: 239–247.
<https://doi.org/10.1126/science.7716515>
4. *Kawamoto EM, Vivar C, Camandola S* (2012) Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol* 3: 61.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00061>
5. *Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ* (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94: 325–334.
<https://doi.org/10.1083/jcb.94.2.325>
6. *Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY* (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450.

7. Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290: 527–528.
<https://doi.org/10.1038/290527a0>
8. Inoue M (2021) Genetically encoded calcium indicators to probe complex brain circuit dynamics *in vivo*. *Neurosci Res* 169: 2–8.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.05.013>
9. Reck-Peterson SL, Derr ND, Stuurman N (2010) Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Cold Spring Harb Protoc* 2010: pdb top73.
<https://doi.org/10.1101/pdb.top73>
10. Toseland CP (2013) Fluorescent labeling and modification of proteins. *J Chem Biol* 6: 85–95.
<https://doi.org/10.1007/s12154-013-0094-5>
11. Renz M (2013) Fluorescence microscopy—a historical and technical perspective. *Cytometry A* 83: 767–779.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22295>
12. Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger L, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499: 295–300.
<https://doi.org/10.1038/nature12354>
13. Lin MZ, Schnitzer MJ (2016) Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat Neurosci* 19: 1142–1153.
<https://doi.org/10.1038/nn.4359>
14. Carafoli E (2003) The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 326–332.
<https://doi.org/10.1038/nrm1073>
15. Pchitskaya E, Popugaeva E, Bezproznyanny I (2018) Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium* 70: 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.008>
16. Supnet C, Bezproznyanny I (2010) Neuronal calcium signaling, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S487–S498.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100306>
17. Sabatini BL, Svoboda K (2000) Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408: 589–593.
<https://doi.org/10.1038/35046076>
18. Kim TH, Schnitzer MJ (2022) Fluorescence imaging of large-scale neural ensemble dynamics. *Cell* 185: 9–41.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.007>
19. Yasuda R, Nimchinsky EA, Scheuss V, Pologruto TA, Oertner TG, Sabatini BL, Svoboda K (2004) Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Sci STKE* 2004: pl5.
<https://doi.org/10.1126/stke.2192004pl5>
20. Tank DW, Sugimori M, Connor JA, Llinas RR (1988) Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science* 242: 773–777.
<https://doi.org/10.1126/science.2847315>
21. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882–887.
<https://doi.org/10.1038/42264>
22. Rose T, Goltstein PM, Portugues R, Griesbeck O (2014) Putting a finishing touch on GECIs. *Front Mol Neurosci* 7: 88.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00088>
23. Ashley CC (1969) Aequorin-monitored calcium transients in single Maia muscle fibres. *J Physiol* 203: 32P–33P.
24. Ashley CC, Ridgway EB (1968) Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibers. *Nature* 219: 1168–1169.
<https://doi.org/10.1038/2191168a0>
25. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*

- 59: 223–239.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
26. *Mank M, Griesbeck O* (2008) Genetically encoded calcium indicators. *Chem Rev* 108: 1550–1564.
<https://doi.org/10.1021/cr078213v>
27. *Heim R, Tsien RY* (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 6: 178–182.
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00450-5)
28. *Porumb T, Yau P, Harvey TS, Ikura M* (1994) A calmodulin-target peptide hybrid molecule with unique calcium-binding properties. *Protein Eng* 7: 109–115.
<https://doi.org/10.1093/protein/7.1.109>
29. *Romoser VA, Hinkle PM, Persechini A* (1997) Detection in living cells of Ca^{2+} -dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J Biol Chem* 272: 13270–13274.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13270>
30. *Siegel MS, Isacoff EY* (1997) A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19: 735–741.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80955-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80955-1)
31. *Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE* (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394: 192–195.
<https://doi.org/10.1038/28190>
32. *Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomaeus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim DS, Garschuk O, Griesinger C, Griesbeck O* (2014) Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods* 11: 175–182.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2773>
33. *Palmer AE, Tsien RY* (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc* 1: 1057–1065.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.172>
34. *Mank M, Santos AF, Drenth S, Mrcic-Flogel TD, Hofer SB, Stein V, Hendel T, Reiff DF, Levelt C, Borst A, Bonhoeffer T, Hubener M, Griesbeck O* (2008) A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods* 5: 805–811.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1243>
35. *Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A* (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10554–10559.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0400417101>
36. *Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY, Schafer WR* (2000) Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron* 26: 583–594.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81196-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81196-4)
37. *Boulton T, Hobert O* (2012) From genes to function: the *C. elegans* genetic toolbox. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1: 114–137.
<https://doi.org/10.1002/wdev.1>
38. *Higashijima S, Masino MA, Mandel G, Fetcho JR* (2003) Imaging neuronal activity during zebrafish behavior with a genetically encoded calcium indicator. *J Neurophysiol* 90: 3986–3997.
<https://doi.org/10.1152/jn.00576.2003>
39. *Wang JW, Wong AM, Flores J, Voshall LB, Axel R* (2003) Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* 112: 271–282.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00004-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00004-7)
40. *Hasan MT, Friedrich RW, Euler T, Larkum ME, Giese G, Both M, Duebel J, Waters J, Bujard H, Griesbeck O, Tsien RY, Nagai T, Miyawaki A, Denk W* (2004) Functional fluorescent Ca^{2+} indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLoS Biol* 2: e163.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020163>
41. *Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiner ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL* (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Meth-*

- ods 6: 875–881.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1398>
42. Heider B, Nathanson JL, Isacoff EY, Callaway EM, Siegel RM (2010) Two-photon imaging of calcium in virally transfected striate cortical neurons of behaving monkey. *PLoS One* 5: e13829.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013829>
 43. Yin L, Masella B, Dalkara D, Zhang J, Flannery JG, Schaffer DV, Williams DR, Merigan WH (2014) Imaging light responses of foveal ganglion cells in the living macaque eye. *J Neurosci* 34: 6596–665.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4438-13.2014>
 44. Mollinedo-Gajate I, Song C, Knopfel T (2019) Genetically Encoded Fluorescent Calcium and Voltage Indicators. *Handb Exp Pharmacol* 260: 209–229.
https://doi.org/10.1007/164_2019_299
 45. Mao T, O'Connor DH, Scheuss V, Nakai J, Svoboda K (2008) Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS One* 3: e1796.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001796>
 46. Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A (2003) *In vivo* two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7319–7324.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1232232100>
 47. Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494: 238–242.
<https://doi.org/10.1038/nature11846>
 48. Bozza T, McGann JP, Mombaerts P, Wachowiak M (2004) *In vivo* imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron* 42: 9–21.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00144-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00144-8)
 49. Kaifosh P, Lovett-Barron M, Turi GF, Reardon TR, Losonczy A (2013) Septo-hippocampal GABAergic signaling across multiple modalities in awake mice. *Nat Neurosci* 16: 1182–1184.
<https://doi.org/10.1038/nn.3482>
 50. Knopfel T (2012) Genetically encoded optical indicators for the analysis of neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 13: 687–700.
<https://doi.org/10.1038/nrn3293>
 51. Steinmetz NA, Aydin C, Lebedeva A, Okun M, Pachitariu M, Bauza M, Beau M, Bhagat J, Bohm C, Broux M, Chen S, Colonell J, Gardner R J, Karsh B, Kloosterman F, Kostadinov D, Mora-Lopez C, O'Callaghan J, Park J, Putzeys J, Sauerbrei B, van Daal RJJ, Vollen AZ, Wang S, Welkenhuysen M, Ye Z, Dudman JT, Dutta B, Hantman AW, Harris KD, Lee A, Moser EI, O'Keefe J, Renart A, Svoboda K, Hausser M, Haesler S, Carandini M, Harris T D (2021) Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science* 372.
<https://doi.org/10.1126/science.abf4588>
 52. Erofeev A, Antifeev I, Bolshakova A, Bezprozvanny I, Vlasova O (2022) *In Vivo* Penetrating Microelectrodes for Brain Electrophysiology. *Sensors (Basel)* 22.
<https://doi.org/10.3390/s22239085>
 53. Margolis DJ, Lutcke H, Schulz K, Haiss F, Weber B, Kugler S, Hasan MT, Helmchen F (2012) Reorganization of cortical population activity imaged throughout long-term sensory deprivation. *Nat Neurosci* 15: 1539–1546.
<https://doi.org/10.1038/nn.3240>
 54. Patriarchi T, Cho JR, Merten K, Howe MW, Marley A, Xiong WH, Folk RW, Broussard GJ, Liang R, Jang MJ, Zhong H, Dombeck D, von Zastrow M, Nimmerjahn A, Gradinaru V, Williams JT, Tian L (2018) Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* 360.
<https://doi.org/10.1126/science.aat4422>
 55. Sabatini BL, Tian L (2020) Imaging Neurotransmitter and Neuromodulator Dynamics *In Vivo* with Genetically Encoded Indicators. *Neuron* 108: 17–32.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.036>
 56. Emiliani V, Cohen AE, Deisseroth K, Hausser M (2015) All-Optical Interrogation of Neural Circuits. *J Neurosci* 35: 13917–13926.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2916-15.2015>

57. Kuhn B, Ozden I, Lampi Y, Hasan MT, Wang SS (2012) An amplified promoter system for targeted expression of calcium indicator proteins in the cerebellar cortex. *Front Neural Circuits* 6: 49. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00049>
58. Resendez SL, Jennings JH, Ung RL, Namboodiri VM, Zhou ZC, Otis JM, McHenry JA, Kosyk O, Stuber GD (2016) Visualization of cortical, subcortical and deep brain neural circuit dynamics during naturalistic mammalian behavior with head-mounted microscopes and chronically implanted lenses. *Nat Protoc* 11: 566–597. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.021>
59. Bedbrook CN, Deverman BE, Gradinaru V (2018) Viral Strategies for Targeting the Central and Peripheral Nervous Systems. *Annu Rev Neurosci* 41: 323–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-062048>
60. Haery L, Deverman BE, Matho KS, Cetin A, Woodard K, Cepko C, Guerin KI, Rego MA, Ersing I, Bachle SM, Kamens J, Fan M (2019) Adeno-Associated Virus Technologies and Methods for Targeted Neuronal Manipulation. *Front Neuroanat* 13: 93. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00093>
61. Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, Greenbaum A, Ravi N, Wu WL, Sanchez-Guardado L, Lois C, Mazmanian SK, Deverman BE, Gradinaru C (2017) Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* 20: 1172–1179. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>
62. Allen WE, Kauvar IV, Chen MZ, Richman EB, Yang SJ, Chan K, Gradinaru V, Deverman BE, Luo L, Deisseroth K (2017) Global Representations of Goal-Directed Behavior in Distinct Cell Types of Mouse Neocortex. *Neuron* 94: 891–907 e896. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.017>
63. Helmchen F, Imoto K, Sakmann B (1996) Ca^{2+} buffering and action potential-evoked Ca^{2+} signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* 70: 1069–1081. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79653-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79653-4)
64. Helmchen F, Borst JG, Sakmann B (1997) Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal. *Biophys J* 72: 1458–1471. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78792-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78792-7)
65. Yang Y, Liu N, He Y, Liu Y, Ge L, Zou L, Song S, Xiong W, Liu X (2018) Improved calcium sensor GCaMP-X overcomes the calcium channel perturbations induced by the calmodulin in GCaMP. *Nat Commun* 9: 1504. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03719-6>
66. Jurado LA, Chockalingam PS, Jrrett HW (1999) Apocalmodulin. *Physiol Rev* 79: 661–682. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.661>
67. Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, Cichon J, Harnett MT, Akerboom J, Gordus A, Renninger SL, Chen TW, Bargmann CI, Orger MB, Schreier ER, Demb JB, Gan WB, Hires SA, Looger LL (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods* 10: 162–170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2333>
68. Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science* 333: 1888–1891. <https://doi.org/10.1126/science.1208592>
69. Dana H, Mohar B, Sun Y, Narayan S, Gordus A, Hasseman JP, Tsegaye G, Holt GT, Hu A, Walpita D, Patel R, Macklin JJ, Bargmann CI, Ahrens MB, Schreier ER, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2016) Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12727>
70. Wu SY, Shen Y, Shkolnikov I, Campbell RE (2022) Fluorescent Indicators For Biological Imaging of Monatomic Ions. *Front Cell Dev Biol* 10: 885440. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.885440>
71. Shen Y, Wu SY, Rancic V, Aggarwal A, Qian Y, Miyashita SI, Ballanyi K, Campbell RE, Dong M (2019) Genetically encoded fluorescent indicators for imaging intracellular potassium ion concentration. *Commun Biol* 2: 18. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0269-2>

72. Helassa N, Podor B, Fine A, Torok (2016) Design and mechanistic insight into ultrafast calcium indicators for monitoring intracellular calcium dynamics. *Sci Rep* 6: 38276.
<https://doi.org/10.1038/srep38276>
73. Badura A, Sun XR, Giovannucci A, Lynch LA, Wang SS (2014) Fast calcium sensor proteins for monitoring neural activity. *Neurophotonics* 1: 025008.
<https://doi.org/10.1117/1.NPh.1.2.025008>
74. Bovetti S, Moretti C, Fellin T (2014) Mapping brain circuit function *in vivo* using two-photon fluorescence microscopy. *Microsc Res Tech* 77: 492–501.
<https://doi.org/10.1002/jemt.22342>
75. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11241–11246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11241>
76. Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3197–3202.
<https://doi.org/10.1073/pnas.051636098>
77. Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19: 137–141.
<https://doi.org/10.1038/84397>
78. Souslova EA, Belousov VV, Lock JG, Stromblad S, Kasparov S, Bolshakov AP, Pinelis V G, Labas YA, Lukyanov S, Mayr LM, Chudakov DM (2007) Single fluorescent protein-based Ca^{2+} sensors with increased dynamic range. *BMC Biotechnol* 7: 37.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-37>
79. Fletcher ML, Masurkar AV, Xing J, Imamura F, Xiong W, Nagayama S, Mutoh H, Greer C, Knopfel T, Chen WR (2009) Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol* 102: 817–830.
<https://doi.org/10.1152/jn.00020.2009>
80. Dombeck DA, Harvey CD, Tian L, Looger LL, Tank DW (2010) Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat Neurosci* 13: 1433–1440.
<https://doi.org/10.1038/nn.2648>
81. Akerboom J, Rivera JD, Guilbe MM, Malave EC, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreier ER (2009) Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem* 284: 6455–6464.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807657200>
82. Iseppon F, Linley JE, Wood JN (2022) Calcium imaging for analgesic drug discovery. *Neurobiol Pain* 11: 100083.
<https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2021.100083>
83. Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S, Nakai J, Kawakami K (2011) Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5425–5430.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000887108>
84. Chen Q, Cichon J, Wang W, Qiu L, Lee SJ, Campbell NR, Destefino N, Goard MJ, Fu Z, Yasuda R, Looger LL, Arenkiel BR, Gan WB, Feng G (2012) Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. *Neuron* 76: 297–308.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.011>
85. Ouzounov DG, Wang T, Wu C, Xu C (2019) GCaMP6 DeltaF/F dependence on the excitation wavelength in 3-photon and 2-photon microscopy of mouse brain activity. *Biomed Opt Express* 10: 3343–3352.
<https://doi.org/10.1364/BOE.10.003343>
86. Hires SA, Tian L, Looger LL (2008) Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. *Brain Cell Biol* 36: 69–86.
<https://doi.org/10.1007/s11068-008-9029-4>
87. Perez Koldenkova V, Nagai T (2013) Genetically encoded Ca^{2+} indicators: properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1787–1797.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.011>

88. Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, Imoto K, Nakai J (2005) Genetically encoded bright Ca^{2+} probe applicable for dynamic Ca^{2+} imaging of dendritic spines. *Anal Chem* 77: 5861–5869. <https://doi.org/10.1021/ac0506837>
89. Tallini YN, Ohkura M, Choi BR, Ji G, Imoto K, Doran R, Lee J, Plan P, Wilson J, Xin HB, Sanbe A, Gulick J, Mathai J, Robbins J, Salama G, Nakai J, Kotlikoff MI (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4753–4758. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509378103>
90. Sun XR, Badura A, Pacheco DA, Lynch LA, Schneider ER, Taylor MP, Hogue IB, Enquist LW, Murthy M, Wang SS (2013) Fast GCaMPs for improved tracking of neuronal activity. *Nat Commun* 4: 2170. <https://doi.org/10.1038/ncomms3170>
91. Shindo A, Hara Y, Yamamoto TS, Ohkura M, Nakai J, Ueno N (2010) Tissue-tissue interaction-triggered calcium elevation is required for cell polarization during *Xenopus* gastrulation. *PLoS One* 5: e8897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008897>
92. Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, Calderon NC, Esposti F, Borgehuis BG, Sun XR, Gordus A, Orger MB, Portugues R, Engert F, Macklin JJ, Filosa A, Aggarwal A, Kerr RA, Takagi R, Kracun S, Shigetomi E, Khakh BS, Baier H, Lagnado L, Wang SS, Bargmann CI, Kimmel BE, Jayaraman V, Svoboda K, Kim DS, Schreiter ER, Looger LL (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci* 32: 13819–13840. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012>
93. Dana H, Sun Y, Mohar B, Hulse BK, Kerlin AM, Hasseman JP, Tsegaye G, Tsang A, Wong A, Patel R, Macklin JJ, Chen Y, Konnerth A, Jayaraman V, Looger LL, Schreiter ER, Svoboda K, Kim DS (2019) High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nat Methods* 16: 649–657. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0435-6>
94. Zhang Y, Looger LL (2023) Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for neuronal imaging. *J Physiol* 10: 1113/JP283832. <https://doi.org/10.1113/JP283832>
95. Broussard GJ, Liang R, Tian L (2014) Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Front Mol Neurosci* 7: 97. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00097>
96. Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J (2012) Genetically encoded green fluorescent Ca^{2+} indicators with improved detectability for neuronal Ca^{2+} signals. *PLoS One* 7: e51286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051286>
97. Muto A, Ohkura M, Abe G, Nakai J, Kawakami K (2013) Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Curr Biol* 23: 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.040>
98. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538: 388–391. <https://doi.org/10.1038/nature19815>
99. Sakamoto M, Inoue M, Takeuchi A, Kobari S, Yokoyama T, Horigane SI, Takemoto-Kimura S, Abe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K, Fujii H, Bito H (2022) A Flp-dependent G-CaMP9a transgenic mouse for neuronal imaging in vivo. *Cell Rep Methods* 2: 100168. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100168>
100. Helassa N, Zhang XH, Conte I, Scaringi J, Esposito E, Bradley J, Carter T, Ogden D, Morad M, Torok K (2015) Fast-Response Calmodulin-Based Fluorescent Indicators Reveal Rapid Intracellular Calcium Dynamics. *Sci Rep* 5: 15978. <https://doi.org/10.1038/srep15978>
101. Ahrens MB, Li JM, Orger MB, Robson DN, Schier AF, Engert F, Portugues R (2012) Brain-wide neuronal dynamics during motor adaptation in zebrafish. *Nature* 485: 471–477. <https://doi.org/10.1038/nature11057>

102. Dunn TW, Mu Y, Narayan S, Randlett O, Naumann EA, Yang CT, Schier AF, Freeman J, Engert F, Ahrens M (2016) Brain-wide mapping of neural activity controlling zebrafish exploratory locomotion. *Elife* 5: e12741.
<https://doi.org/10.7554/eLife.12741>
103. Venkatachalam V, Ji N, Wang X, Clark C, Mitchell JK, Klein M, Tabone CJ, Florman J, Ji H, Greenwood J, Chisholm AD, Srinivasan J, Alkema M, Zhen M, Samuel AD (2016) Pan-neuronal imaging in roaming *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1082–E1088.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1507109113>
104. Nguyen JP, Shipley FB, Linder AN, Plummer GS, Liu M, Setru SU, Shaevitz JW, Leifer AM (2016) Whole-brain calcium imaging with cellular resolution in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1074–E1081.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1507110112>
105. Peters AJ, Chen SX, Komiyama T (2014) Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning. *Nature* 510: 263–267.
<https://doi.org/10.1038/nature13235>
106. Ziv Y, Burns L, Cocker ED, Hamel EO, Ghosh KK, Kitch LJ, El Gamal A, Schnitzer MJ (2013) Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. *Nat Neurosci* 16: 264–266.
<https://doi.org/10.1038/nn.3329>
107. Lovett-Barron M, Kaifosh P, Kheirbek MA, Danielson N, Zaremba JD, Reardon TR, Turi GF, Hen R, Zemelman BV, Losonczy A (2014) Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science* 343: 857–863.
<https://doi.org/10.1126/science.1247485>
108. Siegel F, Lohmann C (2013) Probing synaptic function in dendrites with calcium imaging. *Exp Neurol* 242: 27–32.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.007>
109. Kotlikoff MI (2007) Genetically encoded Ca²⁺ indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology. *J Physiol* 578: 55–67.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120212>
110. Diez-Garcia J, Matsushita S, Mutoh H, Nakai J, Ohkura M, Yokoyama J, Dimitrov D, Knopfel T (2005) Activation of cerebellar parallel fibers monitored in transgenic mice expressing a fluorescent Ca²⁺ indicator protein. *Eur J Neurosci* 22: 627–635.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04250.x>
111. Zariwala HA, Borghuis BG, Hoogland TM, Madisen L, Tian L, De Zeeuw CI, Zeng H, Looger LL, Svoboda K, Chen TW (2012) A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging *in vivo*. *J Neurosci* 32: 3131–3141.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4469-11.2012>
112. Paukert M, Agarwal A, Cha J, Doze VA, Kang JU, Bergles DE (2014) Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron* 82: 1263–1270.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.038>
113. O'Connor DH, Peron SP, Huber D, Svoboda K (2010) Neural activity in barrel cortex underlying vibrissa-based object localization in mice. *Neuron* 67: 1048–1061.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.026>
114. Huber D, Gutnisky DA, Peron S, O'Connor DH, Wiegert JS, Tian L, Oertner TG, Looger LL, Svoboda K (2012) Multiple dynamic representations in the motor cortex during sensorimotor learning. *Nature* 484: 473–478.
<https://doi.org/10.1038/nature11039>
115. Mittmann W, Wallace DJ, Czubayko U, Herb JT, Schaefer AT, Looger LL, Denk W, Kerr JN (2011) Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons *in vivo*. *Nat Neurosci* 14: 1089–1093.
<https://doi.org/10.1038/nn.2879>
116. Borghuis BG, Tian L, Xu Y, Nikonov SS, Vardi N, Zemelman BV, Looger LL (2011) Imaging light responses of targeted neuron populations in the rodent retina. *J Neurosci* 31: 2855–2867.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6064-10.2011>
117. Del Bene F, Wyart C, Robles E, Tran A, Looger L, Scott EK, Isacoff EY, Baier H (2010) Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit. *Science* 330: 669–673.
<https://doi.org/10.1126/science.1192949>

118. *Chiappe ME, Seelig JD, Reiser MB, Jayaraman V* (2010) Walking modulates speed sensitivity in *Drosophila* motion vision. *Curr Biol* 20: 1470–1475.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.072>
119. *Akerboom J, Carreras Calderon N, Tian L, Wabnig S, Prigge M, Tolo J, Gordus A, Orger MB, Severi KE, Macklin JJ, Patel R, Pulver SR, Wardill TJ, Fischer E, Schuler C, Chen T W, Sarkisyan KS, Marvin JS, Bargmann CI, Kim DS, Kugler S, Lagnado L, Hegemann P, Gottschalk A, Schreiter ER, Looger LL* (2013) Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci* 6: 2.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00002>
120. *Melom JE, Akbergenova Y, Gavornik JP, Littleton JT* (2013) Spontaneous and evoked release are independently regulated at individual active zones. *J Neurosci* 33: 17253–17263.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3334-13.2013>
121. *Cichon J, Gan WB* (2015) Branch-specific dendritic Ca(2+) spikes cause persistent synaptic plasticity. *Nature* 520: 180–185.
<https://doi.org/10.1038/nature14251>
122. *Sheffield ME, Dombeck DA* (2015) Calcium transient prevalence across the dendritic arbour predicts place field properties. *Nature* 517: 200–204.
<https://doi.org/10.1038/nature13871>
123. *Sun W, Tan Z, Mensh BD, Ji N* (2016) Thalamus provides layer 4 of primary visual cortex with orientation- and direction-tuned inputs. *Nat Neurosci* 19: 308–315.
<https://doi.org/10.1038/nn.4196>
124. *Aharoni D, Khakh BS, Silva AJ, Golshani P* (2019) All the light that we can see: a new era in miniaturized microscopy. *Nat Methods* 16: 11–13.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0266-x>
125. *Boyd AM, Kato HK, Komiyama T, Isaacson JS* (2015) Broadcasting of cortical activity to the olfactory bulb. *Cell Rep* 10: 1032–1039.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.047>
126. *Dana H, Chen TW, Hu A, Shields BC, Guo C, Looger LL, Kim DS, Svoboda K* (2014) Thy1-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging *in vivo*. *PLoS One* 9: e108697.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108697>
127. *Hinckley CA, Alaynick WA, Gallarda BW, Hayashi M, Hilde KL, Driscoll SP, Dekker JD, Tucker HO, Sharpee TO, Pfaff S* (2015) Spinal Locomotor Circuits Develop Using Hierarchical Rules Based on Motorneuron Position and Identity. *Neuron* 87: 1008–1021.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.005>
128. *Theis L, Berens P, Froudarakis E, Reimer J, Roman Roson M, Baden T, Euler T, Tolias A S, Bethge ER* (2016) Benchmarking Spike Rate Inference in Population Calcium Imaging. *Neuron* 90: 471–482.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.014>
129. *Heckscher ES, Zarin AA, Faumont S, Clark MQ, Manning L, Fushiki A, Schneider-Mizell CM, Fetter RD, Truman JW, Zwart M F, Landgraf M, Cardona A, Lockery SR, Doe CQ* (2015) Even-Skipped(+) Interneurons Are Core Components of a Sensorimotor Circuit that Maintains Left-Right Symmetric Muscle Contraction Amplitude. *Neuron* 88: 314–329.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.009>
130. *Grover D, Katsuki T, Greenspan RJ* (2016) Flyception: imaging brain activity in freely walking fruit flies. *Nat Methods* 13: 569–572.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3866>
131. *Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane SI, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, Takemoto-Kimura S, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H* (2019) Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics. *Cell* 177: 1346–1360 e1324.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.007>
132. *Mohr MA, Bushey D, Aggarwal A, Marvin JS, Kim JJ, Marquez EJ, Liang Y, Patel R, Macklin JJ, Lee CY, Tsang A, Tsegaye G, Ahrens AM, Chen JL, Kim DS, Wong AM, Looger LL, Schreiter ER, Podgorski K* (2020) jYCaMP: an optimized calcium indicator for two-photon imaging at fiber laser wavelengths. *Nat Methods* 17: 694–697.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-0835-7>

133. *Shcherbakova DM* (2021) Near-infrared and far-red genetically encoded indicators of neuronal activity. *J Neurosci Methods* 362: 109314.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109314>
134. *Qian Y, Piatkevich KD, Mc Larney B, Abdelfattah AS, Mehta S, Murdock MH, Gottschalk S, Molina RS, Zhang W, Chen Y, Wu J, Drobizhev M, Hughes TE, Zhang J, Schreiter ER, Shoham S, Razansky D, Boyden ES, Campbell RE* (2019) A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator. *Nat Methods* 16: 171–174.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0294-6>
135. *Shemetov AA, Monakhov MV, Zhang Q, Canton-Josh JE, Kumar M, Chen M, Matlashov ME, Li X, Yang W, Nie L, Shcherbakova DM, Kozorovitskiy Y, Yao J, Ji N, Verkhusha VV* (2021) A near-infrared genetically encoded calcium indicator for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 39: 368–377.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0710-1>
136. *Shen Y, Dana H, Abdelfattah AS, Patel R, Shea J, Molina R S, Rawal B, Rancic V, Chang YF, Wu L, Chen Y, Qian Y, Wiens MD, Hambleton N, Ballanyi K, Hughes TE, Drobizhev M, Kim DS, Koyama M, Schreiter ER, Campbell R E* (2018) A genetically encoded Ca(2+) indicator based on circularly permuted sea anemone red fluorescent protein eqFP578. *BMC Biol* 16: 9.
<https://doi.org/10.1186/s12915-018-0480-0>
137. *Sonoda K, Matsui T, Bito H, Ohki K* (2018) Astrocytes in the mouse visual cortex reliably respond to visual stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 505: 1216–1222.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.027>
138. *Bindocci E, Savtchouk I, Liaudet N, Becker D, Carrierio G, Volterra A* (2017) Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* 356.
<https://doi.org/10.1126/science.aai8185>
139. *Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M* (2000) Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* 1: 8–14.
<https://doi.org/10.1023/a:1011320027914>

GCaMP – a Family of Single-Fluorophore Genetically Encoded Calcium Indicators

A. I. Erofeev^{a, *}, E. K. Vinokurov^a, O. L. Vlasova^a, and I. B. Bezprozvanny^{a, b}

^a*Laboratory of molecular neurodegeneration, Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

^b*Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, United States of America*

**e-mail: alexandr.erofeew@gmail.com*

Single fluorophore genetically encoded calcium indicators (GECIs) such as GCaMP are widely utilized tools for investigating neuronal activity. Their primary advantage lies in their capacity to provide real-time and highly sensitive responses to fluctuations in intracellular calcium ion concentrations. This characteristic is of significant importance when studying neuronal processes and ensembles, wherein calcium signals play a crucial role in information transmission. This comprehensive review focuses on the GCaMP family, encompassing an analysis of their various types, distinctive features, and potential applications for visualizing neuronal activity. Special attention is dedicated to the ongoing advancements in GCaMP technology, particularly the endeavors to expand their spectral properties and enhance their capability to detect high-frequency spike activity.

Keywords: calcium indicators, neuronal activity, dynamics, fluorescence

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

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

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

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

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

*E-mail: mouse_gene@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

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

Стрессорные воздействия

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

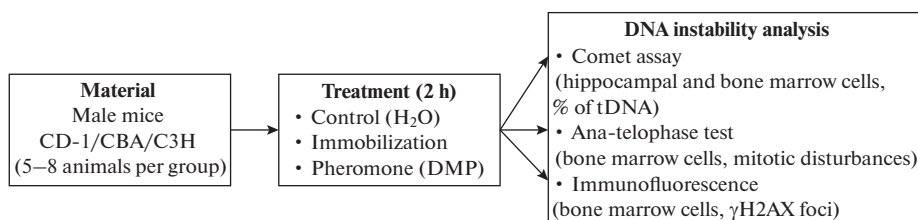


Рис. 1. Схема экспериментов по изучению влияния иммобилизации и феромонального стрессора на стабильность ДНК клеток гиппокампа и костного мозга самцов мышей трех линий (CD-1, CBA и C3H). DMP – 2,5-диметилпиразин; tDNA – tail DNA – ДНК в хвостах комет.

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

Щелочной кометный гель-электрофорез

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

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

фореза COMPAC-50 (Cleaver Scientific, Великобритания), добавляли щелочной буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, pH > 13) так, чтобы высота раствора над стеклами составила 1–2 мм, и оставляли на 20 мин без напряжения (при $t = 4^{\circ}\text{C}$). Электрофорез проводили при $t = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин при напряжении поля ~ 0.9 В/см и силе тока 500 мА. Использовали источник питания EPS-600 (C.B.S Scientific, США). После электрофореза стекла отмывали в PBS, помещали в кювету и заливали раствором для фиксации (70%-ный раствор этилового спирта). Фиксацию проводили в течение 15 мин. Микропрепараты высушивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Готовили по два препарата от каждого животного. Препараты шифровали, окрашивали 0.1%-ным раствором SYBR Green I (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин, а затем фотографировали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой CCD-камеры QIClick с программой QCapture Pro 7 (QImaging, США). Полученные изображения анализировали с помощью программы TriTreck CometScore™ Freeware v1.5 (TriTek, США). Объем проанализированного материала составил не менее 403 ядер клеток гиппокампа на каждое животное ($M \pm SEM = 418 \pm 3.3$). Для костного мозга аналогичная величина составила не менее 128 ядер на животное. Низкое качество нескольких препаратов (для одного животного было проанализировано всего 91 ядро) увеличило вариабельность. Тем не менее среднее количество ядер костного мозга на одно животное составило 330 ± 54 . Общее количество проанализированных ядер составило 6694 (для клеток гиппокампа) и 5129 (для клеток костного мозга).

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

Анализ нарушений митоза

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

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

Иммунофлуоресценция

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

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

Статистический анализ

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

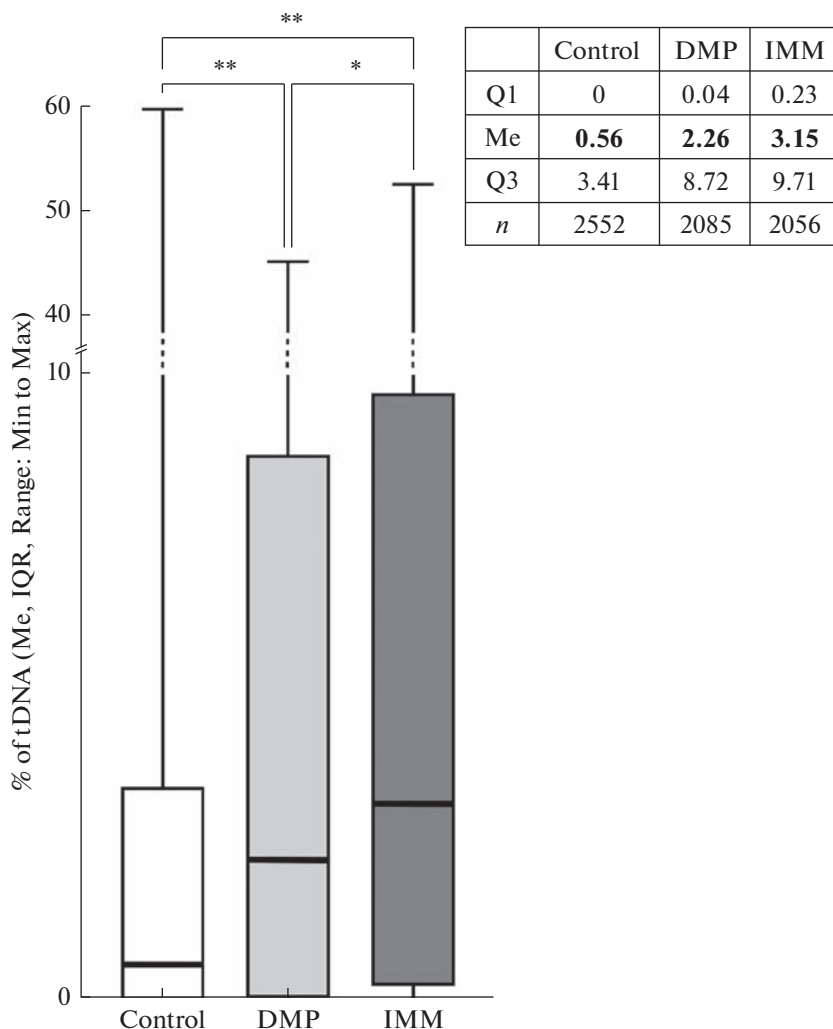


Рис. 2. Степень повреждения ДНК в клетках гиппокампа самцов мышей линии CD-1 после двухчасового воздействия: ольфакторного стрессора (DMP) или иммобилизации (IMM). Приведены точные значения медиан и границ второго и третьего квартилей. n — число проанализированных ядер; * и ** — различия достоверны (соответственно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

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

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

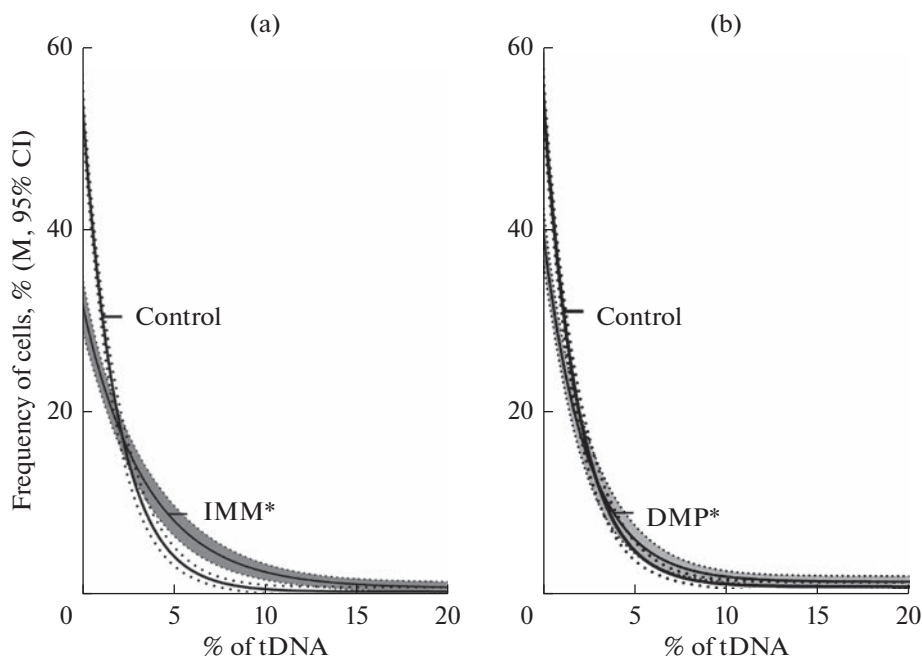


Рис. 3. Распределение частот клеток гиппокампа самцов мышей линии CD-1 после двухчасового воздействия: (а) – иммобилизации (IMM), (б) – ДМП (DMP). * – отличия от контроля достоверны ($p < 0.0001$, F-тест).

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

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

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

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

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

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

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

Вариант воздействия	<i>n</i>	Число проанализированных ана-телофаз:		Частота клеток с НМ (% , <i>M</i> ± <i>SEM</i>)	<i>p</i>
		нормальных	с НМ		
Линия СЗН					
Контроль	6	1200	32	2.60 ± 0.23	
ДМП	6	1200	60	4.76 ± 0.23	< 0.01*
ИММ	6	1200	54	4.31 ± 0.24	< 0.01*
Линия СВА					
Контроль	10	2000	61	2.96 ± 0.16	
ДМП	12	2400	114	4.53 ± 0.17	< 0.01*
ИММ	11	2200	102	4.43 ± 0.24	< 0.05*

* – точный критерий Фишера.

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

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

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

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

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

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

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

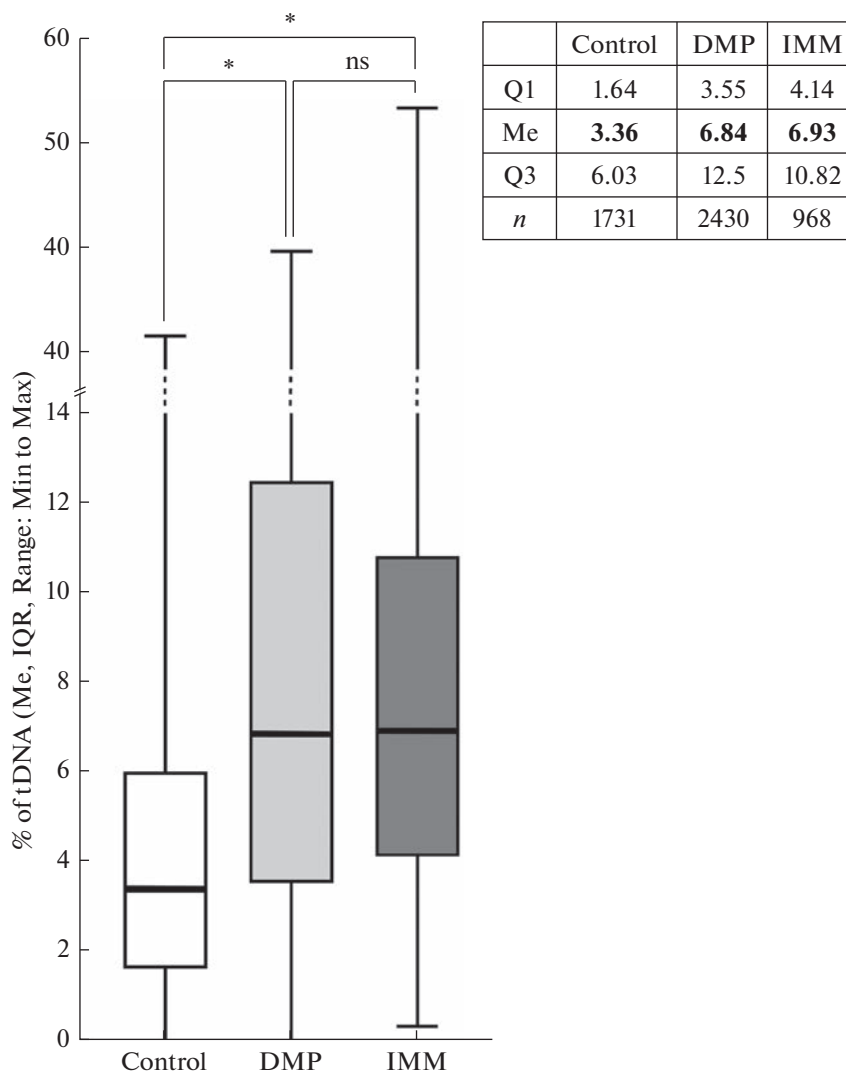


Рис. 4. Степень повреждения ДНК в клетках костного мозга самцов мышей линии СВА после двухчасового воздействия ольфакторного хемосигнала (DMP) или иммобилизации (IMM). Приведены точные значения медиан и границ второго и третьего квартилей. *n* – число проанализированных ядер; * – различия достоверны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

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

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

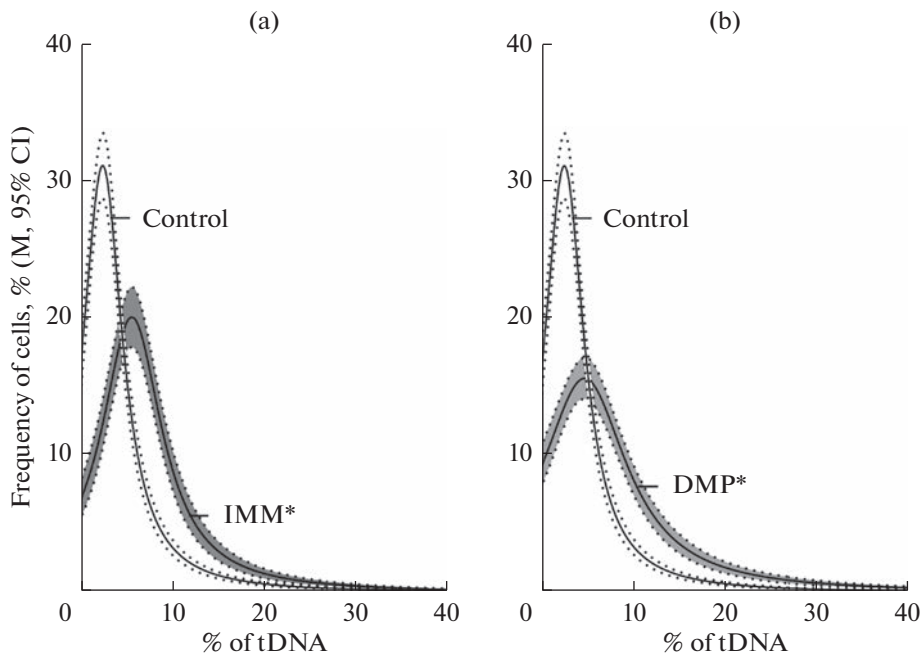


Рис. 5. Распределение частот клеток костного мозга самцов мышей линии СВА после двухчасового стрессорного воздействия: (а) — иммобилизации (ИММ), (б) — ДМП (DMP). * — достоверные отличия от контроля ($p < 0.0001$, F-тест).

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

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

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

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

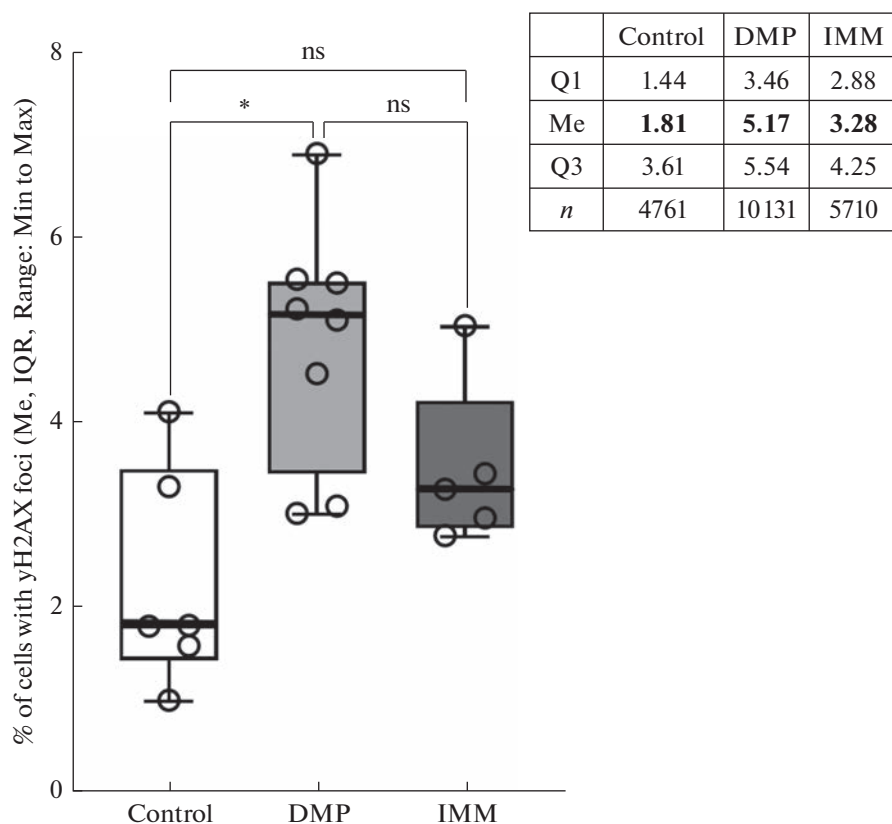


Рис. 6. Частоты клеток костного мозга с фокусами γH2AX гистонов у самцов мышей линии СВА после двухчасового воздействия ДМП (DMP) или иммобилизации (IMM). Приведены индивидуальные значения частот γH2AX-позитивных клеток для каждого животного, а также медианы и границы второго и третьего квартилей для каждой экспериментальной группы. *n* — число проанализированных ядер; * — отличия достоверны ($p < 0.01$, ANOVA с апостериорным тестом Тьюки); ns — not significant ($p > 0.05$).

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

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

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

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

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

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

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

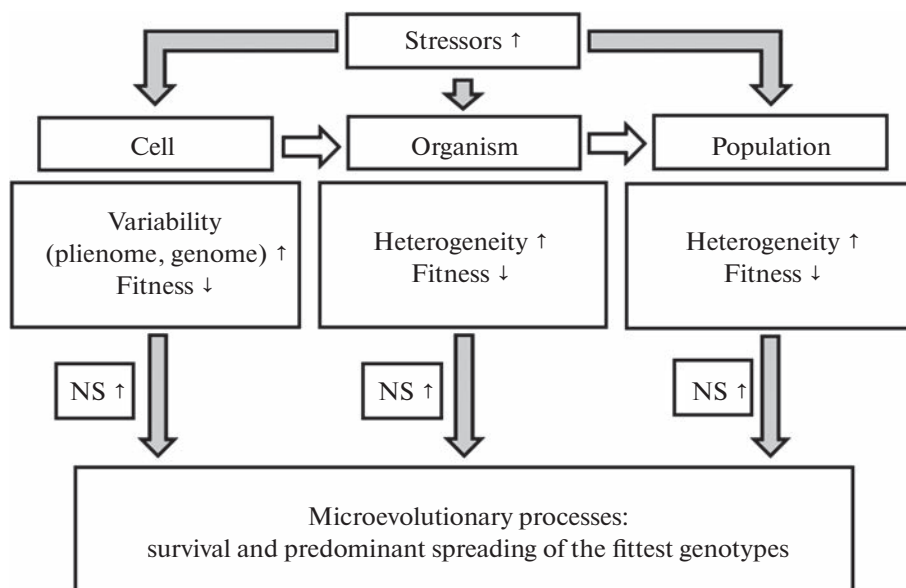


Рис. 7. Схематичное представление о роли стресса в регуляции микроэволюционных процессов. NS — natural selection (естественный отбор). Направление стрелок отмечает усиление или ослабление соответствующей характеристики.

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

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

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

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

БЛАГОДАРНОСТИ.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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

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

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

^aSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

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

*e-mail: mouse_gene@mail.ru

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

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА ХРОМОСОМНЫЙ
АППАРАТ ООЦИТОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ

© 2023 г. И. О. Боголюбова^{1, 2}, Д. С. Боголюбов^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: dbogol@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 19.05.2023 г.

Принята к публикации 25.05.2023 г.

Поздние вителлогенные ооциты травяной лягушки *Rana temporaria* представляют собой перспективную модель для изучения поведения мейотических хромосом, поскольку на стадии диплотены происходит объединение хромосом в кариосферу, которая у *R. temporaria*, как считают, имеет экстрахромосомную капсулу, — в отличие от *Xenopus laevis*, классического модельного объекта клеточной биологии и биологии развития. Однако по сравнению с *Xenopus* строгая сезонность размножения *R. temporaria* существенно ограничивает возможность использования ее ооцитов в качестве экспериментальной модели. Благодаря адаптации классических протоколов гормональной стимуляции бесхвостых амфибий, включая *Xenopus*, нам удалось получить ооциты *R. temporaria* с полностью развитой кариосферой вне сезона размножения (декабрь–январь). Выраженные изменения хромосомного аппарата ооцитов мы наблюдали при двукратном введении хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в дозе 500 МЕ. В этом случае хромосомы претерпевают выраженное уплотнение и агрегацию, что приводит к формированию характерного хромосомного “клубка” (кариосферы), морфологические признаки которого соответствуют таковым в ооцитах *R. temporaria* в начале естественного сезона размножения. Предлагаемый нами протокол использования ХГЧ для внесезонной стимуляции оогенеза у *R. temporaria* в дальнейшем может быть уточнен для получения более стабильных результатов и повышения качества ооцитов.

Ключевые слова: оогенез, ядро ооцита, зародышевый пузырек, хромосомный аппарат, кариосфера, хорионический гонадотропин человека, *Rana temporaria*

DOI: 10.31857/S0869813923070026, EDN: XUYXZF

ВВЕДЕНИЕ

Травяная лягушка *Rana temporaria* является весьма популярным объектом биологических исследований, на котором получен целый пласт данных в области физиологии, биологии развития, экологии. Несмотря на длительную историю использования этого животного в научных целях, изучение различных аспектов биологии *R. temporaria* в полной мере сохраняет свою актуальность и сегодня. Так,

Используемые сокращения: ЛГ-РГ — рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (люлиберин), ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; GV — зародышевый пузырек (ядро ооцита на стадии диплотены мейоза, germinal vesicle).

травяных лягушек продолжают активно использовать как объект экологических [1, 2] и физиологических исследований [3]. Однако, не умаляя значимости этого вида бесхвостых амфибий для решения задач экологического мониторинга и физиологии, следует отметить, что *R. temporaria* является также и классическим объектом биологии развития [4]. При этом ооциты *R. temporaria*, а точнее, их ядра на стадии диплотены мейоза (зародышевые пузырьки, GV) представляют собой уникальную биологическую систему, строение которой по ряду признаков при наличии общих черт отличается от GV другого модельного объекта — шпорцевой лягушки *Xenopus*.

В GV поздних вителлогенных ооцитов *R. temporaria* происходит формирование кариосферы — особой мейоз-специфической структуры, которая является результатом агрегации конденсированных и транскрипционно инактивированных хромосом (бивалентов) в ограниченной области GV [5]. Кариосфера описана у представителей 12 классов, принадлежащих к 4 типам беспозвоночных и позвоночных животных [6]. Она может иметь или не иметь специфической капсулы (karyosphere capsule), однако вариант кариосферы, в котором хромосомный материал окружен внешней экстрахромосомной капсулой, традиционно считают характерным для GV *R. temporaria* по данным световой [7, 8] и электронной микроскопии [9].

У *X. laevis*, в отличие от *R. temporaria*, хромосомы вителлогенных ооцитов не формируют компактного “клубка” (chromosomal knot), хотя и собираются в ограниченной области GV. По-видимому, они заключены только в конгломерат амплифицированных ядрышек (nucleolar cloud), но не ассоциированы с экстрахромосомным фибриллярным материалом [10], известным как “волоконистый компонент капсулы кариосферы” [11]. Вопрос о природе и функциях капсулы кариосферы, по существу, остается открытым, а ее существование у *R. temporaria* как стабильно-структурного скаффолда мейотических хромосом в последнее время подвергается сомнению [12].

Дальнейшее изучение GV поздних ооцитов *R. temporaria* с использованием современных методических возможностей, несомненно, позволит расширить наши представления об универсальных и видоспецифических закономерностях организации мейотических хромосом, в частности о взаимодействии хроматина и экстрахромосомных компартментов в процессе роста и созревания женских половых клеток.

Вместе с тем использование травяной лягушки в качестве модельного объекта для изучения ядерной компартментализации вителлогенных ооцитов, то есть получение GV с хромосомным аппаратом нужных стадий развития кариосферы, без применения гормональной стимуляции затруднено ограниченным по времени периодом размножения этого вида.

Считают, что в осенне-зимний период в GV травяной лягушки начинает формироваться капсула кариосферы, которая достигает, как и сама кариосфера, своего максимального развития поздней весной — перед овуляцией [8, 9]. Иными словами, ооциты с полностью сформированной кариосферой можно получить только в течение нескольких недель (на севере Ленинградской области и в Санкт-Петербурге обычно в апреле—начале мая в зависимости от погодных условий). Подобная ситуация существенно ограничивает возможности экспериментальной работы с поздними вителлогенными ооцитами и делает травяную лягушку мало подходящей для роли лабораторного объекта.

Эффективным способом решения этой проблемы является искусственная стимуляция оогенеза с помощью введения гонадотропных гормонов. Первые протоколы стимуляции овуляции у амфибий разных видов были опубликованы уже в классических руководствах по биологии развития [4]. Однако использование синтетических аналогов гонадотропных гормонов или рилизинг-факторов в этих исходных протоколах предусмотрено только для тепловодных бесхвостых амфибий, в первую очередь африканской шпорцевой лягушки *Xenopus*, для которой протоколы

гормональной стимуляции оогенеза давно апробированы и стандартизированы [13]. К настоящему времени опубликовано большое число работ по гормональной стимуляции для получения половых продуктов у амфибий тропических и умеренных широт [14–16], однако нам не удалось обнаружить современных работ, в которых бы была использована гормональная стимуляция именно самок *R. temporaria*.

Для стимуляции самок *R. temporaria* исходные протоколы предусматривали введение животным гомогенизированных гипофизов особей того же вида [4]. В настоящее время, при наличии доступных синтетических гормональных препаратов, подобный подход неприемлем по этическим соображениям, поскольку предполагает умерщвление большого количества особей. Кроме того, как классические, так и современные протоколы ориентированы на получение зрелых яйцеклеток, завершивших мейотическое деление и готовых к оплодотворению, а также препаратов хромосом — ламповых щеток из более молодых ооцитов. Данные о сроках формирования кариосферы в ооцитах *R. temporaria* после начала гормональной стимуляции и в целом о влиянии гормональной стимуляции на структурную организацию GV в литературе отсутствуют.

В связи с этим целью настоящей работы стала адаптация используемого для *Xenopus* протокола гормональной стимуляции овуляции с помощью синтетических аналогов хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) для получения вне сезона естественного размножения *R. temporaria* ооцитов, GV которых содержат позднюю кариосферу, а также анализ влияния экзогенного ХГЧ на состояние хромосомного аппарата ооцитов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Половозрелых самок травяной лягушки *Rana temporaria* L. отбирали из естественной среды обитания в окрестностях Санкт-Петербурга в октябре, до начала периода гибернации, и содержали в холодильнике при 4°C. Дважды в неделю лягушек промывали холодной водой.

Для стимуляции созревания ооцитов использовали хорионический гонадотропин человека (Хорулон, Интервет), который растворяли в 1 мл 0.65%-ного раствора NaCl и однократно или двукратно вводили в боковой лимфатический подкожный мешок. В случае двукратного введения гормона интервал между инъекциями составлял 24 ч. Контрольным животным вводили 0.65%-ный раствор NaCl в том же объеме и с той же периодичностью. После начала эксперимента лягушек содержали в отдельных аквариумах при комнатной температуре в условиях естественного освещения. Характерным внешним признаком животных, получавших гормон, вне зависимости от схемы стимуляции являлось изменение окраски тела, которое наблюдалось уже через 24 ч после первой инъекции и усиливалось в случае повторного введения гормона (рис. 1).

Животных выводили из эксперимента через 48 ч после первой или второй инъекции путем декапитации с немедленным последующим разрушением спинного мозга с обязательным контролем отсутствия спинномозговых рефлексов.

Яичники и ооциты изолировали в среде OR2 [17], содержащей 82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM Na₂HPO₄, 5.0 mM HEPES, pH ~ 7.8. Ядра ооцитов (GV) изолировали в растворе “5 : 1 + PO₄” [18], содержащем 83.0 mM KCl, 17.0 mM NaCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄, 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM DTT, pH 7.2. Визуализацию хроматина (кариосферы) проводили на свежеприготовленных нефиксированных препаратах изолированных GV в растворе “5 : 1 + PO₄” с добавлением DAPI в концентрации 0.5–1.0 мкг/мл с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss), оснащенного цифровой фотокамерой Axio-Cam ICm1. Для каждого животного было проанализировано не менее 10 ооцитов.

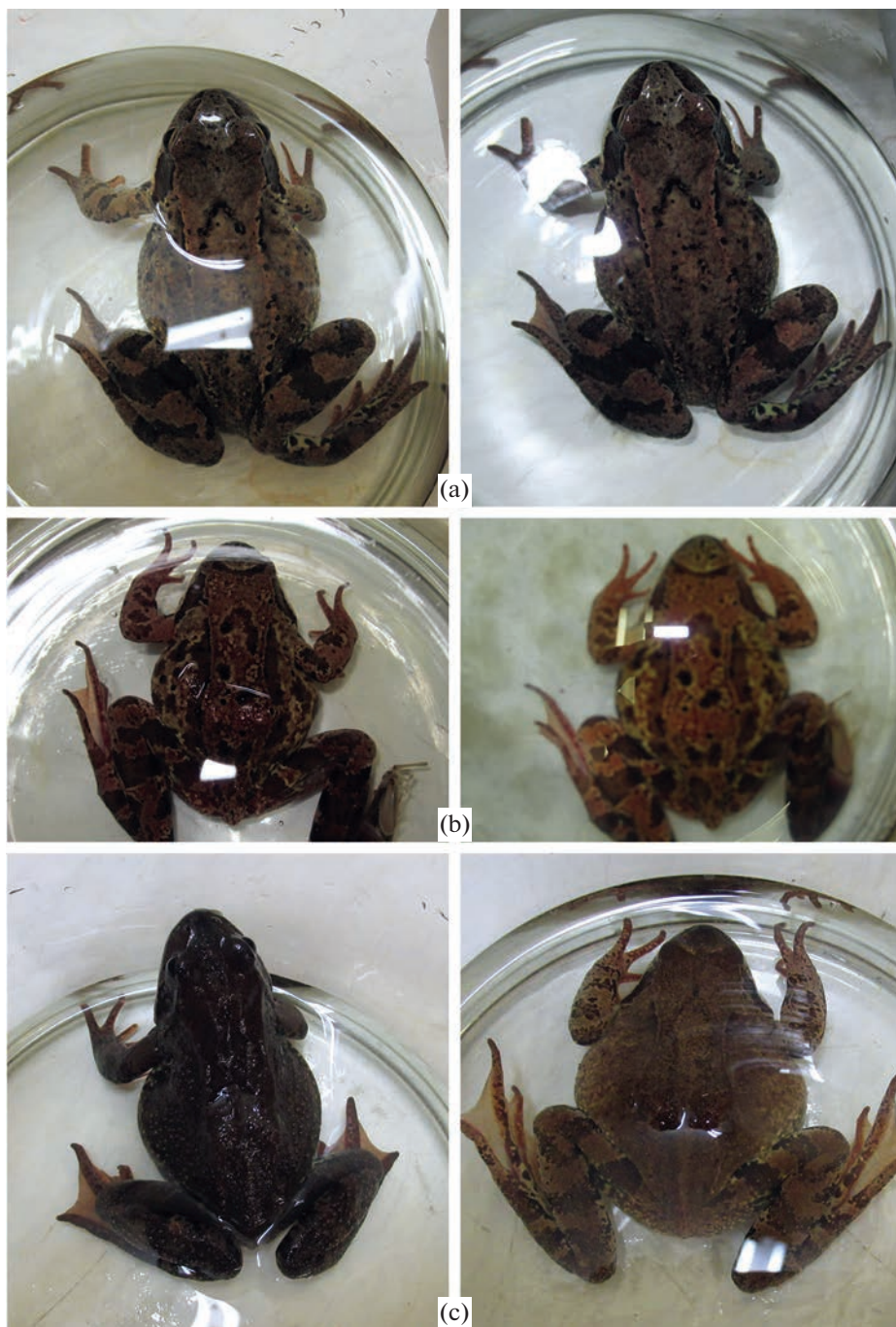


Рис. 1. Изменение окраски тела *Rana temporaria* после введения ХГЧ. Слева: лягушки до начала эксперимента, справа: перед выведением из эксперимента. (а) — контрольная особь, до и после двукратного введения 0.65%-ного NaCl; (б) — особь до и после двукратного введения 200 МЕ ХГЧ; (с) — особь до и после двукратного введения 500 МЕ ХГЧ.

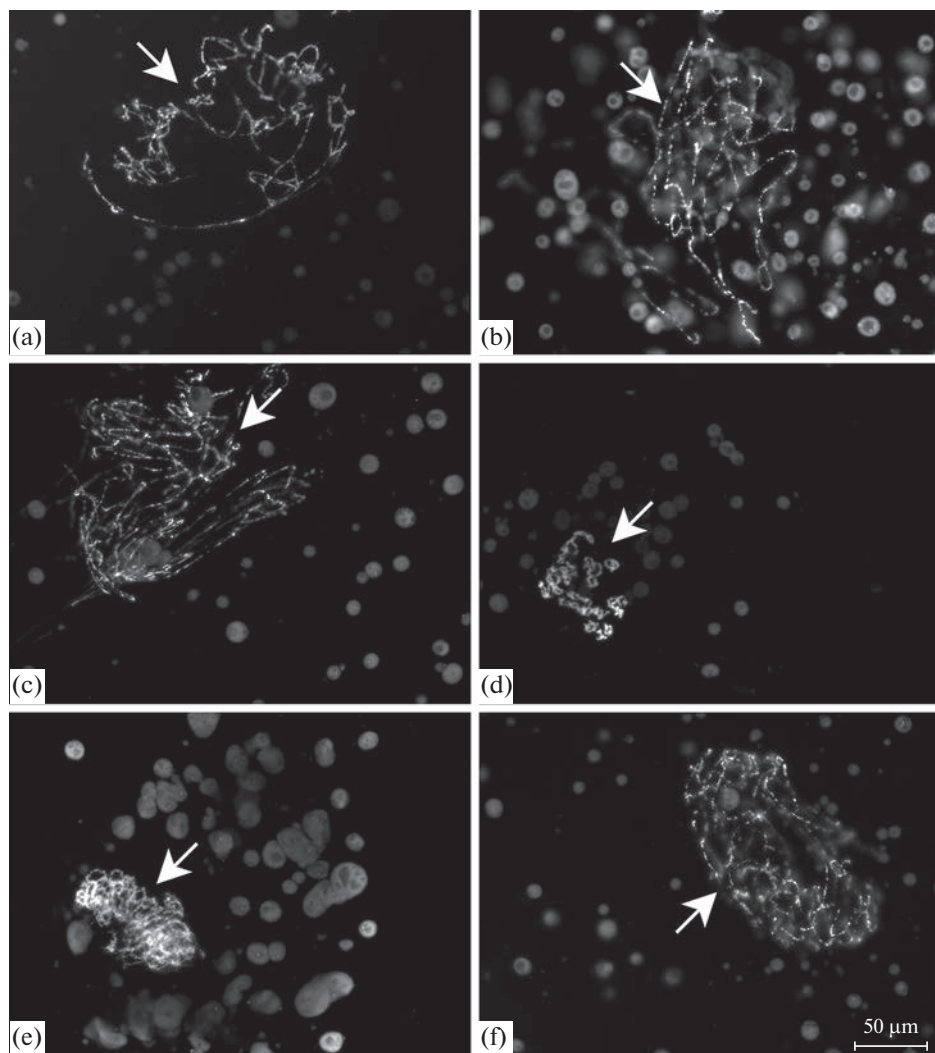


Рис. 2. Свежеприготовленные нефиксированные препараты хромосом ооцитов *Rana temporaria*. (a) — после двукратного введения лягушкам 0.65%-ного NaCl; (b) — после однократного введения 400 МЕ ХГЧ; (c) — после двукратного введения 200 МЕ ХГЧ; (d–f) — после двукратного введения 500 МЕ ХГЧ. Кариосфера (клубок хромосом среди амплифицированных ядрышек) указана стрелками. Окраска DAPI.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика изменения хромосомного аппарата вителлогенных ооцитов *R. temporaria*, тесно связанная с сезонностью размножения этого вида бесхвостых амфибий [7], подробно описана и проиллюстрирована в классической работе Дюрьи [19]. Для ооцитов, извлеченных у самок осенью, характерны начальные этапы формирования кариосферы, когда хромосомы уже демонстрируют отчетливую тенденцию к агрегации и локализуются в относительно ограниченной области GV, однако процессы их конденсации еще слабо выражены и кариосфера представляет собой весьма рыхлый клубок [20]. Подобную картину мы наблюдали в ооцитах контрольных животных (рис. 2a), где присутствовали рыхло расположенные хромосомы с

четко распознаваемыми бивалентами, на которых хорошо выражены хромомеры. Такие же морфологические признаки характеризовали состояние хромосомного аппарата (кариосферы) в *GV R. temporaria* как при однократном введении ХГЧ в дозе 400 МЕ (рис. 2b), так и при двукратном введении ХГЧ в дозе 200 МЕ (рис. 2c). Очевидно, что использование ХГЧ в данной дозировке является недостаточным для стимуляции созревания ооцитов, хотя и приводит к изменению окраски тела животных (рис. 1b).

Иная картина была характерна для ооцитов при двукратном введении ХГЧ в дозе 500 МЕ. В этом случае наблюдали выраженное уплотнение и агрегацию хромосом (рис. 2d), что приводило к формированию компактного хромосомного “клубка”, характерного для стадии VI по классификации Дюрьи [19]; такое состояние кариосферы характеризует *GV R. temporaria* в начале сезона их размножения. На данной стадии развития вителлогенных ооцитов уже не выявляются хромомеры, биваленты представлены конденсированными “пост-ламповыми щетками” (post-lampbrushes), утратившими латеральные петли. У некоторых особей в этой экспериментальной группе наблюдали еще более выраженную агрегацию хромосом, нежели описано Дюрьи для стадии VI (рис. 2e), когда становится сложно визуализировать отдельные биваленты в составе агрегата хромосом. Кстати, в исторической работе Вагнера [7] такая картина представлена, в то время как Дюрьи [19] считал, что стадия VI завершает период роста ооцита *R. temporaria*.

В то же время у отдельных особей *R. temporaria*, стимуляцию которых проводили с использованием той же схемы (двукратное введение 500 МЕ ХГЧ), процессы агрегации хромосом были выражены в меньшей степени и картин распределения хромосом, характерных для стадии VI по Дюрьи, не наблюдали (рис. 2f). В этом случае во всех ооцитах хромомеры бивалентов были хорошо различимы, некоторое утолщение хромосом наблюдали только в 30% *GV*. В 70% ооцитов, полученных от таких особей, состояние хромосом соответствовало стадии IV по Дюрьи, 30% — стадии V. Однако даже в этих случаях для всех проанализированных ооцитов было характерно более упорядоченное и компактное расположение хромосом, нежели наблюдаемое у контрольных особей или при использовании неэффективных схем стимуляции. По-видимому, такие картины можно расценивать как первые признаки процессов агрегации и компактизации хромосом, что в дальнейшем приведет к формированию компактной кариосферы. В целом картину, наблюдаемую в ядрах ооцитов отдельных особей *R. temporaria* при подобной схеме стимуляции и не укладывающуюся в классическую классификацию Дюрьи, можно охарактеризовать как “клубок тонких нитей”.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование гонадотропных гормонов для стимуляции созревания яйцеклеток у бесхвостых амфибий имеет уже почти столетнюю историю. В 1933 г. Беллерби [21] впервые сообщил о том, что инъекция кислого или щелочного экстракта передней доли гипофиза быка самкам лягушки *X. laevis* вызывает откладку яйцеклеток через 18 ч. В последующих исследованиях этот эффект гонадотропинов млекопитающих на репродуктивные функции бесхвостых амфибий был подтвержден, а также были дополнительно охарактеризованы видоспецифические особенности гонадотропинов в различных парах донор—реципиент [22]. В настоящее время для решения прикладных задач, связанных с воспроизводством редких видов амфибий, используются синтетические аналоги рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона и ХГЧ, однако эффективные дозы гормональных препаратов, как правило, подбираются методом проб и ошибок и могут существенно различаться у разных видов [23].

Для стимуляции оогенеза *R. temporaria* мы использовали ХГЧ. Следует отметить, что в настоящее время более широкое использование для стимуляции размножения амфибий получил сурфагон, который обладает рядом преимуществ (отсутствие выраженной видоспецифичности, безопасность, невысокая стоимость), однако синтетические гонадотропины также применяются в протоколах гормональной стимуляции амфибий [16], по некоторым данным преимущественно для лабораторных исследований [23]. Нам не удалось найти в литературе протоколов стимуляции *R. temporaria* с использованием синтетических препаратов ХГЧ, поэтому мы взяли за основу классический протокол, разработанный для *Xenopus* [4, 24], который предусматривает однократное введение ХГЧ в дозе от 100 до 600 МЕ в зависимости от размера лягушки. После однократного введения 400 МЕ ХГЧ мы не наблюдали изменений состояния хромосом ооцитов по сравнению с контрольными животными, то есть стандартная схема стимуляции *Xenopus* оказалась неэффективной в случае *R. temporaria*. Наиболее вероятно, что это обусловлено эколого-физиологическими особенностями травяной лягушки, в первую очередь четко выраженной сезонностью размножения и наличием длительного периода гибернации.

В литературе имеются данные о том, что для стимуляции *Xenopus* в июне–июле, когда шпорцевые лягушки в природе не размножаются, требуются большие дозы гормонов [24]. Кроме того, значимым фактором, определяющим особенности искусственной стимуляции оогенеза *R. temporaria*, могут быть температурные условия содержания этих амфибий. До начала эксперимента лягушек содержали при 4°C, после введения ХГЧ — при комнатной температуре, тогда как рекомендуемая температура воды для *Xenopus* составляет 22–25°C [13]. Можно полагать, что эти факторы в определенной степени определяют необходимость увеличения дозы ХГЧ при стимуляции *R. temporaria*.

Необходимость добавления в схему стимуляции *R. temporaria* повторного введения ХГЧ была в определенной степени ожидаемой, учитывая перечисленные выше эколого-физиологические особенности травяной лягушки и проведение экспериментов вне сезона размножения. В связи с этим следует также отметить, что ХГЧ довольно часто не вызывает эффекта у амфибий [25, 26] и требует дополнительных (праймирующих) инъекций гормональных препаратов, как показано, например, для самок вайомингской жабы *Anaxyrus baxteri* — редкого вида амфибий, обитающего лишь в неволе и в пределах одного национального парка США. Эти животные не реагировали на ХГЧ без предварительного введения праймирующей смеси ЛГ-РГ и ХГЧ [27].

Выраженные эффекты ХГЧ на состояние хромосомного аппарата ооцитов *R. temporaria* мы наблюдали при двукратном введении ХГЧ в дозе 500 МЕ. Для оценки степени агрегации хромосом мы использовали такие критерии, как толщина хромосом, наличие видимых хромомеров, наличие идентифицируемых бивалентов, а также компактность локализации хромосом. При использовании данной схемы стимуляции наблюдали уменьшение площади, занимаемой хромосомами, утолщение хромосом и исчезновение хромомеров. В некоторых случаях было невозможно визуализировать отдельные биваленты, которые агрегировали в плотный клубок. Отметим, что в подобных случаях степень агрегации хромосом была выше, нежели в случае стадии VI развития кариосферы, которая была описана Дюрьи [19] для ооцитов *R. temporaria* непосредственно перед откладкой икры. Таким образом, у некоторых особей двукратное введение ХГЧ приводило к “гиперагрегации” хромосом. Напротив, при использовании этой же схемы стимуляции у отдельных особей признаки агрегации хромосом в ооцитах были выражены слабее, что может объясняться индивидуальными особенностями реакции животных на гормон. Меньшие дозы гормонов (200 МЕ) даже при двукратном введении не оказывали влияния на состояние кариосферы.

Таким образом, ХГЧ может использоваться для стимуляции созревания ооцитов *R. temporaria in vivo*, в частности для получения ооцитов с полностью сформированной кариосферой. Тем не менее, предлагаемый нами протокол требует дальнейшего уточнения для получения более стабильных результатов и повышения качества ооцитов. В частности, перспективным направлением нам представляется включение в схему стимуляции прогестерона, который традиционно используется для созревания ооцитов амфибий *in vitro* [4]. В литературе также имеются данные об эффективности включения прогестерона в протоколы стимуляции бесхвостых амфибий. Хотя сам по себе прогестерон не вызывает овуляцию даже при повторных введениях, он существенно повышает эффективность стимуляции овуляции у *Anaxyrus fowleri* при совместном использовании с ЛГ-РГ [28].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации, рекомендациям по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке РФФИ, и позиции Комитета по этике при работе с животными Института цитологии РАН (лицензия F18-00380). В исследовании не использовали исчезающие или охраняемые виды, все образцы были собраны за пределами охраняемых природных территорий. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00380).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Д.С.Б.), планирование эксперимента, получение, анализ интерпретация данных для работы (И.О.Б.), написание манускрипта (И.О.Б.), редактирование статьи, согласие нести ответственность за все аспекты работы, а также гарантии того, что все вопросы по достоверности и надежности любой части работы надлежащим образом проанализированы и решены (Д.С.Б.), одобрение финальной версии статьи, подлежащей публикации (И.О.Б., Д.С.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaurova SA, Shvirst NE, Shishova NV, Uteshev VK, Fesenko EE (2021) Influence of xenon on survival of sperm of common frog *Rana temporaria* during slow freezing. Bull Exp Biol Med 171: 596–600.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05276-3>
2. Ruthsatz K, Bartels F, Stützer D, Eterovick PC (2022) Timing of parental breeding shapes sensitivity to nitrate pollution in the common frog *Rana temporaria*. J Therm Biol 108: 103296.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103296>
3. Karanova MV (2021) Low-temperature adaptation of the *Rana temporaria* gastrocnemius muscle at the onset of anabiosis. J Evol Biochem Physiol 57(2): 165–171.
4. Объекты биологии развития (1975) М. Наука. [[Objects of Developmental Biology] (1975) M. Nauka]. (In Russ)].

5. *Bogolyubov DS* (2018) Karyosphere (karyosome): a peculiar structure of the oocyte nucleus. *Int Rev Cell Mol Biol* 337: 1–48.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.001>
6. *Gruzova MN, Parfenov VN* (1993) Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. *Int Rev Cytol* 144: 1–52.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61512-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61512-0)
7. *Wagner K* (1923) Über die Entwicklung des Froscheies. *Arch Zellforsch* 17: 1–44.
8. *Gruzova MN, Parfyonov VN* (1973) The karyosphere in late oogenesis of frogs. *Monit Zool Ital* 7: 225–242.
<https://doi.org/10.1080/00269786.1973.107362>
9. *Gruzova MN, Parfenov VN* (1977) Ultrastructure of late oocyte nuclei in *Rana temporaria*. *J Cell Sci* 28: 1–13.
<https://doi.org/10.1242/jcs.28.1.1>
10. *Dumont JN* (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153–179.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>
11. *Почукалина ГН, Парфенов ВН* (1994) Организация кариосферы с капсулой перед созреванием ооцитов травяной лягушки. *Цитология* 36: 1027–1034. [*Pochukalina GN, Parfenov VN* (1994) Organization of karyosphere with the capsule in oocytes of *Rana temporaria* before maturation. *Tsitologiya* 36: 1027–1034. (In Russ)].
12. *Bogolyubov DS, Travina AO, Bogolyubova IO* (2022) Karyosphere capsule in oocytes of the grass frog: to be or not to be? A critical view. *Cell Tiss Biol* 16: 521–539.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X22060013>
13. *Callan HG, Gall JG, Berg CA* (1987) The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis*: preparation, identification, and distribution of 5S DNA sequences. *Chromosoma* 95: 236–250.
<https://doi.org/10.1007/BF00294780>
14. *Кидов АА, Матушкина КА, Блинова СА, Африн КА, Коврина ЕГ, Бакшеева АА* (2015) Размножение гирканской лягушки (*Rana macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidtler, 1971) в лабораторных условиях. *Совр герпетол* 15: 109–113. [*Kidov AA, Matushkina KA, Blianova SA, Afrin KA, Kovrina EG, Baksheeva AA* (2015) Reproduction of the Iranian long-legged frog (*Rana macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidtler, 1971) in laboratory conditions. *Sovr Herpetol* 15: 109–113. (In Russ)].
15. *Утешев ВК, Гахова ЭН, Крамарова ЛИ, Шишова НВ, Каурова СА* (2019) Новые подходы к получению репродуктивного материала амфибий для его использования в искусственном оплодотворении. *Совр герпетол* 19: 46–55. [*Uteshev VK, Gakhova EN, Kramarova LI, Shishova NV, Kaurova SA* (2019) New approaches to collecting reproductive material from amphibians for its use in artificial fertilization. *Sovr Herpetol* 19: 46–55. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>
16. *Uteshev VK, Gakhova EN, Kramarova LI, Shishova NV, Kaurova SA, Kidova EA, Kidov AA, Browne RK* (2023) Russian collaborative development of reproduction technologies for the sustainable management of amphibian biodiversity. *Asian Herpetol Res* 14: 103–115.
<https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.220043>
17. *Wallace RA, Jared DW, Dumont JN, Segal MW* (1973) Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. *J Exp Zool* 184: 321–333.
<https://doi.org/10.1002/jez.1401840305>
18. *Gall JG, Stephenson EC, Erba HP, Diaz MO, Barsacchi-Pilone G* (1981) Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 84: 159–171.
<https://doi.org/10.1007/BF00399128>
19. *Duryee WR* (1950) Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. *Ann N Y Acad Sci* 50: 920–953.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1950.tb39892.x>
20. *Цветков АГ, Парфенов ВН* (1994) Сезонные преобразования хромосом-ламповых шеток и морфогенез капсулы кариосферы в ооцитах травяной лягушки, выявляемые при анализе выделенных ядерных структур. *Цитология* 36: 64–70. [*Tsvetkov AG, Parfenov VN* (1994) Transformation of lampbrush chromosomes and morphogenesis of the karyosphere capsule in diplotene oocytes of *Rana temporaria* (seasonal changes observed in isolated nuclear structures). *Tsitologiya* 36: 64–70. (In Russ)].
21. *Bellerby CW* (1933) The endocrine factors concerned in the control of the ovarian cycle: *Xenopus laevis* as a test animal. *Biochem J* 27: 615–620.
<https://doi.org/10.1042/bj0270615>
22. *Creaser CW, Gorbman A* (1939) Species specificity of the gonadotropic factors in vertebrates. *Quart Rev Biol* 14: 311–331.
23. *Kouba AJ, Vance CK, Willis EL* (2009) Artificial fertilization for amphibian conservation: Current knowledge and future considerations. *Theriogenology* 71: 214–227.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.055>

24. Wolf DP, Hedrick JL (1971) A molecular approach to fertilization: II. Viability and artificial fertilization of *Xenopus laevis* gametes. Dev Biol 25: 348–359.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(71\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(71)90036-4)
25. Гончаров БФ, Сербинова ИА, Утешев ВК, Шубравый ОИ (1989) Разработка методов гормональной стимуляции процессов размножения у амфибий. В сб.: Проблемы доместикации амфибий. М. ИЭМЭЖ. 197–201. [Goncharov BF, Serbinova IA, Uteshev VK, Shubravoy OI (1989) Development of methods for hormonal stimulation of reproductive processes in amphibians. In: Problems of domestication of amphibians. M. AN Severtsov Inst Ecol Evol 197–201. (In Russ)].
26. Arregui L, Diaz-Diaz S, Alonso-López E, Kouba AJ (2019) Hormonal induction of spermiation in a Eurasian bufonid (*Epidalea calamita*). Reprod Biol Endocrinol 17: 92.
<https://doi.org/10.1186/s12958-019-0537-0>
27. Browne RK, Seratt J, Vance C, Kouba A (2006) Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). Reprod Biol Endocrinol 4: 34.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-34>
28. Browne RK, Li H, Seratt J, Kouba A (2006) Progesterone improves the number and quality of hormone induced Fowler toad (*Bufo fowleri*) oocytes. Reprod Biol Endocrinol 4: 3.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-3>

Influence of Hormonal Stimulation on the Oocyte Chromosome Apparatus of the Common Frog

I. O. Bogolyubova^{a, b}, and D. S. Bogolyubov^{a, *}

^aInstitute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^bSt. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: dbogol@mail.ru

Late vitellogenic oocytes of the common frog, *Rana temporaria*, represent a promising model for studying the behavior of meiotic chromosomes, since at the diplotene stage, they unite into a karyosphere, which in *R. temporaria* is believed to have an extrachromosomal capsule — unlike in *Xenopus laevis*, a classic model object of cell biology and developmental biology. However, in comparison with *Xenopus*, the strict breeding seasonality of *R. temporaria* significantly limits the possibility of using its oocytes as an experimental model. By adapting classical hormonal stimulation protocols proposed for anurans including *Xenopus*, we were able to obtain *R. temporaria* oocytes with a fully developed karyosphere outside the breeding season, namely in December–January. We observed pronounced changes in the chromosomal apparatus of oocytes with a double injection of human chorionic gonadotropin (hCG) at a dose of 500 IU. In this case, chromosomes undergo compaction and aggregation, leading to the formation of a characteristic chromosomal “knot” (karyosphere), the morphological features of which corresponded to those in *R. temporaria* oocytes at the beginning of the natural breeding season. Based on the proposed protocol for the use of hCG for out-of-season stimulation of oogenesis in *R. temporaria*, it can be further refined to obtain more stable results and improve the quality of oocytes.

Keywords: oogenesis, oocyte nucleus, germinal vesicle, chromosomal apparatus, karyosphere, human chorionic gonadotropin, *Rana temporaria*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВКЛАД АКТИВНОСТИ SERCA В ИЗМЕНЕНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ
ХАРАКТЕРИСТИК *M. SOLEUS* КРЫС ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ**

© 2023 г. К. А. Шарло¹, И. Д. Львова¹, С. А. Тыганов¹, К. А. Зарипова¹,
С. П. Белова¹, Т. Л. Немировская^{1, *}

¹Институт медико-биологических проблем, Москва, Россия

*E-mail: Nemirovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 05.05.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Нарушение функций скелетных мышц и их атрофия при функциональной разгрузке сопровождаются накоплением избыточного кальция в миоплазме мышечных волокон. Мы предположили, что накопление кальция может происходить, кроме прочих механизмов, из-за ингибирования работы Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) при разгрузке мышц. В этом случае применение активатора SERCA будет снижать уровень кальция в миоплазме и предотвращать последствия функциональной разгрузки. Самцы крыс были распределены на 3 группы — виварный контроль с введением плацебо (C, $n = 8$), группа 7-суточного вывешивания с введением плацебо (7HS, $n = 8$) и группа 7-суточного вывешивания с введением внутрибрюшинно активатора SERCA CDN1163 (50 мг/кг (7HS+CDN), $n = 8$). Одну *m. soleus* каждой крысы замораживали в жидком азоте, вторую тестировали на функциональные свойства. В группе 7HS обнаружили повышенную утомляемость *soleus* в тесте *ex vivo*, существенное увеличение мРНК и количества быстрых мышечных волокон, рост уровня кальций-зависимого фосфорилирования CaMK II и уровня окисления тропомиозина, а также снижение содержания митохондриальной ДНК и белка. Все эти изменения были предотвращены в группе с введением активатора SERCA CDN1163. Вывод: 7-суточное введение активатора SERCA предотвращает снижение индекса утомления *m. soleus*, вероятно, за счет предотвращения снижения количества волокон I типа и маркеров митохондриального биогенеза. Введение активатора SERCA не замедляет развития атрофии *m. soleus*.

Ключевые слова: функциональная разгрузка *m. soleus*, атрофия, утомляемость *m. soleus*, типы мышечных волокон, NFATC1, митохондриальная ДНК, митофунгин ½

DOI: 10.31857/S0869813923070117, **EDN:** XILLSY

ВВЕДЕНИЕ

При длительной гипокинезии, гравитационной разгрузке, иммобилизации конечности, а также при длительном лишении человека обычной двигательной активности скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате нарушения баланса между синтезом и деградацией белка. Параллельно с развитием атрофических процессов при функциональной разгрузке в мышцах снижается содержание митохондриальных белков и ДНК [1–3], и происходит изменение паттерна экспрессии миозиновых генов, что ведет к повышению доли “быстрых” гликолитических во-

локон, обладающих слабой устойчивостью к утомлению [4–7]. В результате происходит снижение работоспособности мышц.

При ряде моделей функциональной разгрузки скелетных мышц было обнаружено повышение уровня кальция в миоплазме [8–10]. Этот эффект связывают с нарушением функций Na,K-АТФазы и деполяризацией сарколеммы на ранних этапах разгрузки, которое приводит к активации дигидропиридиновых каналов и входу кальция в миоплазму через рианодиновые рецепторы [11]. Избыточное накопление кальция в миоплазме наблюдается также при ряде патологических состояний скелетных мышц, например, при миодистрофии Дюшенна и при старении [12, 13]. Высокий уровень кальция в миоплазме может способствовать активации кальций-зависимых протеаз кальпаинов, что ведет к усилению протеолиза [12, 13], а также провоцировать нарушение функций митохондрий [14]. Нарушение кальциевого гомеостаза в скелетной мышце также приводит к изменениям в экспрессии генов, включая маркеры протеолиза и гены, определяющие тип мышечного волокна (“быстрый” или “медленный”) [15, 16].

Известно, что ключевую роль в удалении кальция из миоплазмы играет SERCA (Ca^{2+} -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума), которая откачивает ионы кальция из миоплазмы в саркоплазматический ретикулум (СПР). В условиях функциональной разгрузки скелетных мышц функция SERCA нарушается. Обнаружено снижение интенсивности закачивания ионов кальция в СПР на фоне иммобилизации мышц и денервации [17]. Ранее также показано, что в условиях функциональной разгрузки мышц наблюдается изменение паттерна экспрессии изоформ SERCA, что может приводить к изменениям в перераспределении ионов кальция между СПР и миоплазмой [18–20].

Избыточное накопление кальция в миоплазме способно также приводить к накоплению активных форм кислорода, которые, в свою очередь, нарушают функционирование рианодиновых каналов, что ведет к истощению кальциевого депо СПР и повышению утомляемости мышц; данный механизм был описан для условий старения, а также для трансгенных животных [21–25]. Поскольку в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц также наблюдается избыточное накопление кальция и активных форм кислорода в миоплазме [26, 27], нельзя исключать, что кальций-зависимые процессы вносят вклад в повышение утомляемости и в этих условиях. Это подтверждается и недавней работой, где обнаружено функциональное взаимодействие между SERCA и митохондриальным окислительным фосфорилированием [28]. В этой работе также показано предотвращение развития утомления *m. soleus* при введении мышам пищевого нитрата в качестве активатора SERCA.

Мы предположили, что при функциональной разгрузке в камбаловидной мышце происходит снижение функций SERCA, что может быть причиной избыточного накопления ионов кальция в миоплазме. В свою очередь, кальций активирует сигнальные пути, запускающие процессы протеолиза и трансформации миоинового фенотипа в “быструю” сторону, и способствует снижению устойчивости мышцы к утомлению. Камбаловидная мышца принимает участие в ходьбе и беге, у человека она отвечает за поддержание вертикального положения тела в пространстве и является особенно подверженной негативным изменениям, происходящим при функциональной разгрузке, поэтому эта мышца была выбрана для исследования в данной работе [29].

Для проверки гипотезы о роли снижения активности SERCA при ограничении функциональной активности мышц в регуляции клеточных сигнальных путей и снижении сократительных характеристик мышц был применен CDN1163 (специфический аллостерический активатор насоса SERCA) в модели вывешивания крыс по Morey-Holton. Если наша гипотеза верна, активирование SERCA при функцио-

нальной разгрузке *soleus* должна привести к снижению утомляемости и изменению паттерна миоинового фенотипа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение эксперимента

Функциональная разгрузка моделировалась вывешиванием задних конечностей по стандартной методике Ильина–Новикова в модификации Morey-Holton [30]. Вывешивание проводилось так, что задние конечности крыс не касались пола, а передние свободно опирались на пол и животные свободно передвигались. Крысы были подвешены на специальных мягких шинках. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. Взято 24 самца крыс Wistar массой 180–200 г в возрасте 2.5 мес. Активатор SERCA CDN1163 (InvivoChem, cat. V17787, Китай) вводился в дозе 50 мг/кг в 10%-ном растворе DMSO, 10%-ном Tween 80 в 0.9%-ном растворе NaCl, как было описано ранее [31].

Животные были распределены на 3 группы – виварный контроль с введением плацебо (С, $n = 8$), группа вывешивания с введением плацебо (7HS, $n = 8$) и группа вывешивания с введением CDN1163 (7HS + CDN, $n = 8$). Через 7 дней эксперимента крыс наркотизировали авертином (5 мл/кг веса 10%-ного раствора), выделяли *m. soleus*, одну из них немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -85°C , вторую использовали для определения утомляемости в *ex vivo* тесте. Эвтаназия крыс осуществлялась введением сверхдозы авертина (10 мл/кг массы тела 10%-ного раствора).

Определение утомляемости m. soleus крыс

Камбаловидные мышцы экспериментальных животных были помещены в охлажденный раствор Рингера–Кребса с постоянным продуванием 95%-ным карбогеном (95% O_2 + 5% CO_2) и инкубированы в течение 15 мин. В это время на сухожилиях были завязаны узлы, необходимые для крепления мышцы. После 15 мин мышца была помещена в ванночку для теста с фиксированной температурой 37°C , прикреплена за сухожилия к датчику силы с одного конца и к фиксированному крючку с другого, после чего была определена оптимальная длина мышцы с помощью подачи короткого электрического импульса (супра-максимальные квадратные импульсы прямоугольной формы 1 мс, 20 В) и замера силы сокращения мышцы (наибольшая сила одиночного сокращения соответствует оптимальной длине мышцы (L_0) [32, 32]. L_0 была измерена с помощью цифрового штангенциркуля. После одиночных сокращений был проведен тест на тетаническое изометрическое сокращение. Мышца была установлена на длину L_0 , после чего была начата стимуляция (1-миллисекундные квадратные импульсы прямоугольной формы, 40 Гц, продолжительность стимуляции 2 с), в процессе чего фиксировалась максимальная сила тетанического сокращения. Для тестирования индекса утомления камбаловидной мышцы проводилась серия из 20 тетанических сокращений за 1 мин, с перерывом в 1 с между сокращениями. За индекс утомления принималась сила последнего сокращения, поделенная на силу первого сокращения [33–35]. Показатели нормировали на физиологическое поперечное сечение мышцы (pCSA). Измерение силовых показателей проводили с помощью Aurora Scientific Dual Mode Lever System 305C-LR (Aurora Scientific, США) с частотой сбора данных 10 кГц. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Aurora Scientific 615A Analysis Software Suite.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг

Анализ содержания белков-маркеров в *m. soleus* проводился с помощью электрофореза с последующим Вестерн-блоттингом.

Для этого с каждого из образцов *m. soleus* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (40–60 мг) на микротоме-криостате фирмы Leica. Для выделения тотальной фракции белка с образца *m. soleus* были сделаны срезы толщиной 20 мкм (10–15 мг) и немедленно прогомогенизированы в шариковом гомогенизаторе TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 25 мин в 100 мкл лизирующего буфера RIPA (Santa-Cruz, США), содержащего (в mM) 50 Tris (pH 7.4), 150 NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 EDTA (pH 8.0) 1 DTT, 1 PMSF, 1 Na_3VO_4 , 1 PMSF, апротинин (10 мкг/мл), леупептин (10 мкг/мл), пепстатин А (10 мкг/мл), протеазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США) и фосфатазный ингибиторный коктейль (Santa-Cruz, США). Затем образцы центрифугировали при 20000 g в течение 15 мин. Супернатант отбирали, разаликвотировали и убিরали на хранение при -85°C . Для определения уровня окисленного и тотального тропомиозина проводили выделение белка с помощью реагента RIPA фирмы Cell signaling Technology с добавлением 1 mM PMSF, протеазного ингибиторного коктейля (Santa-Cruz, США) и фосфатазного ингибиторного коктейля (Santa-Cruz, США).

Часть мышечных лизатов отбирали для определения концентрации общего белка с помощью реактива Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, США). Определения проводились на планшетном фотометре Epoch при длине волны 595 нм. Пробы для нанесения разводились в 2-кратном Laemly-буфере для образцов (5.4 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β -меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий) за исключением проб для анализа уровня окисленного тропомиозина, которые разводили в 2-кратном Laemly-буфере без добавления меркаптоэтанол. Заливку и подготовку ПААГ гелей проводили с помощью заливочных столов и стекол фирмы “Bio-Rad Laboratories”. Гели устанавливали в камеры mini-Protean 3 Cell “Bio-Rad Laboratories”. Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем ПААГ (0.2%-ный метилбисакриламид, 0.1%-ный Ds-Na, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.05%-ный персульфат аммония, 0.1%-ный TEMED) и в 5%-ном концентрирующем ПААГ (0.2%-ный метилбисакриламид, 0.1%-ный Ds-Na, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.05%-ный аммоний персульфат, 0.1%-ный TEMED). Для проведения электрофореза был использован трис-глициновый буфер (192 mM Tris-глицин, pH 8.6, 0.1%-ный Ds-Na). Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами и маркерами молекулярных весов. Образцы загружались из расчета 20 мкг общего белка на дорожку и нормировались относительно уровня GAPDH, содержащегося в той же пробе. Электрофорез проводился при 15 мА на гель в мини-системе (“Bio-Rad Laboratories”) при комнатной температуре. После электрофореза гели переносились в установку для электропереноса белков на мембрану. Электроперенос проводился в буфере (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM глицин, 20%-ный этанол, 0.04%-ный Ds-Na) на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4°C в системе mini Trans-Blot (“Bio-Rad Laboratories”) в течение 2 ч. После электропереноса НЦ-мембраны инкубировались в течение 5 мин в 0.3%-ном растворе Ponceau Red в 5%-ной уксусной кислоте, затем отмывались в PBS (Биолот) с 0.1%-ным Tween 20 (PBST) до появления четких белковых полос на мембране. Этот этап проводился для контроля эффективности переноса, а также для того, чтобы убедиться, что количества общего белка, внесенного в каждую дорожку, было одинаковым. Мембраны блокировались в растворе 5%-ного сухого молока (“Bio-Rad Laboratories”) в PBST в течение 1 ч при комнатной температуре, затем помещались в раствор первичных антител на ночь при 4°C . Условия работы антител проверялись и подбирались экспериментально.

Для выявления белковых полос были использованы первичные антитела против р-СаМКI**б** (1 : 1000, #12716), СаМКI**II** (1 : 1000, #3362), NFATc1 (1:1000, # ab2796), фирмы “Abcam” (США); GapDH (1 : 10000, G041) фирмы “АВМ”, тропомиозина (sc-58868) фирмы Santa Cruz BT (1 : 0).

На следующий день мембрана отмывалась от первичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере и инкубировалась 1 ч со вторичными антителами goat-anti-rabbit (1 : 30000, “Jackson Immuno Research”, США) или goat-anti-mouse (1 : 20000 “Bio-Rad Laboratories”, США). Потом мембрана отмывалась от вторичных антител в PBST 3 раза по 5 мин на шейкере. Выявление проводилось с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, США). Хемилюминесцентный сигнал детектировался с помощью сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Белковые полосы были анализированы с использованием Image Studio Software (LI-COR). Данный прибор и его аналоги вместе с программным обеспечением широко используются во всем мире для детекции сигнала в иммуноблоттинге, делая эту методику гораздо производительнее и экономичнее. Для каждого параметра электрофорез с последующим иммуноблоттингом был повторен не менее 3 раз. Затем полученные на сканере изображения обрабатывались с помощью прилагаемого программного обеспечения Image Studio Software (LI-COR) для получения количественных данных для анализа. Хемилюминесцентный сигнал полосы контрольной группы на анализируемой мембране принимали за 100%, а сигнал полос других групп сравнивали с сигналом полос контрольной группы, расположенных на одной и той же мембране.

ПЦР в реальном времени

Для исследования экспрессии генов и содержания митохондриальной ДНК методом ПЦР в реальном времени проводили выделение РНК и ДНК из образцов мышечной ткани. Для выделения РНК из скелетных мышц был использован набор HiPure Fibrous DNA/RNA Kit (Magen, Китай) согласно рекомендациям производителя.

Определение концентрации мРНК и ДНК производилось по поглощению раствора мРНК при помощи спектрофотометра NanoPhotometer IMPLen. Снимались показания в диапазоне от 200 до 320 нм. Измерение каждой пробы проводилось не менее 3 раз. Чистота образцов была оценена, исходя из соотношений показателей поглощения при различных длинах волн. Соотношение A260/A230 экспериментальных образцов было > 2.0, это указывает на то, что они являлись достаточно чистыми от углеводов, пептидов, фенолов или ароматических соединений [35]. Для проведения обратной транскрипции были использованы реагенты фирмы “Синтол” (Россия). Для подготовки кДНК водный раствор, содержащий 1 мкг тотальной РНК, 30 мкМ случайных гексануклеотидов и 17.4 мкМ олиго-d(T)15, инкубировался 3 мин при 70°C и немедленно переносился на лед. Далее к смеси было добавлено 11.5 мкл мастер-микса (1.3 мМ дНТФ, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл M-MLV-ревертазы, 4 мкл 5×-буфера для M-MLV-ревертазы, “Синтол”). После этого пробы были помещены в амплификатор (iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System, “Bio-Rad Laboratories”) для проведения обратной транскрипции: 10 мин при 25°C, 60 мин при 37°C, 5 мин при 95°C, 30 мин при 4°C. После проведения реакции образцы, содержащие кДНК, хранились при –25°C. Праймеры сконструированы с помощью программы Primer3 v.0.4.0, находящейся в свободном доступе (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (табл. 1). Для проведения ПЦР в реальном времени смешивалось 2 мкл кДНК или ДНК, 2 мкл праймеров с концентрацией 10 мкМ и 21 мкл мастер-микса (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера Б, pH 8.8, 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, “Синтол”). Затем пробы были помещены в амплификатор для проведения реакции: 1-й цикл: 5 мин

Таблица 1. Используемые в работе праймеры.

Ген	Последовательность праймера
<i>SERCA1</i>	5'-GACTGAGTTTGGGGAACAGCT-3' 5'-GAGGTGGTGATGACAGCAGG-3'
<i>SERCA2</i>	5'-GAAGCAGTTCATCCGCTACCTCA-3' 5'-GCAGACCATCCGTCACCAGA-3'
<i>Rcan1 (MCIP1.4)</i>	5'-CCGTTGGCTGGAACAAG-3' 5'-GGTCACTCTCACACACGTGG-3'
<i>RPL19</i>	5'-GTACCCTTCCTCTTCCCTATGC-3' 5'-CAATGCCAACTCTCGTCAACAG-3'
<i>mtDNA</i>	5'-ATTGGAGGCTTCGGGAAGT-3' 5'-AGATAGAAGACACCCCGGCT-3'
<i>Mitofusin-1</i>	5'-CCACAGAGCTGGACATCTGG-3' 5'-GAGAGCCGCTCATTCACCTT-3'
<i>Mitofusin-2</i>	5'-AGTCGGTTGGAAGTCACTGT-3' 5'-TGTA CT CGGGCTGAAAGGAG-3'

при 95°C; 2-й цикл по 44 повтора: 15 с при 93°C, 15 с при Tm (табл. 3), 15 с при 72°C; 3-й цикл: 6 мин 45 с при 72°C, 30 с при 65°C; 4-й цикл по 61 повтору: 15 с при 65°C; 5-й цикл: 10 мин при 15°C. Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию гена “домашнего хозяйства” RPL19. Обсчет данных проводили по методу Pfaffl и соавт. [36].

Для каждого гена мишени ПЦР-реакция проводилась не менее 3 раз.

Иммуногистохимический анализ мышечных волокон

С помощью криомикротомы изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили на –20°. Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого или медленного типов (МНСI и МНСII, Sigma, США) 1 : 400 в PBS во влажной камере при 37°C в течение 1 ч (или при 4°C на ночь). Затем антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1 : 500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. В раствор для отмывки при необходимости окрашивания ядер добавляли DAPI. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением ×200. Анализ изображений проводился с помощью программы ImageJ. Измеряли площадь поперечного сечения по крайней мере 100 волокон, подсчитывали число волокон медленного и быстрого типов и их количественное соотношение.

Для определения локализации NFATc1 в миоцарах было проведено тройное иммуногистохимическое окрашивание транскрипционного фактора NFATc1, сарколеммного белка дистрофина и DAPI на поперечных срезах *m. soleus*. Поперечные срезы *m. soleus* толщиной 7 мкм, выполненные с помощью микротомы в криостате помещали по 3–5 срезов на стекло. Затем стекла со срезами замораживали при –20°C и просушивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем стекла инкубировали при –20°C в 100%-ном ацетоне в течение 10 мин, и стекла обводили гидрофобным карандашом для удержания промывочных растворов. Срезы промывали от ацетона буфером PBS, 200 мкл на стекло, инкубировали 5 мин, промывка

повторялась 3 раза. Затем срезы помещали на 1 ч в блокирующий раствор (1% BSA – бычий сывороточный альбумин и 0.1% Tween 20 в PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4) при комнатной температуре. Первичные антитела NFATc1 (“Santa Cruz”, rabbit, 1 : 100) и дистрофина в (“Abcam”, mouse, 1 : 100) в блокирующем растворе добавляли по 150 мкл на стекло с инкубацией на ночь при 4°C. Одновременно ставился отрицательный контроль (блокирующий раствор без первичных антител) для проверки неспецифичного связывания вторичных антител со срезами. На следующий день срезы отмывали 200 мкл PBS на стекло 3 раза по 5 мин и добавляли 150 мкл вторичных антител (1 : 500 goat anti-mouse, Alexa 488 + goat anti-rabbit, Alexa 546, “Molecular Probes”, США), разведенных в PBS, при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубации срезы отмывали 5 мин 200 мкл PBS и выдерживали 20 мин с интеркалирующим красителем нуклеиновых кислот DAPI (“Molecular Probes”, 1 : 10 000 в PBS). Срезы отмывали от DAPI при помощи 200 мкл PBS на стекло 2 раза по 5 мин. Далее срезы высушивали фильтровальной бумагой, заключали в раствор для флуоресценции Vectashield (“Vector”, США) и покрывали покровным стеклом с фиксацией лаком. Срезы анализировали с помощью микроскопа Leica DMR Upright Microscope с камерой Leica DC 300F. После этого осуществляли наложение полученных фотографий, снятых под разными фильтрами, и проводили статистический анализ результатов с помощью программы ImageJ.

Статистическая обработка данных

Данные проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова, после чего проводили анализ ANOVA с post hoc анализом Тьюки на множественные сравнения. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса *m. soleus* обеих вывешенных групп (7HS и 7HS + CDN) не различалась между собой и была достоверно ниже, чем в группе контроля (67.5 ± 2.9 и 65.3 ± 4.2 мг соответственно против 109.4 ± 4.3 мг в группе контроля, $p < 0.05$).

Активные механические характеристики m. soleus при введении активатора SERCA

Сила максимального тетанического сокращения достоверно снизилась в группах 7HS и 7HS + CDN до 77% и 60% соответственно от группы контроля. При этом нормированная на физиологическое поперечное сечение мышцы (фППС) сила тетанического сокращения не изменялась.

Мы также наблюдали достоверное снижение индекса утомления в группе 7HS на 17% относительно группы контроля. Это снижение отсутствовало в группе 7HS + CDN (табл. 2, рис. 1). Мы не наблюдали достоверной разницы увеличения времени полурасслабления между экспериментальными группами.

Влияние активатора SERCA на кальцевую сигнализацию и окисление тропмиозина в камбаловидной мышце

После 7 суток вывешивания уровень фосфорилирования кальций-кальмодулинкиназы II (β) (CaMK II β) по Thr287 в группе 7HS достоверно ($p < 0.05$) увеличился втрое по сравнению со значениями группы С. В группе с введением активатора SERCA уровень фосфорилирования CaMK II β составлял 184% от среднего значения группы С и не имел достоверных отличий ни от группы С, ни от группы 7HS (рис. 2а). Экспрессия мРНК SERCA1 достоверно выросла на 32% в группе 7HS и на

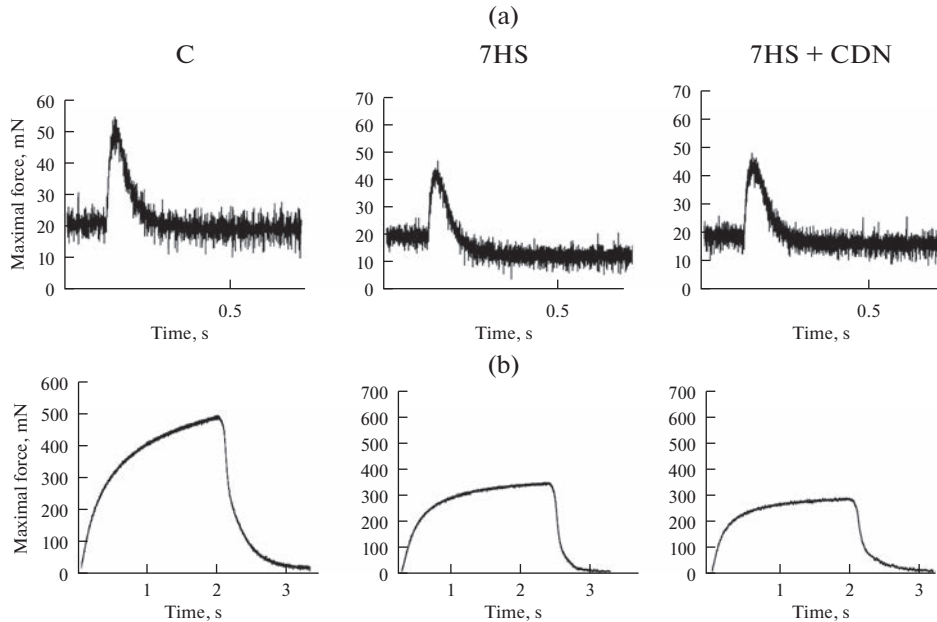


Рис. 1. Репрезентативные механограммы одиночных и тетанических сокращений. С — виварный контроль, 7HS — группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN — группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. (a) — записи одиночных сокращений, (b) — записи тетанических сокращений.

98% в группе 7HS + CDN по сравнению с группой С: показатели обеих вывешенных групп достоверно отличались от контроля, при этом значения группы 7HS + CDN также достоверно превышали значения группы 7HS ($p < 0.05$) (рис. 2b). Экспрессия мРНК SERCA2a не имела достоверных различий между группами С и 7HS, однако в группе 7HS + CDN экспрессия SERCA2a была достоверно выше, чем в группе С и 7HS, составляя 132% от значений группы С ($p < 0.05$) (рис. 2c). Уровень окисленного тропомиозина в группе 7HS достоверно вырос на 55% в сравнении с группой

Таблица 2. Активные механические свойства *m. soleus* при недельном вывешивании крыс

	С	7HS	7CDN
Длина мышцы, мм	19.1 ± 0.6	19.5 ± 0.2	19.8 ± 0.3
Физиологическое поперечное сечение мышцы (ФППС), мм ²	5.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2*	3.0 ± 0.2*
Максимальная сила тетанического сокращения, мН	518.2 ± 27.1	398.6 ± 47.8*	310.6 ± 25.5*
Удельная максимальная сила тетанического сокращения, мН/мм ²	102.3 ± 6.4	127.4 ± 16.2	105.8 ± 9.3
Время полурасслабления в начале теста на утомление, мс	184.5 ± 6.7	205.9 ± 29.7	249.8 ± 35.0
Время полурасслабления в конце теста на утомление, мс	252.1 ± 7.3	287.2 ± 15.6	298.7 ± 12.2
Индекс утомления, % от максимума	63.1 ± 2.8	49.8 ± 4.8*	66.6 ± 4.0**

* — отличие от контроля, $p < 0.05$, ** — отличие от HS, $p < 0.05$. Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего. С — виварный контроль, 7HS — вывешивание 7 суток, 7CDN — вывешивание 7 суток + введение CDN1163.

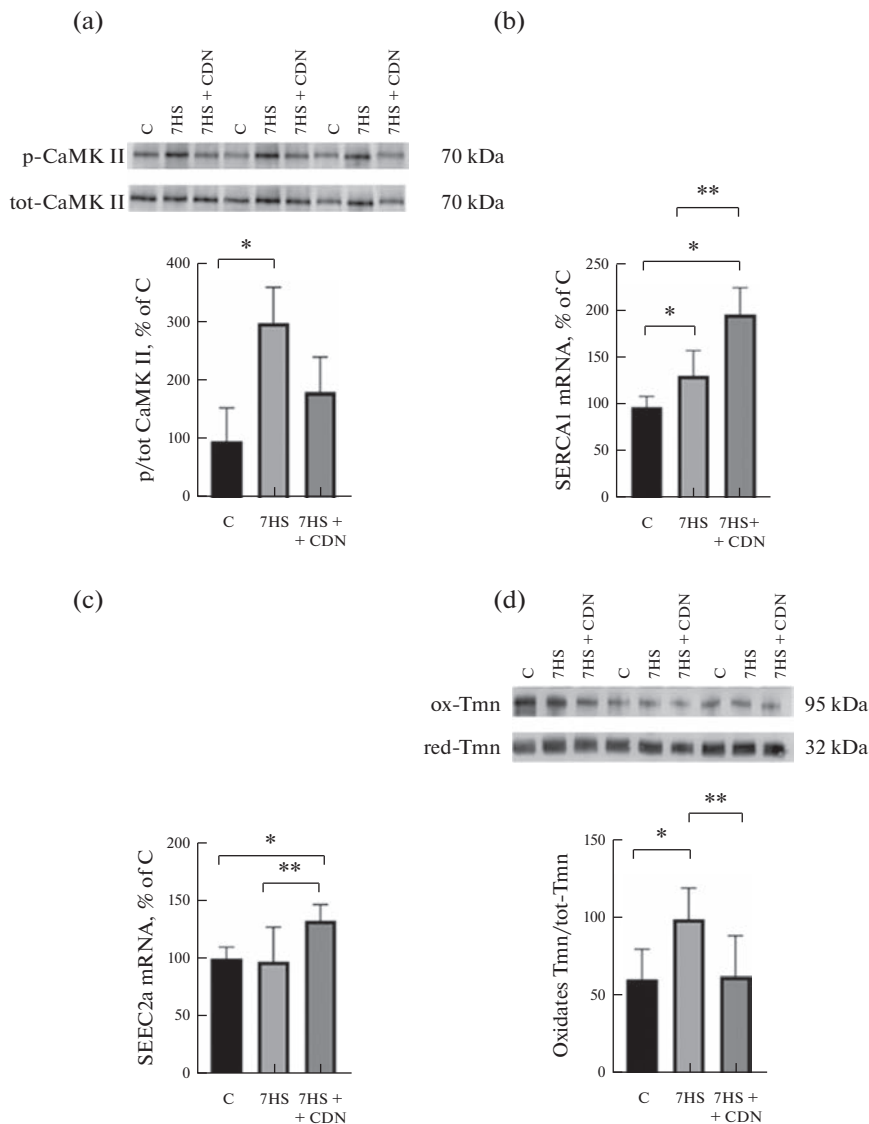


Рис. 2. Уровень фосфорилирования CaMK II (β) (а), экспрессия мРНК SERCA1 (б), экспрессия мРНК SERCA2A (с), соотношение окисленного тропомиозина к общему тропомиозину (д). С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы С, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

С, тогда как в группе 7HS + CDN уровень окисленного тропомиозина составлял 93% от значений группы С и был достоверно ниже значений группы 7HS (рис. 2д).

Влияние активатора SERCA на миозиновый фенотип и размеры мышечных волокон

После 7 суток вывешивания процент мышечных волокон медленного типа в группе 7HS был ниже, а процент “быстрых” мышечных волокон существенно вы-

Таблица 3. Процент и площадь поперечного сечения медленных (MB I) и быстрых (MB II) волокон скелетных мышц

Тип волокон	MB I			MB II		
Группа	C	7HS	7HS + CDN	C	7HS	7HS + CDN
% MB	75.1 ± 2.1	58.6 ± 1.4*	68.3 ± 2.0*\$	18.4 ± 2.6	30.7 ± 2.0*	19.33 ± 2.5\$
ППС MB (мкм ²)	2397 ± 111	2070 ± 75*	2003 ± 44*	2174 ± 132	1560 ± 53*	1283 ± 81*

C – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. % MB – процент мышечных волокон, ППС MB – площадь поперечного сечения мышечных волокон (в микронах квадратных). Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. * – достоверные отличия от группы C; \$ – достоверные отличия от группы 7HS при $p < 0.05$.

ше по сравнению с группой C на 22% и 60% соответственно (табл. 3), ($p < 0.05$). Введение активатора SERCA предотвратило эти изменения. В группе 7HS + CDN процент “быстрых” мышечных волокон был достоверно ниже чем в группе 7HS и не имел достоверных отличий от группы C, а процент “медленных” мышечных волокон был достоверно выше, чем в группе 7HS, но несколько отличался от группы C (табл. 3), ($p < 0.05$).

Площадь поперечного сечения (CSA) волокон “быстрого” и “медленного” типов достоверно снизилась в обеих вывешенных группах по сравнению с группой C ($p < 0.05$). Существенных различий между группами 7HS и 7HS + CDN не наблюдалось (табл. 3).

Активатор SERCA и сигнальный путь кальцинейрин-NFAT

Содержание транскрипционного фактора NFATc1 в мышечных ядрах после 7 сут вывешивания в группе 7HS было достоверно снижено в сравнении с группой C и составляло 37% от уровня контрольной группы. Содержание NFATc1 в миоцарах в группе 7HS + CDN было выше, чем в группе 7HS, но достоверно ниже, чем в группе C, и составляло 68% от нее ($p < 0.05$) (рис. 3).

Экспрессия мРНК изоформы гена *MCIP1.4*, являющегося показателем транскрипционной активности NFATc1, достоверно снизилась в группе 7HS в сравнении с контролем на 70%, однако этот параметр не имел достоверных отличий от контроля в группе 7HS + CDN ($p < 0.05$) (рис. 4).

Активатор SERCA и параметры биогенеза митохондрий

Содержание митохондриальной ДНК в группе 7HS было на 55% ниже, чем в группе C ($p < 0.05$). В группе 7HS + CDN содержание митохондриальной ДНК не имело достоверных отличий ни от группы C, ни от группы 7HS (рис. 5a). Содержание структурного белка митохондрий TOM20 в группе 7HS составляло 52% от группы C ($p < 0.05$), тогда как в группе 7HS + CDN содержание TOM20 не имело достоверных отличий от других экспериментальных групп (рис. 5b).

Экспрессия мРНК митофузина-1 в группе 7HS составляло 66% от группы C ($p < 0.05$). В группе 7HS + CDN экспрессия мРНК митофузина-1 составляла 93% от группы C, что было достоверно выше значений группы 7HS и не отличалось от контрольной группы (рис. 5c). Экспрессия мРНК митофузина-2 была также достоверно снижена в группе 7HS в сравнении с контролем (73% от контрольной группы), но не имела достоверных отличий от группы C в группе 7HS + CDN (83% от контроля) (рис. 5d).

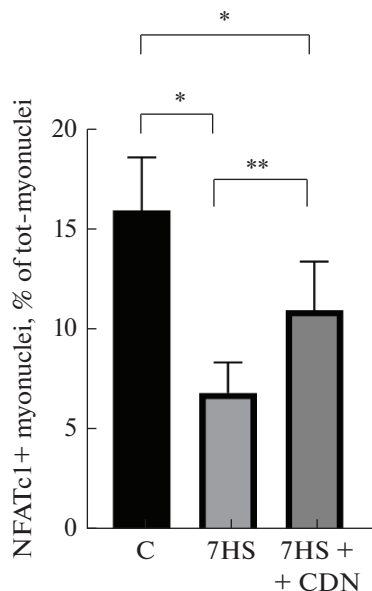


Рис. 3. Содержание NFATc1 в миоцарах камбаловидных мышц экспериментальных животных. С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы С, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

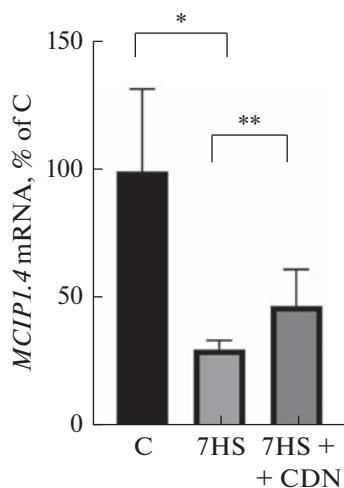


Рис. 4. Экспрессия мРНК *MC1P1.4*. С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы С, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

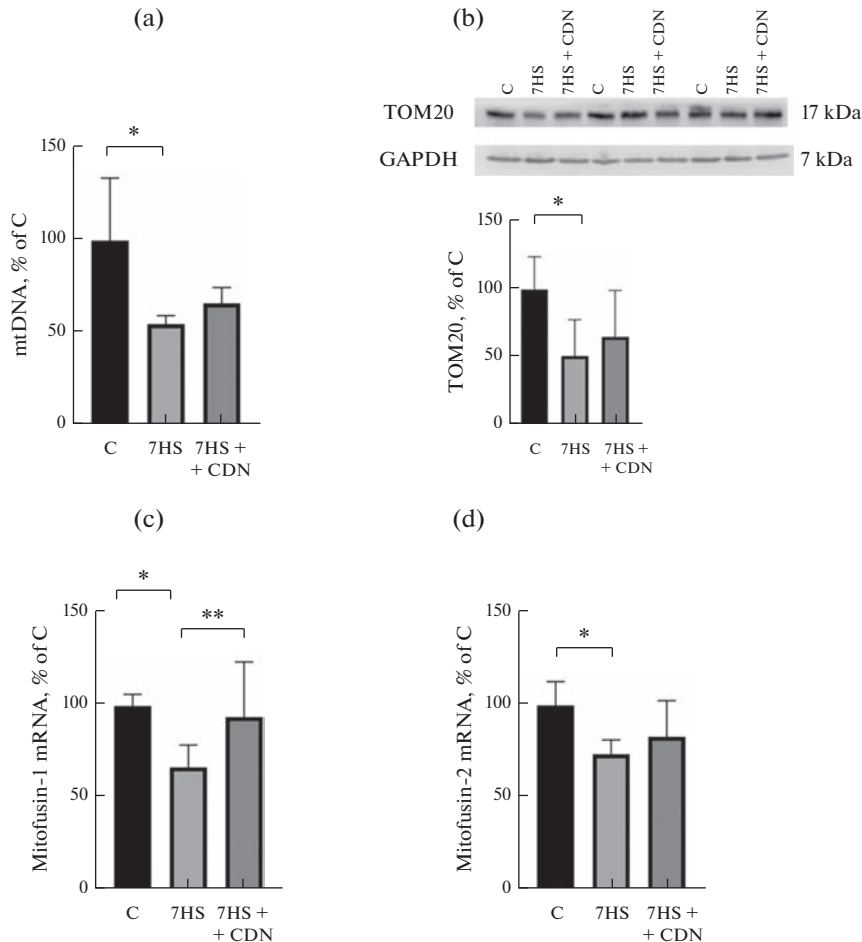


Рис. 5. Содержание мтДНК (а), содержание TOM20 (б), экспрессия мРНК митофузина-1 (с) и мРНК митофузина-2 (д). С – виварный контроль, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + CDN – группа 7-суточного вывешивания с введением активатора SERCA. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. * – отличия от группы С, $p < 0.05$; ** – отличия от группы 7HS, $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы не обнаружили предотвращения атрофии *soleus* в обеих вывешенных группах. Сила максимального тетанического сокращения *soleus* в этих группах также снизилась относительно группы контроля. 7-суточная функциональная разгрузка *soleus* крыс привела к достоверному росту утомляемости этой мышцы. Аналогичные результаты получены ранее при разгрузке мышц человека и животных [37, 38]. Введение активатора SERCA на фоне 7-суточного вывешивания предотвратило снижение индекса утомления *soleus*. Аналогичные эффекты CDN1163 на функциональные характеристики скелетных мышц были получены ранее на мышцах *Sod1*^{–/–} и мышцах с саркопенией [21, 22]. Увеличение субмаксимальной активности SERCA при введении нитрата также предотвращало развитие утомления в *m. soleus* [28]. Авторы заметили, что эти свойства проявляются в экспрессирующих волокна ти-

па I (*soleus*), но не волокон типа II (EDL). Причины, предотвращающие снижение утомляемости *soleus* в нашем эксперименте, могут быть следующие.

1. Введение активатора SERCA экспериментальным животным успешно предотвратило увеличение уровня фосфорилирования СаМК II β по Thr 287, происходящее на фоне 7 суток вывешивания задних конечностей крыс. Увеличение фосфорилирования СаМК II β на фоне вывешивания было обнаружено ранее [39]. Аутофосфорилирование СаМК II β по Thr 287 происходит в ответ на повышение содержания ионов кальция [40]. Можно предположить, что предотвращение роста фосфорилирования СаМК II β в группе 7HS+CDN связано с предотвращением повышения уровня миоплазматического кальция в этой группе. В группе с введением активатора SERCA также было выявлено достоверное увеличение уровня экспрессии мРНК SERCA1 и SERCA2A, которое могло внести вклад в усиление транспорта ионов кальция из миоплазмы в СПР. Результаты свидетельствуют о специфическом влиянии препарата на обе изоформы SERCA. По-видимому, одним из факторов, способствующих предотвращению снижения индекса утомления *soleus* в группе 7HS + CDN, могло быть уменьшение содержания ионов кальция в миоплазме.

2. Наблюдаемые эффекты 7-суточного вывешивания на изменение долей “быстрых” и “медленных” мышечных волокон в группе 7HS согласуются с ранее полученными данными [41]. Вклад в увеличение устойчивости *soleus* к утомлению в группе 7HS + CDN может вносить предотвращение снижения медленных мышечных волокон и увеличения количества быстрых мышечных волокон в этой группе. Механизмы, приводящие к такому эффекту, могут быть следующие. Транскрипционный фактор NFATc1 является активатором экспрессии медленной изоформы ТЦМ [42, 43], при фосфорилировании он покидает мышечные ядра и не может активировать экспрессию медленной изоформы миозина [44]. Снижение его содержания (и экспрессии *MCIP1.4* — гена, маркера активности NFATC1) в миоэдрах в группе 7HS согласуется с ранее полученными данными [45, 46]. При введении CDN1163 уровень NFATc1 и экспрессия мРНК *MCIP1.4* в группе 7HS + CDN были выше, чем в группе вывешивания без препарата. Итак, введение активатора SERCA на фоне вывешивания способствует предотвращению снижения уровня NFATc1 и экспрессии мРНК *MCIP1.4* в миоэдрах, что может вносить вклад в предотвращение трансформации миофибриллярного фенотипа MB.

3. Введение активатора SERCA предотвратило увеличение доли окисленного тропомиозина (рис. 1d). Этот белок миофиламентов ранее был использован как показатель индекса окислительного стресса карбоксилирования/декарбоксилирования мышечных белков и маркера окислительного повреждения тканей [47–49]. Эти результаты согласуются с данными о снижении уровня окислительного стресса при введении CDN1163 на мышах *Sod1*—/— [22] и в тучных клетках [50]. Эта модификация тропомиозина может также изменять чувствительность к кальцию и максимальную способность миофиламентов генерировать силу [47]. Известен прямой эффект действия избыточного миоплазматического кальция на повышение утомляемости, связанный с усилением генерации активных форм кислорода митохондриями, которое приводит к окислению рианодиновых рецепторов, утечке (leakage) кальция из СПР и истощению кальциевого депо СПР [23, 51]. Введение CDN1163 может предотвращать снижение индекса утомления *soleus* за счет предотвращения накопления избытка кальция и активных форм кислорода в миоплазме.

4. Вклад в увеличение устойчивости *soleus* к утомлению в группе 7HS + CDN может вносить предотвращение снижения в ней содержания митохондриальных белков и ДНК. Снижение содержания митохондриальной ДНК и белка TOM20, являющегося маркером митохондрий [52, 53], а также экспрессии митофузинов-1 и 2 в группе 7HS согласуется с характерными для 7-суточного вывешивания показателя-

ми ухудшения состояния митохондрий [54–57]. Истощение Mfn1 и 2 приводит к снижению потенциала мембран митохондрий, для компенсации происходит снижение работы дыхательной цепи. Влияние CDN1163 в группе 7HS + CDN на содержание митохондриальных белков, их мРНК и ДНК согласуется с данными об активации им утилизации жирных кислот и биогенеза митохондрий [31, 58]. Положительный эффект CDN1163 в группе 7HS + CDN может быть связан со снижением уровня активных форм кислорода, вызывающих митохондриальный стресс [59]. Другие авторы также обнаружили увеличение скорости дыхания митохондрий и снижение утомления *soleus* при введении пищевого нитрата в качестве активатора SERCA [28]. Предотвращение снижения содержания мтДНК и белка в группе 7HS + CDN может вносить вклад в предотвращение падения индекса утомления *soleus*.

Итак, введение активатора SERCA CDN1163 на фоне 7-суточной функциональной разгрузки привело к снижению уровня кальций-зависимого фосфорилирования CaMK II и окисления тропомиозина (показателя окислительного стресса), способствовало сохранению доли “медленных” устойчивых к утомлению мышечных волокон, а также митохондриальной ДНК и белка, и предотвратило снижение индекса утомления *soleus* на фоне вывешивания. Однако введение активатора SERCA не привело к предотвращению ее атрофии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН (протокол от 31 мая 2021 г. № 584).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке фонда РФФ, грант № 21-15-00228.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

К.А.З. — проведение эксперимента с животными, взятие и выделение проб белка и РНК, проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов; С.П.Б. — организация проведения эксперимента, взятие и выделение проб белка и РНК, проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов, обсуждение результатов; К.А.Ш. — организация проведения эксперимента, взятие и выделение проб белка и РНК, проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов, обсуждение результатов; С.А.Т. — определение функциональных свойств *m. soleus* крыс; И.Д.Л. — проведение форезов, блотов, ПЦР, статистическая обработка результатов; Т.Л.Н. — планирование эксперимента, обсуждение результатов, работа со статьей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA (2014) PGC1-alpha over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. J Physiol 592 (20): 4575–4589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275545>
2. Fernandez-Gonzalo R, Tesch PA, Lundberg TR, Alkner BA, Rullman E, Gustafsson T (2020) Three months of bed rest induce a residual transcriptomic signature resilient to resistance exercise countermeasures. FASEB J 34 (6): 7958–7969. <https://doi.org/10.1096/fj.201902976R>

3. Leermakers PA, Kneppers AEM, Schols A, Kelders M, de Theije CC, Verdijk LB, van Loon LJC, Langen RCJ, Gosker HR (2019) Skeletal muscle unloading results in increased mitophagy and decreased mitochondrial biogenesis regulation. *Muscle & Nerve* 60 (6): 769–778.
<https://doi.org/10.1002/mus.26702>
4. Desaphy JF, Pierino S, Liantonio A, De Luca A, Didonna MP, Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M, Camerino C, Zallone A, Camerino DC (2005) Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hindlimb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neurobiol Dis* 18 (2): 356–365.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.09.016>
5. Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50 (6): 500–509.
[https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
6. Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D (1999) Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol* 277 (6): C1044–1049.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1044>
7. Trappe S, Costill D, Gallagher P, Creer A, Peters JR, Evans H, Riley DA, Fitts RH (2009) Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol* 106 (4): 1159–1168.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91578.2008>
8. Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB (1999) Intracellular Ca^{2+} transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* 87 (1): 386–390.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>
9. Booth FW, Giannetta CL (1973) Effect of hindlimb immobilization upon skeleton muscle calcium in rat. *Calcified Tissue Res* 13 (4): 327–330.
<https://doi.org/10.1007/BF02015423>
10. Tomiya S, Tamura Y, Kouzaki K, Kotani T, Wakabayashi Y, Noda M, Nakazato K (2019) Cast immobilization of hindlimb upregulates sarcolipin expression in atrophied skeletal muscles and increases thermogenesis in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Regulat Integrat Compar Physiol* 317 (5): R649–R661.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00118.2019>
11. Nemirovskaya TL, Sharlo KA (2022) Roles of ATP and SERCA in the Regulation of Calcium Turnover in Unloaded Skeletal Muscles: Current View and Future Directions. *Int J Mol Sci* 23 (13): 6937.
12. Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA (1988) Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 335 (6192): 735–738.
<https://doi.org/10.1038/335735a0>
13. Shenkman BS, Belova SP, Lomonosova YN, Kostrominova TY, Nemirovskaya TL (2015) Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading. *Arch Biochem Biophys* 584: 36–41.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.011>
14. Matuz-Mares D, Gonzalez-Andrade M, Araiza-Villanueva MG, Vilchis-Landeros MM, Vazquez-Meza H (2022) Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants* 11 (5): 801.
<https://doi.org/10.3390/antiox11050801>
15. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M (2000) Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80 (3): 1215–1265.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1215>
16. Shimizu H, Langenbacher AD, Huang J, Wang K, Otto G, Geisler R, Wang Y, Chen JN (2017) The Calcineurin-FoxO-MuRF1 signaling pathway regulates myofibril integrity in cardiomyocytes. *eLife* 6: 27955.
<https://doi.org/10.7554/eLife.27955>
17. Midrio M, Danieli-Betto D, Megighian A, Betto R (1997) Early effects of denervation on sarcoplasmic reticulum properties of slow-twitch rat muscle fibres. *Pflugers Arch* 434 (4): 398–405.
<https://doi.org/10.1007/s004240050413>
18. Altaeva EG, Ogneva IV, Shekman BS (2010) Dynamics of calcium levels and changes SERCA content in muscle fibers of rats and Mongolian gerbils during hind limb unloadings of various duration. *Tsitologiya* 52 (9): 770–775.
19. Мухина АМ, Алтаева ЕГ, Немировская ТЛ, Шенкман БЕ (2006) Роль кальциевых каналов L-типа в накоплении Ca^{2+} в волокнах *m. soleus* крысы и изменении соотношения изоформ миозина и SERCA при гравитационной разгрузке. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 92(11): 1285–1295. [Mukhina AM, Altaeva EG, Nemirovskaia TL, Shenkman BS (2006) Role of L-type Ca channels in Ca^{2+} accumulation and changes in distribution of myosin heavy chain and SERCA isoforms in rat *m. soleus* under gravitational unloading. *Russ J Physiol* 92 (11): 1285–1295. (In Russ)].

20. Schulte L, Peters D, Taylor J, Navarro J, Kandarian S (1994) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump expression in denervated skeletal muscle. *Am J Physiol* 267 (2 Pt 1): C617–C622.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.2.C617>
21. Qaisar R, Pharaoh G, Bhaskaran S, Xu H, Ranjit R, Bian J, Ahn B, Georgescu C, Wren JD, Van Remmen H (2020) Restoration of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) Activity Prevents Age-Related Muscle Atrophy and Weakness in Mice. *Int J Mol Sci* 22 (1): 37.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010037>
22. Qaisar R, Bhaskaran S, Ranjit R, Sataranatarajan K, Premkumar P, Huseman K, Van Remmen H (2019) Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. *Redox Biol* 20: 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.018>
23. Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, Shiomi T, Zalk R, La-campagne A, Marks AR (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 14 (2): 196–207.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.014>
24. Andersson DC, Meli AC, Reiken S, Betzenhauser MJ, Umanskaya A, Shiomi T, D'Armiento J, Marks AR (2012) Leaky ryanodine receptors in beta-sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2 (1): 9.
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-9>
25. Umanskaya A, Santulli G, Xie W, Andersson DC, Reiken SR, Marks AR (2014) Genetically enhancing mitochondrial antioxidant activity improves muscle function in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (42): 15250–15255.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1412754111>
26. Ingalls CP, Wenke JC, Armstrong RB (2001) Time course changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat Space Environ Med* 72 (5): 471–476.
27. Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Olaso-Gonzalez G, Diaz A, Gratas-Delamarche A, Cerda M, Vina J (2012) Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PloS One* 7 (10): e46668.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046668>
28. Petrick HL, Brownell S, Vachon B, Brunetta HS, Handy RM, van Loon LJC, Murrant CL, Holloway GP (2022) Dietary nitrate increases submaximal SERCA activity and ADP transfer to mitochondria in slow-twitch muscle of female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 323 (2): E171–E184.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00371.2021>
29. Shenkman BS, Vikhlyantsev IM, Litvinova KS, Udaltsov SN, Nemirovskaya TL (2004) Contractile characteristics and sarcomeric cytoskeletal proteins of human soleus fibers in muscle unloading: role of mechanical stimulation from the support surface. *Biophysics* 49: 807–815.
30. Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92 (4): 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
31. Kang S, Dahl R, Hsieh W, Shin A, Zsebo KM, Buettner C, Hajjar RJ, Lebeche D (2016) Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders. *J Biol Chem* 291 (10): 5185–5198.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.705012>
32. Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184 (1): 170–192.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1966.sp007909>
33. Burke RE, Levine DN, Saleman M, Tsairis P (1974) Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics. *J Physiol* 238 (3): 503–514.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010540>
34. Roy RR, Zhong H, Monti RJ, Vallance KA, Edgerton VR (2002) Mechanical properties of the electrically silent adult rat soleus muscle. *Muscle & Nerve* 26 (3): 404–412.
<https://doi.org/10.1002/mus.10219>
35. Nouvel A, Laget J, Duranton F, Leroy J, Desmetz C, Servais MD, de Preville N, Galtier F, Nocca D, Builles N, Rebuffat S, Lajoix AD (2021) Optimization of RNA extraction methods from human metabolic tissue samples of the COMET biobank. *Sci Rep* 11 (1): 20975.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-00355-x>
36. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
37. Matoba TWY, Ohira Y (1993) β -Guanidinopropionic acid suppresses suspension-induced changes in myosin expression in rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exer* 25: 157.

38. Mulder ER, Kuebler WM, Gerrits KH, Rittweger J, Felsenberg D, Stegeman DF, de Haan A (2007) Knee extensor fatigability after bedrest for 8 weeks with and without countermeasure. *Muscle Nerve* 36 (6): 798–806.
<https://doi.org/10.1002/mus.20870>
39. Sharlo KA, Lvova ID, Belova SP, Zaripova KA, Shenkman BS, Nemirovskaya TL (2022) Metformin Attenuates Slow-to-Fast Fiber Shift and Proteolysis Markers Increase in Rat Soleus after 7 Days of Rat Hindlimb Unloading. *Int J Mol Sci* 24 (1): 503.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010503>
40. Rostas JAP, Skelding KA (2023) Calcium/Calmodulin-Stimulated Protein Kinase II (CaMKII): Different Functional Outcomes from Activation, Depending on the Cellular Microenvironment. *Cells* 12 (3): 401.
<https://doi.org/10.3390/cells12030401>
41. Lomonosova YN, Turtikova OV, Shenkman BS (2016) Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motility* 37 (1-2): 7–16.
<https://doi.org/10.1007/s10974-015-9428-y>
42. Kubis HP, Scheibe RJ, Meissner JD, Hornung G, Gros G (2002) Fast-to-slow transformation and nuclear import/export kinetics of the transcription factor NFATc1 during electrostimulation of rabbit muscle cells in culture. *J Physiol* 541 (Pt 3): 835–847.
43. Meissner JD, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ (2007) Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J Cell Physiol* 211 (1): 138–148.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20916>
44. Shen T, Cseresnyes Z, Liu Y, Randall WR, Schneider MF (2007) Regulation of the nuclear export of the transcription factor NFATc1 by protein kinases after slow fibre type electrical stimulation of adult mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 579 (Pt 2): 535–551.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120048>
45. Sharlo KA, Paramonova, II, Lvova ID, Mochalova EP, Kalashnikov VE, Vilchinskaya NA, Tyganov SA, Konstantinova TS, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS (2021) Plantar Mechanical Stimulation Maintains Slow Myosin Expression in Disused Rat Soleus Muscle via NO-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 22 (3): 1372.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031372>
46. Sharlo KA, Paramonova, II, Lvova ID, Vilchinskaya NA, Bugrova AE, Shevchenko TF, Kalamkarov GR, Shenkman BS (2020) NO-Dependent Mechanisms of Myosin Heavy Chain Transcription Regulation in Rat Soleus Muscle After 7-Days Hindlimb Unloading. *Front Physiol* 11: 814.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00814>
47. van der Velden J (2006) Functional significance of myofilament protein oxidation. *Eur Heart J* 27 (7): 764–765.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi742>
48. Lechado ITA, Vitadello M, Traini L, Namuduri AV, Gastaldello S, Gorza L (2018) Sarcolemmal loss of active nNOS (Nos1) is an oxidative stress-dependent, early event driving disuse atrophy. *J Pathol* 246 (4): 433–446.
<https://doi.org/10.1002/path.5149>
49. Jackson MJ (2016) Recent advances and long-standing problems in detecting oxidative damage and reactive oxygen species in skeletal muscle. *J Physiol* 594 (18): 5185–5193.
<https://doi.org/10.1113/JP270657>
50. Hunter KD, Crozier RWE, Braun JL, Fajardo VA, MacNeil AJ (2023) Acute activation of SERCA with CDN1163 attenuates IgE-mediated mast cell activation through selective impairment of ROS and p38 signaling. *FASEB J* 37 (2): e22748.
<https://doi.org/10.1096/fj.202201272R>
51. Yutaka Kano TS, Tadakatsu Inagaki, Mizuki Sudo, David C Poole (2012) Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. *J Phys Fitness Sports Med* 1 (3): 505–512.
<https://doi.org/10.7600/jpfsm.1.505>
52. Buso A, Comelli M, Picco R, Isola M, Magnesa B, Pisot R, Rittweger J, Salvadego D, Simunic B, Grassi B, Mavelli I (2019) Mitochondrial Adaptations in Elderly and Young Men Skeletal Muscle Following 2 Weeks of Bed Rest and Rehabilitation. *Front Physiol* 10: 474.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00474>
53. Wei F, Xiao H, Hu Z, Zhang H, Wang C, Dai H, Tang J (2015) [Subcellular localization of ataxin-3 and its effect on the morphology of cytoplasmic organoids]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 32 (3): 353–357.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.03.011>
54. Liu J, Peng Y, Cui Z, Wu Z, Qian A, Shang P, Qu L, Li Y, Liu J, Long J (2012) Depressed mitochondrial biogenesis and dynamic remodeling in mouse tibialis anterior and gastrocnemius induced by 4-week hindlimb unloading. *IUBMB Life* 64 (11): 901–910.
<https://doi.org/10.1002/iub.1087>

55. Wagatsuma A, Kotake N, Kawachi T, Shiozuka M, Yamada S, Matsuda R (2011) Mitochondrial adaptations in skeletal muscle to hindlimb unloading. *Mol Cell Biochem* 350 (1-2): 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11010-010-0677-1>
56. Theeuwes WF, Gosker HR, Langen RCJ, Verhees KJP, Pansters NAM, Schols A, Remels AHV (2017) Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) enhances skeletal muscle oxidative metabolism. *Biochem Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863 (12): 3075–3086.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.018>
57. Sharlo K, Lvova I, Turtikova O, Tyganov S, Kalashnikov V, Shenkman B (2022) Plantar stimulation prevents the decrease in fatigue resistance in rat soleus muscle under one week of hindlimb suspension. *Arch Biochem Biophys* 718: 109150.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109150>
58. Mengeste AM, Lund J, Katare P, Ghobadi R, Bakke HG, Lunde PK, Eide L, Mahony GO, Gopel S, Peng R, Kase ET, Thoresen GH, Rustan AC (2021) The small molecule SERCA activator CDN1163 increases energy metabolism in human skeletal muscle cells. *Current Res Pharmacol Drug Discover* 2: 100060.
<https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100060>
59. Heher P, Ganassi M, Weidinger A, Engquist EN, Pruller J, Nguyen TH, Tassin A, Decleves AE, Mamchaoui K, Banerji CRS, Grillari J, Kozlov AV, Zammit PS (2022) Interplay between mitochondrial reactive oxygen species, oxidative stress and hypoxic adaptation in facioscapulohumeral muscular dystrophy: Metabol stress as potential therapeutic target. *Redox Biol* 51: 102251.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102251>

Influence of the SERCA Activity on Rat's Soleus Contractile Properties during Functional Unloading

K. A. Sharlo^a, I. D. Lvova^a, S. A. Tyganov^a, K. A. Zaripova^a,
S. P. Belova^a, and T. L. Nemirovskaya^{a, *}

^a*Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: Nemirovskaya@bk.ru*

Dysfunction of skeletal muscles and their atrophy during unloading are accompanied by excess calcium accumulation in the myoplasm of muscle fibers. We hypothesized that calcium accumulation may occur, among other reasons, due to inhibition of SERCA activity under muscle unloading. In this case, the use of a SERCA activator will reduce the calcium level in the myoplasm and prevent the consequences of unloading. Male Wistar rats were divided into 3 groups: vivarium control with placebo administration (C, $n = 8$), 7-day suspension group with placebo administration (7HS, $n = 8$) and 7-day suspension group with intraperitoneal administration of SERCA CDN1163 activator (50 mg/kg (7HS + CDN), $n = 8$). One *m. soleus* of each rat was frozen in liquid nitrogen, the second was tested for functional properties. In the 7HS group, increased *soleus* fatigue was found in the *ex vivo* test, a significant increase in mRNA and the number of fast muscle fibers, an increase in the level of calcium-dependent CaMK II phosphorylation and the level of tropomyosin oxidation, as well as a decrease in the content of mitochondrial DNA and protein. All these changes were prevented in the SERCA CDN1163 activator group. Conclusion: 7-day SERCA activator administration does not delay of *soleus* atrophy, but prevents the development of its fatigue, probably by preventing a decrease in the number of type I fibers and markers of mitochondrial biogenesis.

Keywords: soleus unloading, atrophy, soleus fatigue, muscle fiber types, NFATC1, mitochondrial DNA, mitofusins 1/2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
В НИЖНИХ БУГРАХ ЧЕТВЕРОХОЛМИЯ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ
АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2023 г. С. Д. Николаева¹, А. П. Ивлев¹, А. А. Наумова¹, А. А. Куликов¹,
М. В. Глазова^{1, *}, Е. В. Черниговская¹

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

*E-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Эпилепсия тесно связана с нарушением функции тормозной ГАМК-нейротрансмиссии. В данном исследовании использовались крысы Крушинского–Молодкиной (КМ), генетически склонные к аудиогенным припадкам (АГП). Для крыс КМ характерно развитие аудиогенной эпилепсии в постнатальном онтогенезе, с началом АГП в возрасте 1.5–2 мес. и полным развитием экспрессии АГП к 3 месяцам. Мы проанализировали ГАМК-ергическую систему нижних бугров четверохолмия (НБЧ) крыс КМ на разных стадиях постнатального развития. В качестве контроля использовали крыс линии Вистар. В НБЧ молодых крыс линии КМ экспрессия $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортера 1 (NKCC1) была увеличена, в то время как K^+/Cl^- котранспортер 2 (KCC2) был неизменен, что указывает на нарушение постсинаптического действия ГАМК на ранних стадиях постнатального развития. Более того, мы выявили увеличение экспрессии везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в НБЧ, что дополнительно указывает на более высокую активность высвобождения ГАМК. У взрослых крыс, напротив, выявлено снижение экспрессии транспортера KCC2, что указывает на снижение ГАМК-опосредованного торможения в клетках-мишенях. Таким образом, восприимчивость к судорогам у взрослых крыс КМ может быть вызвана нарушениями регуляции ГАМК в НБЧ.

Ключевые слова: крысы Крушинского–Молодкиной, аудиогенные судороги, нижняя колликула, постнатальный онтогенез

DOI: 10.31857/S0869813923070105, **EDN:** XMXKRZ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время появляется все больше доказательств того, что нарушение тормозной нейротрансмиссии γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в головном мозге является одним из ключевых механизмов развития эпилепсии [1]. Так, исследования клинического материала от пациентов с эпилепсией и экспериментальных моделей продемонстрировали утрату ГАМК-ергических нейронов, ослабление синтеза ГАМК и снижение количества рецепторов ГАМК на мембранах клеток-

Сокращения: КМ – крысы Крушинского–Молодкиной; НБЧ – нижние бугры четверохолмия; АГП – аудиогенный припадок; KCC2 – K^+/Cl^- котранспортер 2; NKCC1 – $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортер; VGAT – везикулярный транспортер ГАМК; GABAAR(α) – $\alpha 1$ -субъединица рецептора ГАМК-A.

мишеней [2–5]. Более того, эпилептиформная активность может быть связана с изменением экспрессии транспортеров Cl^- — K^+/Cl^- котранспортера 2 (KCC2) и $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортера 1 (NKCC1) в нейронах, что приводит к нарушению баланса Cl^- и, как следствие, к ослаблению ГАМК-ергического торможения и даже переключению эффекта ГАМК с торможения на возбуждение [6, 7].

Перспективным экспериментальным подходом для выявления генетически обусловленных механизмов эпилептогенеза является использование животных с генетической предрасположенностью к рефлекторным (аудиогенным) припадкам. В настоящее время существует несколько хорошо изученных линий крыс с аудиогенной чувствительностью, включая генетически предрасположенных к эпилепсии крыс (GEPR), аудиогенных крыс Вистар (WAR), аудиогенных крыс Вистар из Страсбурга (WAS) и крыс Крушинского—Молодкиной (KM) [8]. Повышенная восприимчивость к судорогам развивается у таких животных в постнатальном онтогенезе, что делает эти модели особенно удобными для изучения механизмов и динамики развития наследственной эпилепсии у человека.

Электрофизиологические исследования животных, генетически склонных к аудиогенным припадкам, показали, что одиночные звуковые стимулы вызывают эпилептиформную активность в стволе мозга, а ключевой структурой, ответственной за запуск АГП, являются нижние бугры четверохолмия (НБЧ) [9–11]. В то же время предыдущие исследования показали, что животные, склонные к аудиогенным припадкам, демонстрируют ряд изменений в ГАМК-ергической системе НБЧ, включая аномально низкий синтез ГАМК и снижение экспрессии KCC2 [12–15]. Действительно, такие изменения могут способствовать повышенной возбудимости этой структуры мозга и развитию рефлекторной эпилепсии. Однако дисбаланс ГАМК наблюдался в основном у животных, подвергавшихся звуковой стимуляции, что затрудняет разграничение наследственных и вызванных судорогами изменений. Тем не менее, разумно предположить, что у крыс, склонных к аудиогенной эпилепсии, постнатальное развитие связано с аномальным формированием нейронных связей, которое опосредовано наличием генетически обусловленных аберраций в ГАМК-ергической системе, что обуславливает восприимчивость к судорогам во взрослом возрасте.

У грызунов первые недели постнатального развития являются критическим периодом для становления ГАМК-ергической системы в НБЧ. В НБЧ здоровых крыс ГАМК-ергические клетки обнаруживаются с 8-го дня постнатального периода (P8), а к концу первого месяца жизни их количество уже не отличается от взрослых животных [16]. Более того, раннее постнатальное развитие связано с постепенным увеличением экспрессии KCC2 в нейронах, что необходимо для установления тормозного (гиперполяризующего) действия ГАМК, которое наблюдается к концу второй недели жизни [17, 18]. С другой стороны, практически нет данных о развитии ГАМК-ергической системы у лабораторных грызунов с наследственной эпилепсией. Чтобы хотя бы частично восполнить недостающую информацию, мы проанализировали созревание этой системы в НБЧ крыс KM в постнатальном онтогенезе.

Аудиогенная рефлекторная эпилепсия у крыс KM полностью формируется к 3-му месяцу жизни [19]. На более ранних стадиях постнатального развития крысы KM либо не реагируют на звуковую стимуляцию, либо демонстрируют неполный паттерн припадков, который обычно включает в себя только фазу дикого бега. Ранее мы продемонстрировали задержку постнатального морфогенеза НБЧ аудиогенных крыс KM по сравнению с контрольными крысами Вистар [20]. Более того, анализ GAD67, парвальбумина (PV) и синапсина 1 выявил аномальное функционирование ГАМК-ергических нейронов в НБЧ крыс KM как в молодом, так и во

взрослом состоянии [21]. В настоящем исследовании мы продолжили изучение НБЧ крыс КМ, уделяя особое внимание ГАМК-ергической трансмиссии. Полученные результаты позволяют выявить генетически обусловленные изменения в созревании тормозных цепей в НБЧ и предположить вклад наблюдаемых изменений в формирование повышенной судорожной готовности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В наших экспериментах использовались самцы и самки крыс КМ (Московский государственный университет, Россия). Эти крысы были выведены путем близкородственного скрещивания крыс Вистар, и в настоящее время все животные демонстрируют клонико-тонические судороги в ответ на интенсивную (10 кГц) звуковую стимуляцию. Предрасположенность к аудиогенной эпилепсии крыс КМ развивается в постнатальном онтогенезе и полностью формируется в возрасте 3–3.5 мес.

Для выявления генетически обусловленных aberrаций в ГАМК-ергической системе НБЧ мы использовали наивных крыс КМ, которые ранее не подвергались звуковой стимуляции и не имели опыта АГП до окончания эксперимента. Были исследованы три возрастные группы крыс КМ: 1) животные в возрасте 15 дней (P15, $n = 8$), когда происходит активный морфогенез НБЧ; 2) двухмесячные животные (P60, $n = 8$) с завершенным развитием НБЧ; 3) четырехмесячные животные (P120, $n = 8$), которые демонстрируют полностью развитую предрасположенность к АГП. В качестве контроля использовали крыс Вистар соответствующего возраста ($n = 8$ для каждой возрастной группы). Все животные содержались в стандартных клетках вивария при свето-темновом цикле 12/12 и свободном доступе к пище и воде.

Пробоподготовка

Четырех животных из каждой экспериментальной группы глубоко анестезировали путем внутривенной инъекции смеси золетил/ксилазин (60 мг/кг + 10 мг/кг; Virbac, Франция), перфузировали транскардиально фосфатно-буферным солевым раствором (PBS), затем 4%-ным параформальдегидом (PFA) и декапитировали. Мозг всех животных был извлечен, постфиксирован в 4%-ном PFA при +4°C (5 дней), затем погружен в 15%-ный раствор сахарозы для криозащиты (3 дня), затем заморожен и хранился при –80°C для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

Других четырех животных из каждой группы декапитировали, мозг извлекали, делили на полушария, а затем препарировали НБЧ. НБЧ из обоих полушарий всех этих животных использовали для Вестерн-блот анализа.

Иммуногистохимия

Серии срезов мозга (во фронтальной плоскости) толщиной 10 мкм изготавливали с помощью криостата Leica. Иммуногистохимический анализ проводили в соответствии со стандартным протоколом с биотин-стрептавидином. Криосрезы (10 мкм), содержащие НБЧ, инкубировали с первичными антителами (табл. 1) в течение ночи при комнатной температуре. Затем срезы промывали в PBS, инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами (табл. 1) с последующей инкубацией с комплексом стрептавидин-пероксидаза (1 : 500, Supelco, #S2438) в течение 1 ч. Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 3,3'-диаминобензидин (ДАБ, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%). Чтобы проверить специфичность окрашивания, мы провели отрицательный контроль (тот же протокол без первичных антител), который показал отсутствие окрашивания. Наконец, срезы обезвоживали и накрывали покровным стеклом.

Таблица 1. Используемые антитела для иммуногистохимии (ИГХ) и Вестерн-блот анализа (WB)

Антитела	Производитель	Разведение для ИГХ	Разведение для WB
Первичные антитела			
KCC2 Polyclonal Antibody	Invitrogen, #PA5-78544	1 : 250	1 : 1000
Na-K-Cl cotransporter Monoclonal Antibody	DSHB Hybridoma Product, # t4	1 : 100	1 : 500
GABA-AR alpha 1 Antibody	Novusbio, #NB300-191	1 : 100	1 : 1000
VGAT Polyclonal Antibody	Invitrogen, #PA-27569	—	1 : 1000
Actin Monoclonal antibody	Abcam, #ab3280	—	1 : 2000
Вторичные антитела			
Goat Anti-Mouse IgG antibody (H + L), biotinylated	Vector Laboratories, #BA-9200	1 : 500	—
Goat anti-rabbit IgG antibody (H + L), biotinylated	Vector Laboratories, #BA-1000	1 : 500	—
Anti-rabbit IgG (whole molecule)—peroxidase antibody produced in goat	Sigma-Aldrich, #A0545	—	1 : 10000
Anti-Mouse IgG (whole molecule)—Peroxidase antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich, #A9044	—	1 : 40000

Обработка срезов

Обработку срезов проводили в стандартных условиях в каждом эксперименте, т.е. контрольные и экспериментальные группы в каждом эксперименте собирали, фиксировали и обрабатывали для анализа одновременно. Анализ иммуноокрашивания в НБЧ проводили с использованием изображений, полученных с помощью объектива 20×/0.5 на микроскопе Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Для анализа каждого исследуемого белка отбирали каждый 15-й срез. Всего для каждого животного было проанализировано пять срезов исследуемой зоны для каждого иммуноокрашивания.

Экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК-А рецепторов (GABAAR(α)), KCC2 и NKCC1 в центральном ядре НБЧ оценивали как оптическую плотность иммунопозитивного вещества на 8-битных изображениях с использованием программы ImageJ (версия 6.0). Оптическую плотность фона оценивали на том же срезе в неиммунореактивной ткани мозга.

Вестерн-блот анализ

Образцы НБЧ гомогенизировали в лизирующем буфере (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА), содержащем ингибиторы протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и cocktail ингибиторов фосфатаз (Roche, #04 906 837 001), используя механический гомогенизатор при 4°C. Нерастворимые материалы удаляли центрифугированием. Общее содержание белка в образцах определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в качестве стандарта. Супернатант смешивали в соотношении 2 : 1 с 3× буфером для нанесения проб (0.2 M Трис-HCl pH 6.7, 6% додецилсульфат натрия, 15% глицерин, 0.003% бромфеноловый синий и 10% β -меркаптоэтанол) и инкубировали 10 мин при 96°C. Равные количества образцов (10 мкг белка на лунку геля) загружали для электрофореза, белки разделяли на 10%-ном полиакриламидном геле, а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3718). Мембраны инкубировали в

5%-ном обезжиренном молоке или 3%-ном БСА в Трис-буфере с добавлением детергента Tween (TBST) (0.1% Tween 20, 20-мМ Трис, 137-мМ NaCl; pH 7.4) в течение 1 ч, а затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами (табл. 1). После этого мембраны промывали в буфере TBST и инкубировали с конъюгированными с пероксидазой вторичными антителами против кролика или мыши (табл. 1) в течение 1 ч при комнатной температуре. Специфические белковые полосы визуализировали с помощью хемилюминесцентной реакции с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, США).

Денситометрический анализ содержания белка проводили с помощью программы ImageJ (версия 6.0). Экспрессию везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в НБЧ оценивали путем нормализации к актину. Детекцию белков, используемых для нормализации, проводили с использованием тех же мембран, что и детекцию белков интереса.

Статистический анализ

Все данные, полученные с помощью Вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени и иммуногистохимического анализа, обрабатывались статистически с помощью *U*-критерия Манна–Уитни с использованием программного обеспечения GraphPad 7. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В наших экспериментах мы использовали наивных крыс КМ, не подвергавшихся ранее звуковому воздействию и не испытывавших аудиогенных припадков. В качестве контроля использовали крыс Вистар. Исследовались животные трех возрастных групп: 1) 15 дней (P15), когда происходит активный морфогенез НБЧ; 2) 2 мес. (P60), когда развитие НБЧ завершено, но крысы КМ не демонстрируют стабильных аудиогенных припадков; 3) 4 мес. (P120), когда способность крыс КМ к АГП полностью сформирована.

Анализ ГАМК-ергической системы в нижних буграх четверохолмия (НБЧ)

Во-первых, мы проанализировали экспрессию везикулярного транспортера ГАМК VGAT, который отвечает за загрузку ГАМК из цитоплазмы ГАМК-ергических нейронов в синаптические везикулы [22]. Наши данные, полученные методом Вестерн-блот не выявили различий в экспрессии VGAT в НБЧ между крысами КМ и Вистар на P15 и P120, однако в НБЧ 2-месячных крыс КМ (P60) экспрессия VGAT была значительно повышена по сравнению с характерной для крыс линии Вистар этого возраста (рис. 1).

Для оценки постсинаптических эффектов мы провели анализ экспрессии белков, отвечающих за эффекты ГАМК в клетках-мишенях нижних бугров четверохолмия. В первую очередь оценили уровень экспрессии $\alpha 1$ -субъединицы постсинаптического ГАМК-А рецептора (GABAAR(α)), которая является обязательным компонентом рецептора, участвующим в связывании ГАМК [23]. Иммуногистохимический анализ выявил повышенную экспрессию GABAAR(α) у крыс КМ на 15-й день жизни, тогда как в других возрастных группах (P60, P120) она не отличалась от соответствующего контроля Вистар (рис. 2a, 2b).

Кроме того, мы проанализировали экспрессию активных транспортеров Cl^- , KCC2 и NKCC1, которые поддерживают баланс Cl^- в клетках-мишенях путем на-

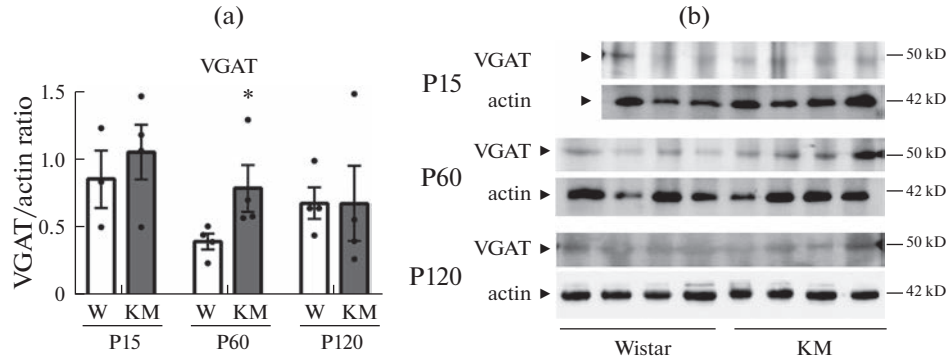


Рис. 1. Экспрессия везикулярного транспортера ГАМК VGAT в нижних буграх четверохолмия (НБЧ) крыс Крушинского—Молодкиной (KM) и Вистар в постнатальном онтогенезе. (а) Вестерн-блот анализ везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в НБЧ не выявил различий между крысами Вистар (W) и KM на 15-й (P15) и 120-й (P120) дни постнатального развития, однако на 60-й день (P60) экспрессия VGAT была повышена в НБЧ крыс KM. Данные Вестерн-блот анализа представлены как среднее $\pm$ SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем. (б) Репрезентативные изображения иммуноблота VGAT и актина в НБЧ крыс KM и Вистар на соответствующих стадиях онтогенеза.

копления или вывода Cl^- соответственно [6]. Наши данные показали, что при P15 экспрессия KCC2 в НБЧ крыс KM не отличалась от характерной для крыс Вистар (рис. 2с, 2d), в то время как экспрессия NKCC1 была выше, чем у крыс Вистар, что, вероятно, указывает на увеличение притока Cl^- (рис. 2е, 2f). В возрасте P60 экспрессия обоих транспортеров не отличалась между крысами KM и Вистар (рис. 2с–f). Однако у 4-месячных крыс KM наблюдалась аномально низкая экспрессия KCC2 наряду с неизменным NKCC1 (рис. 2с–f). Наблюдаемые изменения могут указывать на изменение внутриклеточного баланса Cl^- с повышением его эффлюкса у взрослых животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы проанализировали зависящие от возраста изменения экспрессии ключевых белков, ответственных за синтез, синаптическую передачу и постсинаптические эффекты ГАМК в НБЧ крыс KM в трех онтогенетических точках — P15, P60 и P120.

15-й постнатальный день (P15)

Согласно данным литературы, конец второй постнатальной недели — это период, когда нормальный морфогенез НБЧ обычно завершается, хотя некоторые процессы развития продолжают до конца первого месяца [16, 24]. Наши предыдущие данные показали, что двухнедельные крысы KM все еще демонстрировали повышенную пролиферацию и апоптоз в НБЧ, что указывает на задержку созревания этой структуры по сравнению с нормальными крысами (Вистар) [20]. Более того, наши предыдущие исследования показали, что в НБЧ крыс KM в этот период времени экспрессия основного фермента синтеза ГАМК GAD67 была такой же, как в контроле, что указывает на отсутствие изменений в синтезе ГАМК. PV — кальций-связывающий белок, являющийся маркером активных ГАМК-ергических нейронов. Количество PV-позитивных клеток у 15-дневных крыс KM было ниже, чем у

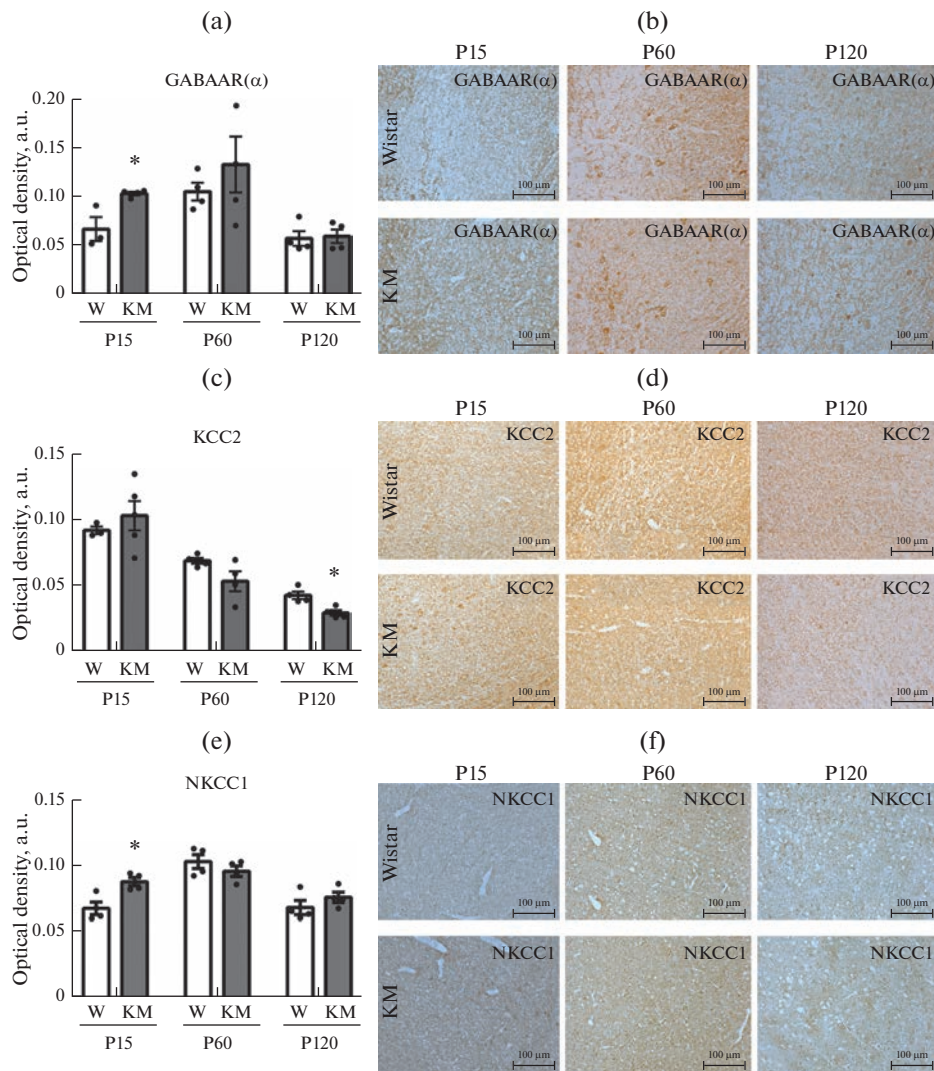


Рис. 2. Экспрессия белков, отвечающих за эффекты γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в клетках-мишенях нижних бугров четверохолмия (НБЧ) крыс Крушинского–Молодкиной (КМ) и Вистар в постнатальном онтогенезе. (a) – Иммуногистохимический анализ показал повышенную экспрессию $\alpha 1$ -субъединицы рецепторов ГАМК-А (GABAAR ($\alpha 1$)) в НБЧ крыс КМ в возрасте P15, в то время как в другие возрастные сроки она не отличалась от таковой у крыс Вистар. (b) – Репрезентативные микрофотографии ИГХ GABAAR(α) в центральном ядре НБЧ крыс Вистар и КМ в P15, P60 и P120. (c) – Экспрессия K^+/Cl^- котранспортера (KCC2) в НБЧ крыс КМ не отличалась от контроля Вистар в возрасте P15 и P60, но была значительно снижена в P120. (d) – Репрезентативные микрофотографии ИГХ KCC2 в центральном ядре НБЧ крыс Вистар и КМ в P15, P60 и P120. (e) – Экспрессия $Na^+/K^+/Cl^-$ котранспортера 1 (NKCC1) в НБЧ крыс КМ, напротив, была повышена в P15, но не в других временных точках. (f) – Репрезентативные микрофотографии ИГХ NKCC1 в центральном ядре НБЧ крыс Вистар и КМ в P15, P60 и P120. Графики (a), (c), (e) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества в относительных единицах (a.u.). Иммуногистохимические данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Масштабные линейки: 100 мкм.

Вистар, что указывает на снижение активности ГАМК-ергических клеток [25]. Эти изменения сопровождались снижением активности синапсина 1, что указывает на снижение синаптической передачи, и в частности на ослабление высвобождения ГАМК [25]. Вероятно, эти данные указывают на задержку формирования ГАМК-ергической системы в НБЧ крыс КМ на ранних этапах постнатального развития.

В настоящей работе получены новые данные, дополняющие картину дисрегуляции ГАМК в НБЧ крыс КМ в первые месяцы постнатального развития. Так, анализ VGAT, ответственного за загрузку ГАМК в синаптические везикулы, не выявил изменений у 15-дневных крыс КМ, но повышенная экспрессия постсинаптических рецепторов GABAAR(α 1) указывала на снижение связывания ГАМК и интернализации рецептора [26, 27], что связано с описанной ранее дисрегуляцией ГАМК-ергической передачи.

Постсинаптические эффекты ГАМК тесно связаны с балансом Cl^- в клетках-мишенях, который, в свою очередь, зависит от экспрессии и активности транспортеров ионов хлора KCC2 и NKCC1 [6]. Более того, предполагается, что изменения в соотношении экспрессии KCC2 и NKCC1 являются ключевым механизмом, который регулирует переключение эффекта ГАМК с возбуждения на торможение во время постнатального развития всего мозга [28, 29]. В первые постнатальные дни преобладает экспрессия NKCC1, а экспрессия KCC2 низкая, что поддерживает относительно высокую внутриклеточную концентрацию Cl^- и деполяризующее действие ГАМК [30, 31]. Затем, в течение первых двух недель, активный синаптогенез сопровождается увеличением экспрессии KCC2, что приводит к усиленному выведению Cl^- из клеток и установлению гиперполяризующего эффекта ГАМК [17, 18]. Наше исследование не выявило изменений по сравнению с крысами Вистар в экспрессии KCC2 в НБЧ 15-дневных крыс КМ, однако наблюдалась аномально повышенная экспрессия NKCC1. Эти данные недостаточны для предположения о задержке переключения возбуждающей функции ГАМК на тормозную в НБЧ. Тем не менее, повышение экспрессии NKCC1 может быть связано с увеличением притока Cl^- в клетки-мишени ГАМК, что приводит к ухудшению тормозного действия ГАМК, в дополнение к снижению высвобождения ГАМК.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что к концу второй постнатальной недели активность ГАМК-ергических нейронов и ГАМК-ергическая нейротрансмиссия были аномально снижены в НБЧ крыс КМ. Поскольку этот период связан с активным созреванием ГАМК-ергической системы в этой структуре мозга, наши результаты свидетельствуют о генетически обусловленной задержке становления тормозных ГАМК-ергических проекций в НБЧ крыс КМ.

60-й постнатальный день (P60)

Согласно нашим предыдущим исследованиям, к концу второго месяца развитие НБЧ у крыс КМ завершается, поскольку количество клеток, пролиферация и апоптоз больше не отличаются от контроля Вистар [20]. Однако повышенное число GAD67- и PV-позитивных клеток и повышенная активность синапсина 1 в НБЧ двухмесячных крыс КМ указывали на повышенную активность ГАМК-ергической системы в этом слуховом центре. Наши данные показали также увеличение экспрессии VGAT в НБЧ, что дополнительно указывает на повышенную активность высвобождения ГАМК. Экспрессия GABAAR(α 1) рецепторов и транспортеров Cl^- в НБЧ достигла контрольного уровня. Таким образом, поскольку НБЧ является критической структурой, ответственной за запуск АГП, наблюдаемое усиление тормозной передачи может быть одним из основных факторов, препятствующих стабильной экспрессии АГП у крыс КМ данного возраста.

120-й постнатальный день (P120)

Анализ взрослых крыс КМ с полностью сформированной способностью к АСП также продемонстрировал значительные отличия в состоянии ГАМК-ергической системе НБЧ по сравнению с крысами родительской линии Вистар. Ранее мы обнаружили аномально низкую экспрессию GAD67 и PV в центральных ядрах НБЧ взрослых крыс КМ, что указывает на снижение функциональной активности ГАМК-ергических нейронов [21]. Ранее у крыс КМ не было показано нарушений в числе ГАМК-ергических нейронов в НБЧ относительно контрольной линии крыс КМ "0", не проявляющих аудиогенной эпилепсии [32]. При этом уровень экспрессии mPNC GAD67 оказался у крыс КМ выше в пять раз. Однако в данном случае крыс, подверженных аудиогенной эпилепсии, не сравнивали с крысами родительской линии Вистар, что, возможно, объясняет расхождение в полученных результатах. Наши данные также показали значительное снижение экспрессии KCC2, что позволило нам предположить снижение эффлюкса Cl^- в клетках, получающих ГАМК-ергическую иннервацию и экспрессирующих ГАМК-А рецепторы, и, следовательно, ухудшение гиперполяризующего действия ГАМК в НБЧ. Таким образом, резкое ослабление ГАМК-ергической передачи, наряду с нарушением баланса Cl^- в клетках-мишенях, может вносить значительный вклад в повышенную возбудимость НБЧ у взрослых крыс КМ и опосредовать наступление полностью сформированной судорожной готовности.

Интересно, что исследования других грызунов с предрасположенностью к аудиогенным судорогам показали противоположные изменения в ГАМК-ергической системе НБЧ. Так, в центральном ядре НБЧ крыс GEPR-9 наблюдалось повышенное количество GAD67-позитивных нейронов, что указывает на усиление выработки ГАМК [10]. Кроме того, хомяки, генетически предрасположенные к аудиогенным судорогам (GASH:Sal) продемонстрировали неизменную экспрессию KCC2 в НБЧ [15]. Хотя проявление рефлекторных припадков у разных видов животных сходны, вероятно, наблюдаемые расхождения можно объяснить различными генетическими аномалиями, которые в ходе постнатального развития приводят к возникновению разных нейрхимических нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования, наряду с предыдущими результатами [21], позволили нам сравнить постнатальное развитие ГАМК-ергической системы в НБЧ крыс КМ, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам, и предположить возможный вклад генетически обусловленных изменений в восприимчивость к АГП. В ранние сроки постнатального развития (конец второй постнатальной недели) у крыс КМ наблюдалось снижение активности ключевых маркеров ГАМК-ергической системы в НБЧ по сравнению с крысами Вистар. Кроме того, измененная экспрессия транспортеров Cl^- KCC2 и NKCC1 в этой структуре мозга указывала на дисбаланс Cl^- в нейронах-мишенях и, следовательно, на нарушение ГАМК-опосредованного торможения. Эти результаты подтверждают замедленное созревание ГАМК-ергической системы в НБЧ, что может лежать в основе патологических изменений в дальнейшем, у взрослых крыс КМ.

К концу второго постнатального месяца (P60) у крыс КМ наблюдалась стабилизация и даже повышение уровня ГАМК-передачи в НБЧ. Однако у взрослых животных с полностью сформировавшейся судорожной готовностью (P120) функциональная активность ГАМК-ергических клеток была значительно снижена, а аномально низкий уровень KCC2 вновь позволил предположить нарушение ГАМК-опосредованной гиперполяризации в нейронах НБЧ. С другой стороны,

предыдущий анализ возбуждающей (глутаматергической) системы не выявил никаких нарушений в НБЧ взрослых крыс КМ [21]. Таким образом, генетически обусловленная дисфункция тормозной передачи может быть одним из основных факторов повышенной возбудимости НБЧ у крыс КМ, способствуя функционированию НБЧ как триггерной структуры аудиогенного судорожного припадка.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведению экспериментов на животных и были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (код протокола 6-3/2022, 23 июня 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данное исследование было поддержано программой Правительства РФ № 075-967-23-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация (С.Д.Н., Е.В.Ч.); методология (А.А.Н., Е.В.Ч.); формальный анализ (А.А.Н., А.П.И.); исследование (А.П.И., С.Д.Н., А.А.Н.); курирование данных (Е.В.Ч.); написание — подготовка первоначального проекта (А.П.И., Е.В.Ч.); рецензирование и редактирование (А.А.Н., М.В.Г.); визуализация (А.П.И., С.Д.Н., А.А.К.); контроль (М.В.Г.); получение финансирования (Е.В.Ч.). Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть анализа была проведена в Научно-исследовательском ресурсном центре № 441590 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blauwblomme T, Dossi E, Pellegrino C, Goubert E, Iglesias BG, Sainte-Rose C, Rouach N, Nabhout R, Huberfeld G* (2019) Gamma-aminobutyric acidergic transmission underlies interictal epileptogenicity in pediatric focal cortical dysplasia. *Ann Neurol* 85: 204–217. <https://doi.org/10.1002/ana.25403>
2. *Wang Y, Wang Y, Chen Z* (2018) Double-edged GABAergic synaptic transmission in seizures: The importance of chloride plasticity. *Brain Res* 1701: 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.008>
3. *Houser CR* (2014) Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol* 813: 151–160. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8914-1_12
4. *Goodkin HP, Yeh JL, Kapur J* (2005) Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* 25: 5511–5520. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0900-05.2005>
5. *Scharfman HE, Brooks-Kayal AR* (2014) Is plasticity of GABAergic mechanisms relevant to epileptogenesis? *Adv Exp Med Biol* 813: 133–150. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8914-1_11
6. *Liu R, Wang J, Liang S, Zhang G, Yang X* (2019) Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front Neurol* 10: 1407. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01407>

7. Palma E, Amici M, Sobrero F, Spinelli G, Di Angelantonio S, Ragozzino D, Mascia A, Scoppetta C, Esposito V, Miledi R, Eusebi F (2006) Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8465–8468.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602979103>
8. Vinogradova LV (2017) Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *Epilepsy Behav* 71: 142–153.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.06.014>
9. Faingold CL (1999) Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv Neurol* 79: 311–321.
10. Ribak CE (2017) An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Behav* 71: 160–164.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.02.024>
11. Ribak CE, Morin CL (1995) The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures. *Anat Embryol (Berl)* 191: 279–295.
<https://doi.org/10.1007/BF00534681>
12. Lasley SM (1991) Roles of neurotransmitter amino acids in seizure severity and experience in the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res* 560: 63–70.
13. Simler S, Ciesielski L, Clement J, Rastegar A, Mandel P (1992) Involvement of synaptosomal neurotransmitter amino acids in audiogenic seizure-susceptibility and -severity of Rb mice. *Neurochem Res* 17: 953–959.
<https://doi.org/10.1007/BF00993272>
14. Fuentes-Santamaria V, Alvarado JC, Herranz AS, Garcia-Atares N, Lopez DE (2008) Decreased levels of GABA in the inferior colliculus of the epilepsy-prone hamster (GPG/Vall). *Epilepsy Res* 79: 224–227.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.02.003>
15. Prieto-Martin AI, Aroca-Aguilar JD, Sanchez-Sanchez F, Munoz LJ, Lopez DE, Escribano J, de Cabo C (2017) Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. *Epilepsy Behav* 71: 218–225.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.025>
16. Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 367: 90–109.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960325\)367:1<90::AID-CNE7>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960325)367:1<90::AID-CNE7>3.0.CO;2-E)
17. Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann HJ, Kilb W (2007) Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27: 8616–8627.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5041-06.2007>
18. Valeeva G, Valiullina F, Khazipov R (2013) Excitatory actions of GABA in the intact neonatal rodent hippocampus in vitro. *Front Cell Neurosci* 7: 20.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00020>
19. Федотова ИБ, Семиохина АФ (2002) Аудиогенная эпилепсия и миоклонус в онтогенезе крыс КМ. *Журн высш нерв деят* 52(2): 261–265. [Fedotova IB, Semiokhina AF (2002) Developmental changes in audiogenic epilepsy and myoclonus in KM rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 52(2): 261–265. (In Russ)].
20. Chernigovskaya EV, Dorofeeva NA, Nasluzova EV, Kulikov AA, Ovsyannikova VV, Glazova MV (2018) Apoptosis and proliferation in the inferior colliculus during postnatal development and epileptogenesis in audiogenic Krushinsky-Molodkina rats. *Epilepsy Behav* 88: 227–234.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.09.023>
21. Chernigovskaya EV, Dorofeeva NA, Lebedenko OO, Nikolaeva SD, Naumova AA, Lavrova EA, Glazova MV (2019) Neurochemical Organization of the Inferior Colliculus in Audiogenic Krushinsky-Molodkina Rats During Development of Seizure Susceptibility. *Russ J Physiol* 105: 724–741.
<https://doi.org/10.1134/S0869813919060013>
22. Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18: 9733–9750.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09733.1998>
23. Olsen RW, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56: 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.045>
24. Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H (1993) Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69: 236–242.
[https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90113-f](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90113-f)
25. Chernigovskaya EV, Korotkov AA, Dorofeeva NA, Gorbacheva EL, Kulikov AA, Glazova MV (2019) Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with over-activation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. *Epilepsy Behav* 99: 106494.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106494>

26. *Leidenheimer NJ* (2008) Regulation of excitation by GABA(A) receptor internalization. *Results Probl Cell Differ* 44: 1–28.
https://doi.org/10.1007/400_2007_039
27. *Barnes EM Jr* (1996) Use-dependent regulation of GABAA receptors. *Int Rev Neurobiol* 39: 53–76.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(08\)60663-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(08)60663-7)
28. *Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG* (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci* 26: 10407–10419.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-06.2006>
29. *Lu J, Karadshah M, Delpire E* (1999) Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 39: 558–568.
30. *Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K* (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience* 104: 933–946.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00149-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00149-x)
31. *Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K* (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 59–66.
[https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00536-9](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00536-9)
32. *Solius GM, Revishchin AV, Pavlova GV, Poletaeva II* (2016) Audiogenic epilepsy and GABAergic system of the colliculus inferior in Krushinsky-Molodkina rats *Dokl Biochem Biophys* 466: 32–34.
<https://doi.org/10.1134/S1607672916010099>

Dysregulation of GABAergic System in the Inferior Colliculi of Rats during the Development of Audiogenic Epilepsy

**S. D. Nikolaeva^a, A. P. Ivlev^a, A. A. Naumova^a, A. A. Kulikov^a,
M. V. Glazova^a, *, and E. V. Chernigovskaya^a**

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

**e-mail: mglazova@iephb.ru*

Epilepsy is tightly associated with dysfunction of inhibitory GABA neurotransmission. In this study, Krushinsky–Molodkina (KM) rats genetically prone to audiogenic seizures (AGS) were used. KM rats are characterized by the development of audiogenic epilepsy during postnatal ontogenesis, with AGS onset at the age of 1.5–2 months and fully developed AGS expression by 3rd month. We analyzed GABAergic system of the inferior colliculi (IC) of KM rats at different stages of postnatal development. Wistar rats were used as a control. In the IC of young KM rats, Na⁺/K⁺/Cl[−] cotransporter 1 (NKCC1) expression was increased, while K⁺/Cl[−] cotransporter 2 (KCC2) was unchanged indicating impairment of postsynaptic GABA action at early stages of postnatal development. Moreover, we revealed also an increase in the expression of vesicular GABA transporter (VGAT) in the IC which additionally pointed on the higher activity of GABA release. In adult rats, in opposite, we revealed a decrease in the expression of KCC2 transporter indicating downregulation of GABA inhibition on the target cells. Thus, GABA dysregulation in the IC can mediate the seizure susceptibility in adult KM rats.

Keywords: Krushinsky–Molodkina rats, audiogenic seizures, inferior colliculi, postnatal ontogenesis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ МЕТИЛОБОГАЩЕННОЙ ДИЕТЫ МАТЕРИ НА ЧИСЛО
ДОФАМИНОВЫХ НЕЙРОНОВ В ВЕНТРАЛЬНОЙ ТЕГМЕНТАЛЬНОЙ
ОБЛАСТИ МОЗГА У ВЗРОСЛОГО ПОТОМСТВА КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij**

© 2023 г. Е. А. Федосова¹ *, Н. А. Логинова¹, К. Ю. Саркисова¹

¹*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

**E-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

Поступила в редакцию 14.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Крысы линии WAG/Rij являются генетической моделью абсанс-эпилепсии с коморбидной депрессией. Показано, что патологический фенотип у крыс линии WAG/Rij связан с пониженным дофаминовым (ДА) тонусом в мезолимбической системе мозга. Ранее было обнаружено, что материнская метилобогащенная диета (МОД) в перинатальном периоде повышает содержание ДА в мезолимбической ДА-ергической системе мозга и уменьшает проявление абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Вентральная тегментальная область (ventral tegmental area, VTA), содержащая тела ДА-ергических клеток, является главным источником синтеза мезолимбического ДА. Цель настоящей работы – проверить гипотезу о том, что повышение ДА-ергического тонуса мезолимбической системы мозга, вызываемое материнской МОД у потомства, может быть обусловлено увеличением числа ДА-ергических нейронов, активно синтезирующих тирозингидроксилазу (ТН) в VTA, которая является началом мезокортикального и мезолимбического ДА-ергических путей. Использовали метод иммуногистохимического окрашивания на ТН для оценки числа ТН-иммунопозитивных клеток у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими контрольную диету или МОД, и подвергнутых и не подвергнутых поведенческому тестированию в течение 2 дней подряд в тестах свето-темнового выбора, открытого поля, приподнятого крестообразного лабиринта и вынужденного плавания. Через 1 ч после теста вынужденного плавания была проведена транскардиальная перфузия с целью фиксации головного мозга. Число ДА-ергических нейронов определяли по числу ТН-иммунопозитивных клеток на срезах мозга на уровне VTA. Число ТН-иммунопозитивных клеток подсчитывали в левом и правом полушариях мозга в отдельности. Установлен значимый эффект МОД матери на число клеток в VTA, экспрессирующих ТН. У взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, число ТН-иммунопозитивных клеток было больше по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими контрольную диету. Кроме того, у потомства крыс, рожденного матерями, потреблявшими МОД, число ТН-иммунопозитивных клеток было больше у животных, подвергнутых поведенческому тестированию, по сравнению с животными, которых не подвергали поведенческому тестированию. Эффект материнской диеты и поведенческого тестирования на число ТН-иммунопозитивных клеток в VTA был выражен одинаково в правом и левом полушариях мозга. Результаты свидетельствуют о том, что материнская диета в перинатальном периоде может влиять на развитие мезолимбической ДА-ергической системы мозга, способствуя образованию и/или сохранности ДА-ергических

нейронов в VTA, и тем самым предотвращать возникновение генетической абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у потомства крыс линии WAG/Rij.

Ключевые слова: абсанс-эпилепсия, коморбидная депрессия, ДА-нейроны, VTA, материнская метилобогатая диета, мезолимбическая ДА-ергическая система мозга, крысы линии WAG/Rij

DOI: 10.31857/S086981392307004X, **EDN:** XLJPDM

ВВЕДЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij — генетическая модель наследственной абсанс-эпилепсии с коморбидной депрессией [1–3]. Характерным признаком абсанс-эпилепсии является наличие спонтанных генерализованных пик-волновых разрядов на ЭЭГ, которые сопровождаются прекращением текущей деятельности и отсутствием реакции на внешние стимулы [3]. Ранее было показано, что крысы линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar без судорожной патологии проявляют депрессивно-подобное поведение: пониженную исследовательскую активность в тесте открытого поля, повышенную иммобильность в тесте вынужденного плавания и пониженное потребление/предпочтение сахарозы в тесте потребления сахарозы [1–3]. К настоящему времени накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о дофамин (ДА)-зависимом характере проявлений как абсанс-эпилепсии [3–5], так и коморбидной депрессии [6–8] у крыс линии WAG/Rij.

Несмотря на то, что патологический фенотип у крыс линии WAG/Rij генетически обусловлен, он может быть модифицирован, в том числе под влиянием ранних средовых факторов, таких как материнская забота [9, 10], обогащенная/обедненная среда [11] и диета матери во время перинатального периода [11–16]. Фенотип является результатом взаимодействия генотипа и среды. Факторы внешней среды могут индуцировать эпигенетические модификации, которые способны изменить экспрессию генов. Во многих случаях именно регуляция экспрессии гена служит решающим фактором для изменения фенотипа. Известно несколько механизмов регуляции генной экспрессии, наиболее изученным из которых является метилирование ДНК. Это стабильная, наследуемая и обратимая за счет процесса деметилирования химическая модификация молекулы ДНК. Метилируется преимущественно цитозин в составе так называемых “CpG-островков”, которые присутствуют в промоторных областях (промоторах) многих генов. Метилирование в промоторной зоне гена, как правило, приводит к подавлению экспрессии соответствующего гена — негативная регуляция активности гена [17]. Метилирование ДНК также может повышать активность генов (позитивная регуляция) за счет связывания специальных m5CpG ДНК-связывающих белков с метилированными промоторами генов, что является необходимым условием для активации белков транскрипционного аппарата [18]. Метилирование ДНК особенно активно происходит в эмбриональный период и вскоре после рождения; определенный паттерн метилирования ДНК может сохраняться в течение всей жизни организма, а иногда и передаваться следующим поколениям [17].

С помощью изменения состава материнской диеты во время беременности удобно изучать влияние метилирования ДНК на экспрессию генов и проявление различных признаков у потомства животных-генетических моделей различных патологий [12–16]. В этих случаях транскрипция нуклеотидной последовательности гена может зависеть от количества метильных групп в определенном участке: если их много, транскрипция гена неактивна, но становится активной с их уменьшением (негативная регуляция экспрессии генов) [17, 19] или, наоборот, с увеличением (позитивная регуляция экспрессии генов) [18]. Для эпигенетической коррекции

различных патологий важно наличие в пищевом рационе матери незаменимой аминокислоты метионина (предшественника универсального донора метильной группы — S-аденозилметионина), а также компонентов цепи его метаболизма — холина, бетаина, фолиевой кислоты, витамина B₁₂ и цинка [11, 14, 16]. Материнская диета, обогащенная донорами метильных групп и кофакторами одноуглеродного цикла, способствовала подавлению генетически обусловленных аудиогенных припадков у крыс линии “0” и “4”, которые выведены на основе популяции гибридов крыс линии Крушинского—Молодкиной и крыс Wistar. Подавление аудиогенных припадков было выражено больше у крыс линии “0”, которые характеризуются низкой интенсивностью аудиогенных припадков. Коррекция эпилептического фенотипа при этом сопровождалась изменением метилирования и экспрессии некоторых генов: *Cpne6*, *Gtf2i*, *Scnr*, *ISfmbt* и *Phe2* [16].

В наших предыдущих работах [12, 13] было обнаружено, что метилобогатая диета (МОД) матери во время перинатального периода уменьшает проявление абсанс-эпилепсии (уменьшает число пик-волновых разрядов без изменения их длительности) и коморбидной депрессии у крыс линии WAG/Rij. Коррекция патологического фенотипа у этих животных сопровождалась повышением экспрессии генов, в том числе гена тирозингидроксилазы (ТН) в прилежащем ядре [12, 13] — ключевой структуре мезолимбической ДА-ергической системы мозга, которая участвует в механизмах мотивации и подкрепления [7, 20]. ТН — это фермент, который лимитирует скорость биосинтеза ДА и норадреналина, превращая тирозин в диоксифенилаланин с использованием молекулярного кислорода и кофактора (тетрагидробиоптерина) [21]. Гипофункция мезолимбической ДА-ергической системы мозга является одним из ведущих механизмов патогенеза депрессивных расстройств у животных и человека [3], в том числе у крыс линии WAG/Rij [3, 7].

Результаты нашей предыдущей работы свидетельствуют о том, что коррекция патологического фенотипа у крыс линии WAG/Rij, вызываемая МОД матери [12, 13], сопровождается повышением ДА-ергического тонуса мезолимбической системы мозга [22]. Цель настоящей работы — проверить гипотезу о том, что повышение ДА-ергического тонуса в мезолимбической ДА-ергической системе мозга, вызываемое материнской МОД у потомства, может быть обусловлено увеличением числа ДА-ергических нейронов (активно синтезирующих ТН) в вентральной тегментальной области (ventral tegmental area, VTA), которая является началом мезокортикального и мезолимбического ДА-ергических путей [23]. Для достижения этой цели сопоставляли поведенческие показатели и число ДА-ергических нейронов в VTA у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД или контрольную диету (КД) во время перинатального периода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Работа выполнена на 20 6-месячных крысах-самцах линии WAG/Rij: 10 животных, рожденных матерями, потреблявшими МОД (экспериментальная группа) и 10 животных, рожденных матерями, потреблявшими КД (контрольная группа). Для получения потомства самкам крыс линии WAG/Rij предоставляли КД или МОД в течение одной недели до беременности, во время спаривания и беременности, а также в течение одной недели после рождения детенышей. На 1 кг пищи использовали следующие метилсодержащие добавки: холин — 5 г; бетаин — 15 г; фолиевая кислота — 15 мг; витамин B₁₂ — 1.5 мг; L-метионин — 7.5 г; цинк — 150 мг [16]. Метилсодержащие добавки смешивали с 4-зерновой кашей, творогом и свежими яйцами. Во время спаривания самцы потребляли ту же диету, что и самки [12, 13, 22].

Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде по 4–5 особей в клетке ($70 \times 40 \times 40$ см), в условиях естественного цикла день–ночь (день около 10 ч).

Схема эксперимента

Крысы экспериментальной и контрольной группы были разделены на 2 равные подгруппы, в каждой по 5 животных: одна из них подвергалась поведенческому тестированию, а другая — нет. Поведение оценивали в тестах открытого поля, светотемнового выбора, приподнятого крестообразного лабиринта и принудительного плавания. Животных подгруппы, которая подвергалась поведенческому тестированию, анестезировали через 1 ч после теста принудительного плавания. Мозг фиксировали с помощью транскраниальной перфузии. Фиксированный мозг извлекали из черепной коробки и замораживали, после чего делали срезы мозга на уровне VTA. Таким образом, срезы были получены у 4 групп животных:

- 1) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими МОД, которые подвергались поведенческому тестированию;
- 2) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими МОД, которые не подвергались поведенческому тестированию;
- 3) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими КД, которые подвергались поведенческому тестированию;
- 4) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими КД, которые не подвергались поведенческому тестированию.

Для идентификации DA-ергических нейронов в VTA использовали иммуногистохимический метод окраски на тирозингидроксилазу (TH), который показал высокую надежность [24]. Для идентификации общего числа тел нейронов в VTA в работе использовали метод окрашивания нервной ткани по Нисслю с применением красителя толуидиновый синий (“Биовитрум”, Россия) [25].

Поведенческие тесты

Для выявления различий в поведении между взрослым потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД или МОД, использовали общепринятые тесты для оценки уровня тревожности (тест открытого поля, светотемнового выбора и приподнятого крестообразного лабиринта) и депрессивности (тест принудительного плавания). В течение 5 дней до начала поведенческого тестирования животных адаптировали к таким экспериментальным процедурам, как хэндлинг, посадка в переносной ящик, транспортировка из вивария в экспериментальную комнату и обратно, чтобы уменьшить их анксиогенное влияние на поведение животных в тестах [3, 6].

Тесты для оценки уровня тревожности

Тест свето-темнового выбора (Light-dark choice test). Установка для проведения теста свето-темнового выбора представляла собой закрытую металлическую камеру, разделенную на два сообщающихся отсека: большой (36×18 см) освещенный (100 лк) и малый (18×17 см) темный (<5 лк). Время тестирования — 5 мин. Крысу помещали в светлую часть камеры хвостом ко входу в темный отсек и регистрировали латентный период захода в темный отсек, время нахождения в светлом и темном отсеке, число переходов между отсеками, число “оценок риска” (выглядывание крысы из темного отсека в светлый) и число стоек в светлом отсеке. Считается, что чем выше тревожность, тем меньше время пребывания в светлом отсеке, число

переходов из одного отсека в другой и тем больше число “оценок риска”, и наоборот [6].

Тест Открытого поля (Open-field test). Установка для проведения теста “Открытое поле” – круглая арена ($d = 90$ см), ограниченная стенкой ($h = 30$ см). “Открытое поле” было разделено на 32 квадрата, 4 центральных квадрата считали “центром” поля. Освещенность “поля” убывала от центра (80 лк) к стенкам (20 лк) арены. Время тестирования – 5 мин. Крысу помещали в центр поля, и регистрировали следующие показатели: латентный период достижения стенок арены (с), число пересеченных квадратов (двигательная активность), число выходов в центр “поля”, число стоек (с опорой и без опоры) и число реакций груминга (короткие – менее 5 с и длительные – более 5 с), а также число болюсов. Текущее поведение животного в тесте “Открытое поле” определяется соотношением между двумя мотивациями: исследовательской мотивации, вызываемой новизной обстановки, и мотивации страха (тревоги), вызываемой умеренным стрессогенным воздействием – открытое, хорошо освещенное пространство. Принято считать, что чем больше число выходов в центр “поля” и число стоек без опоры (осуществляются животными в более “опасной” части арены – ближе к ее центру), тем выше исследовательская мотивация животного [26]. Более низкая активность в тесте открытого поля обычно считается показателем более высокого уровня тревожности, и наоборот [6].

Приподнятый крестообразный лабиринт (Elevated plus-maze test). Установка для проведения теста “Приподнятый крестообразный лабиринт” представляет собой конструкцию из перекрещенных пар рукавов – двух закрытых (безопасная зона) и двух открытых (расцениваются животным как потенциально-опасные места). Длина каждого рукава составляет 50 см, ширина – 15 см, место перекреста рукавов образует открытую площадку в форме квадрата со стороной 15 см. Животное помещается на пересечении закрытых и открытых рукавов – в центр лабиринта. Регистрируют следующие показатели: латентный период захода в закрытые рукава лабиринта, время, проведенное в открытых и закрытых рукавах, число переходов между рукавами лабиринта, число “оценок риска” (выглядывание или частичный выход из закрытого рукава в открытый), число стоек и реакций груминга, число свешиваний (заглядываний вниз с открытых рукавов лабиринта). Время тестирования – 3 мин [3, 27].

Тест для оценки уровня депрессивности

Тест принудительного (вынужденного) плавания (Forced swimming test). Тест принудительного плавания – один из наиболее часто используемых тестов для оценки антидепрессантной активности фармакологических препаратов и для определения уровня депрессивности у животных. Тестирование проводили в цилиндрическом пластмассовом баке ($h = 47$ см, $d_{\text{внутр.}} = 38$ см), заполненном водой на высоту 38 см. Температуру воды поддерживали на уровне $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Время тестирования – 5 мин. Крысу помещали в воду и регистрировали латентный период 1-го эпизода активного плавания, длительность 1-го эпизода активного плавания (climbing), время иммобильности (immobility), число ныряний (diving) и время плавания (swimming) – общее время активного плавания, за исключением длительности 1-го эпизода активного плавания. Чем меньше время плавания и длительность 1-го эпизода активного плавания, и чем больше время иммобильности, тем выше уровень депрессивности, и наоборот [6].

Транскардиальная перфузия и получение образцов мозга

Через 60 мин после окончания поведенческих тестов крыс анестезировали введением наркоза (4%-ный раствор хлоралгидрата) и фиксировали мозг транскардиальной перфузией: вводили промывающий и фиксирующий растворы через левый желудочек сердца со сливом через надрез в правом предсердии. Растворы на одно животное: для промывки — 100 мл 0.9%-ного физиологического раствора (NaCl) с добавлением 20 мкл гепарина (0.02%-ный раствор); для фиксации — 300 мл 4%-ного раствора параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере. После перфузии проводили декапитацию. На следующий день мозг извлекали из черепной коробки и помещали в 4%-ный раствор параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере. Образцы хранили при -4°C . Перед заморозкой образцов их помещали в 20%-ный раствор сахарозы в 0.1 М фосфатном буфере. На следующий день мозг замораживали в парах жидкого азота.

Изготовление срезов и иммуногистохимическая окраска на ТН

Фронтальные срезы мозга толщиной 18 мкм изготавливали с помощью криостата MICROM HM 505E (Германия). Срезы монтировали на предметное стекло, покрытое 0.5%-ным раствором желатина с добавлением 0.1 г $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, таким образом, чтобы на одном стекле оказались срезы мозга крыс, принадлежащих разным экспериментальным группам. После изготовления срезов начинали процедуру иммуногистохимического окрашивания на ТН. С этой целью использовали следующие растворы и реактивы: 0.1 М раствор PBS — Phosphate buffered saline tablet (P4417-100TAB, Sigma, США). Для изготовления раствора использовали таблетки, которые, согласно инструкции производителя, растворяли исходя из расчета 1 таблетка соли на 200 мл дистиллированной воды.

Использовали следующие реактива: бычий сывороточный альбумин (BSA.0025, Диа-М, Россия); Тритон X-100 (194854, MP Biomedicals); первичные кроличьи антитела к ТН (ab 112, Abcam, США). В исследовании использовалось разведение 1 : 200. Набор для иммуногистохимической детекции HRP/DAB антител кролика (ABC-Kit, ab64261, Abcam, США), в котором использовались биотинилированные козы антитела к антителам кролика (Biotinylated Goat Anti-Rabbit), стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена (Streptavidin Peroxidase), концентрированный раствор DAB ($50\times$ DAB Chromogen), субстрат для DAB (DAB Substrate), блокирующий раствор: 10 мл PBS, в который добавляли 0.3 г BSA и 30 мкл тритона X-100. Раствор для разведения первичных антител содержал 10 мл PBS, в который добавляли 0.1 г BSA и 10 мкл тритона X-100.

Вся процедура окрашивания на ТН проходила при комнатной температуре и состояла в следующем: срезы в течение 30 мин инкубировали в блокирующем растворе при комнатной температуре. На срезы наносили 100 мкл первичных антител в разведении 1 : 200, стекла накрывали парафином и помещали во влажную камеру на ночь, на следующий день срезы трижды промывали PBS и инкубировали с PBS в течение 30 мин. На стекла наносили вторичные антитела (Biotinylated Goat Anti-Rabbit) и инкубировали в течение 10 мин. Далее срезы 4 раза промывали PBS, наносили стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена (Streptavidin Peroxidase) и инкубировали в течение 10 мин. После инкубации срезы 4 раза промывали PBS и наносили DAB. С этой целью перед употреблением концентрат DAB (1 капля) растворяли в 50 каплях субстрата для DAB (DAB Substrate). Срезы инкубировали в течение 10 мин под визуальным контролем, затем промывали в дистиллированной воде и заключали в глицерин под покрывное стекло.

Фотографирование срезов и подсчет числа ДА-ергических нейронов

Срезы с VTA фотографировали с помощью камеры ThorCam, установленной на микроскоп Axioplan 2 (Карл Цейс, Германия), при увеличении $\times 100$.

Подсчет числа ДА-ергических (ТН-иммунопозитивных клеток) проводили в каждом полушарии в отдельности. Анализировали 5 срезов с каждого образца головного мозга у каждой крысы. Подсчет числа нейронов в методе окраски по Ниссля проводили на фотографиях, сделанных при увеличении $\times 400$. Поле зрения площадью 0.09 мм^2 было поделено на 4 квадрата (площадь каждого из них — 0.0225 мм^2), в которых и проводили подсчет. На каждом стекле находилось по 4 среза мозга (по одному срезу из каждой группы).

Данные в тексте представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. На рисунке данные представлены в виде точек, каждая из которых означает индивидуальное значение для иллюстрации вариабельности внутри каждой группы.

Методика окрашивания нервной ткани по Ниссля

Фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготавливали с помощью криостата (НМ 505 Carl Zeiss, Германия). Срезы монтировали на предметное стекло. Для окраски по Ниссля использовали краситель толуидиновый синий (“Бiovитрум”, Россия). С этой целью срезы инкубировали в красителе в течение 1–2 мин, затем их ополаскивали в дистиллированной воде и 70%-ном спирте (в течение 2–5 мин). Срезы дифференцировали в 96%-ном спирте, проводили через 100%-ный спирт, толуол и заключали в смолу (витрогель, “Бiovитрум”, Россия) под покровное стекло. Фотографии срезов делали с помощью камеры (ThorLabs, США) при увеличении $\times 400$ (микроскоп Axioplan 2, Carl Zeiss, Германия). Число нейронов в методе окраски по Ниссля анализировали в отдельных полях зрения. На каждом стекле находилось по 4 среза мозга (по одному срезу из каждой группы).

Определяли число нейронов, у которых срез прошел через ядро и ядрышко ядра сателлитной глии, удаленной от нейрона на расстояние, не превышающее диаметр ядра глиальной клетки; ядра свободной глии, удаленной от нейрона на расстояние, превышающее диаметр ядра глиальной клетки.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета статистических программ “STATISTICA 6.0”. Для оценки фактора “диета матери” и фактора “поведенческое тестирование” при оценке числа нейронов (окраска по Ниссля) и числа ТН-иммунопозитивных клеток (иммуногистохимическое окрашивание) в правом и левом полушарии мозга использовали двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (two-way ANOVA with repeated measures). Для сравнения различий поведенческих показателей между группами крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД, использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Для всех исследованных поведенческих показателей определяли наличие выбросов по критерию Граббса (Grubbs’ test). Определение различий между средними значениями показателей проводили по post-hoc критерию Ньюмена–Кеулса (Newman–Keuls test). Результаты ANOVA контролировали с использованием непараметрического аналога ANOVA — Kruskal–Wallis H test (one-way ANOVA by ranks) и критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Существование связи между числом ТН-иммунопозитивных клеток и длительностью 1-го эпизода активного плавания, а также между числом ТН-иммунопозитивных клеток и числом свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного

Таблица 1. Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте свето-темнового выбора

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Латентный период захода в темный отсек, с	15.2 ± 5.7	19.0 ± 5.7
Время нахождения в светлом отсеке камеры, с	67.2 ± 13.5	71.0 ± 13.5
Число переходов между отсеками	5.4 ± 1.7	5.8 ± 1.7
Число оценок “риска”	4.6 ± 1.4	5.8 ± 1.4
Число стоек в светлом отсеке	1.6 ± 0.3	2.8 ± 0.3

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ($M \pm m$).

Таблица 2. Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте “Открытое поле”

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Число пересеченных квадратов	48.0 ± 7.6	45.4 ± 7.6
Число выходов в центр “поля”	0.2 ± 0.4	2.4 ± 0.4*
Число стоек с опорой	2.2 ± 1.4	5.2 ± 1.4#
Число стоек без опоры	3.4 ± 1.1	6.8 ± 1.1
Число коротких реакций груминга	2.2 ± 1.2	4.8 ± 1.2
Число длительных реакций груминга	2.6 ± 1.2	2.2 ± 1.2

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ($M \pm m$).

* — $p < 0.05$. # — $0.05 < p < 0.1$ (тенденция). Значимые изменения выделены затемнением.

лабиринта, определяли по коэффициенту корреляции Пирсона. Ввиду малого размера выборки в работе приведены только те корреляции, у которых критерий корреляции Пирсона $r_{xy} \geq 0.69$ (сила корреляционной связи интерпретировалась как высокая/весьма высокая).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте свето-темнового выбора у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с контрольными крысами не наблюдали значимых отличий в поведении по всем исследованным показателям, оценивающим уровень тревожности (латентный период захода в темный отсек камеры, время нахождения в светлом отсеке камеры, число переходов между отсеками, число стоек в светлом отсеке и число оценок “риска”) (табл. 1).

В тесте “Открытое поле” у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij число выходов в центр “поля” было значимо больше ($F_{(1, 8)} = 7.2$, $p = 0.03$), чем у контрольной группы. У крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было также больше число стоек с опорой по сравнению с контрольной группой. Однако это различие не достигало уровня статистической значимости ($F_{(1, 8)} = 4.4$, $p = 0.06$). По остальным исследованным показателям различий между экспериментальной и контрольной группой крыс линии WAG/Rij не наблюдалось (табл. 2).

В тесте приподнятого крестообразного лабиринта у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с крысами, рожденными матерями, потреблявшими КД, не наблюдали значимых отличий ни по одному из исследованных показателей, таких как время нахождения в открытых и закрытых

Таблица 3. Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте приподнятого крестообразного лабиринта

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Время нахождения в открытых рукавах, с	12.8 ± 4.6	14.6 ± 4.6
Число переходов между рукавами	2.4 ± 0.6	3.0 ± 0.6
Число стоек в закрытых рукавах	5.0 ± 0.8	5.4 ± 0.8
Число стоек в открытых рукавах	0.0 ± 0.3	0.6 ± 0.3
Число реакций груминга в закрытых рукавах	1.4 ± 0.6	1.6 ± 0.6
Число свешиваний	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ($M \pm m$).

Таблица 4. Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте принудительного плавания

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Латентный период активного плавания, с	12.8 ± 3.7	10.4 ± 3.7
Длительность 1-го эпизода активного плавания, с	85.2 ± 8.9	128.8 ± 8.9**
Время плавания, с	48.4 ± 6.4	67.0 ± 6.4*
Время иммобильности, с	154.2 ± 10.1	120.8 ± 10.1[#]
Число ныряний	2.0 ± 0.6	6.0 ± 0.6**

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ($M \pm m$).

** – $p < 0.01$, * – $p = 0.05$, [#] $0.05 < p < 0.1$. Остальные обозначения как в табл. 2.

рукавах лабиринта, число переходов между рукавами, число стоек и реакций груминга в открытых и закрытых рукавах лабиринта, число свешиваний с открытых рукавов (табл. 3).

В тесте принудительного плавания у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij длительность 1-го эпизода активного плавания ($F_{(1, 8)} = 12.0, p < 0.01$), длительность плавания ($F_{(1, 8)} = 5.4, p = 0.05$) и число ныряний ($F_{(1, 8)} = 22.9, p = 0.001$) были значимо больше, а длительность иммобильности ($F_{(1, 8)} = 4.2, p = 0.07$) была меньше (на уровне тенденции) по сравнению с аналогичными показателями у контрольной группы крыс линии WAG/Rij (табл. 4).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что факторы “диета матери” ($F_{(1, 105)} = 19.0, p < 0.001$), “поведенческое тестирование” ($F_{(1, 105)} = 9.02, p < 0.01$), а также взаимодействие этих факторов ($F_{(1, 105)} = 4.5, p < 0.05$) оказывают статистически значимое влияние на число ДА-ергических нейронов, которое определяли по числу ТН-иммунопозитивных клеток. Фактор “полушарие мозга” был незначимым ($F_{(1, 105)} = 1.0, p = 0.3$). Число ТН-иммунопозитивных клеток в правом и левом полушарии мозга статистически значимо не различалось в правом и левом полушариях мозга ни у одной из исследованных групп крыс. Так, межполушарные различия в числе ДА-ергических нейронов отсутствовали у потомства крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД (экспериментальная группа), которые подвергались поведенческому тестированию (186.2 ± 16.1 – правое полушарие и 186.4 ± 16.5 – левое полушарие, $p = 0.9$) и не подвергались поведенческому тестированию (123.4 ± 9.4 – правое полушарие и 128.9 ± 9.7 – левое полушарие, $p = 0.5$). Статистически значимых межполушарных различий также не было выявлено у потом-

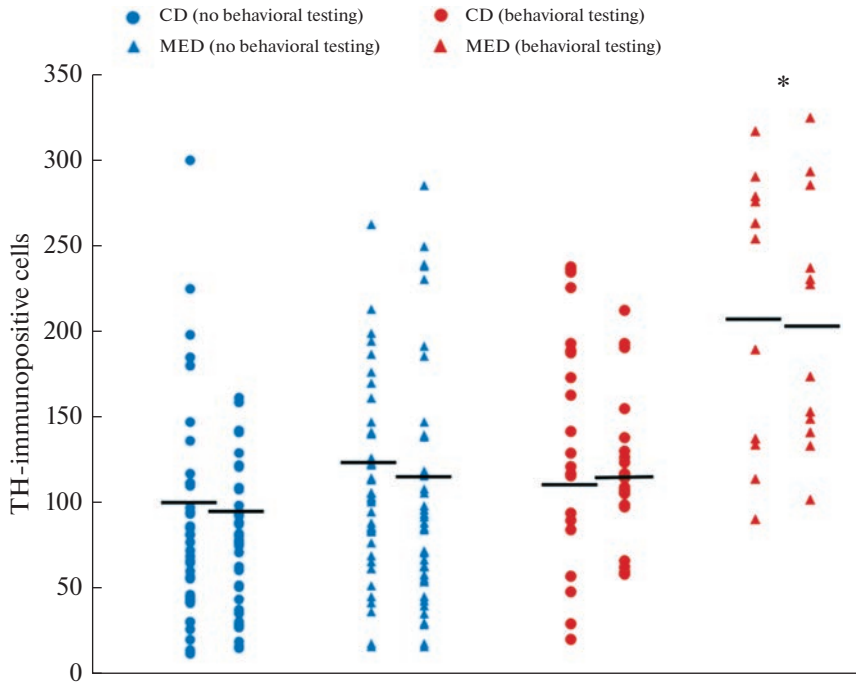


Рис. 1. Число ТН-иммунопозитивных клеток (TH-immunopositive cells) в VTA у крыс линии WAG/Rij. КД (CD) — контрольная диета, МОД (MED) — метилобогащенная диета. * $p < 0.05$ — у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, и подвергнутых поведенческому тестированию по сравнению с остальными группами крыс. Каждая точка означает индивидуальное значение для иллюстрации вариабельности внутри каждой группы. Слева — левое полушарие. Справа — правое полушарие. Горизонтальные линии — средние значения показателей в каждой группе.

ства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, которые подвергались (108.0 ± 12.6 — правое полушарие и 113.1 ± 12.9 — левое полушарие, $p = 0.5$) и не подвергались (97.2 ± 9.5 — правое полушарие и 102.3 ± 9.8 — левое полушарие, $p = 0.5$) поведенческому тестированию (рис. 1). Число ДА-ергических нейронов в VTA было статистически значимо больше только у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, и подвергнутых поведенческому тестированию, по сравнению как с потомством крыс линии WAG/Rij контрольной группы, и подвергнутых поведенческому тестированию ($p < 0.05$ — правое и левое полушарие), так и с потомством крыс линии WAG/Rij экспериментальной группы, и не подвергнутых поведенческому тестированию ($p < 0.05$ — правое и левое полушарие).

На рис. 2 показаны микрофотографии срезов мозга крыс линии WAG/Rij, окрашенные на ТН. Можно видеть, что наибольшее число ТН-иммунопозитивных клеток у крысы линии WAG/Rij, рожденной матерью, потреблявшей МОД во время перинатального периода, и подвергнутой поведенческому тестированию (рис. 2а).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что факторы “диета матери” ($F_{(1, 127)} = 16.4, p < 0.001$) и “поведенческое тестирование” ($F_{(1, 127)} = 4.3, p < 0.05$) оказывают статистически значимое влияние на число нейронов, окрашенных по методу Ниссля, в области VTA. Число нейронов у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было больше по сравнению с крысами контрольной группы.

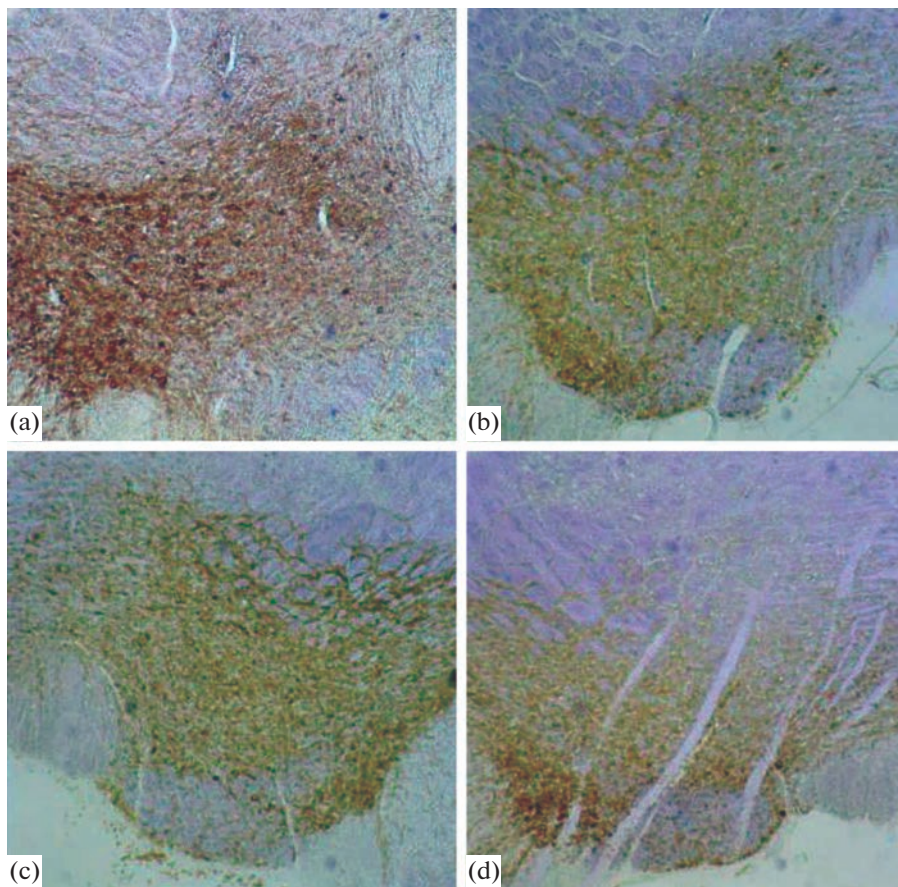


Рис. 2. Микрофотографии срезов мозга 6-месячных крыс линии WAG/Rij, иллюстрирующие ТН-иммунопозитивные клетки на уровне VTA. (а) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей МОД, и подвергнутой поведенческому тестированию; (б) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей МОД, и не подвергнутой поведенческому тестированию; (с) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей КД, и подвергнутой поведенческому тестированию; (д) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей КД, и не подвергнутой поведенческому тестированию. Ув. $\times 100$.

ной группы как в левом (13.6 ± 0.6 – МОД и 6.1 ± 0.8 – КД, $p < 0.01$) (рис. 3), так и в правом полушарии (15.0 ± 0.6 – МОД и 6.8 ± 0.8 – КД, $p < 0.01$) мозга (рис. 3). В группе, которая подвергалась поведенческому тестированию, не наблюдалось статистически значимых различий по данному показателю между животными экспериментальной и контрольной группы в левом (8.6 ± 1.6 – МОД и 7.1 ± 1.1 – КД, $p = 0.7$) и правом (8.3 ± 1.6 – МОД и 9.1 ± 1.2 – КД, $p = 0.9$) полушарии мозга (рис. 3). Межполушарных различий по числу нейронов в области VTA не обнаружено ни в одной из исследованных групп животных.

Длительность первого эпизода активного плавания ($r = 0.69$, $p < 0.05$) (рис. 4а) и число свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта ($r = 0.77$, $p < 0.05$) (рис. 4б) у крыс линии WAG/Rij положительно коррелировало с числом ТН-иммунопозитивных клеток.

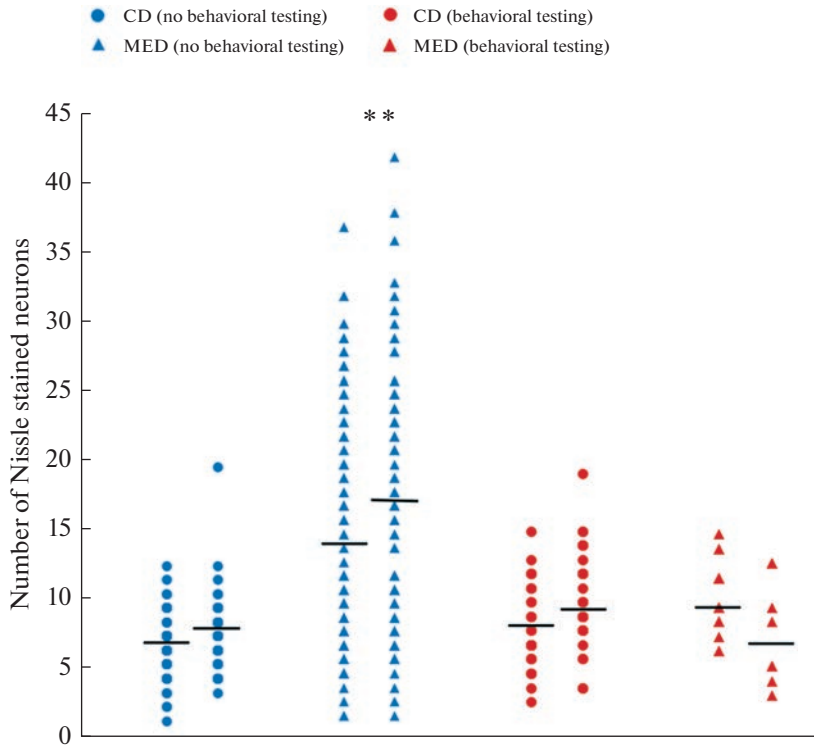


Рис. 3. Число нейронов, окрашенных по Нисслю (the number of Nissl-stained neurons) на уровне VTA, у крыс линии WAG/Rij. КД (CD) – контрольная диета, МОД (MED) – метилобогатая диета. ** $p < 0.01$ – у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и не подвергнутых поведенческому тестированию, по сравнению с остальными группами крыс. Каждая точка означает индивидуальное значение для иллюстрации вариабельности внутри каждой группы. Слева – левое полушарие. Справа – правое полушарие. Горизонтальные линии – средние значения показателей в каждой группе.

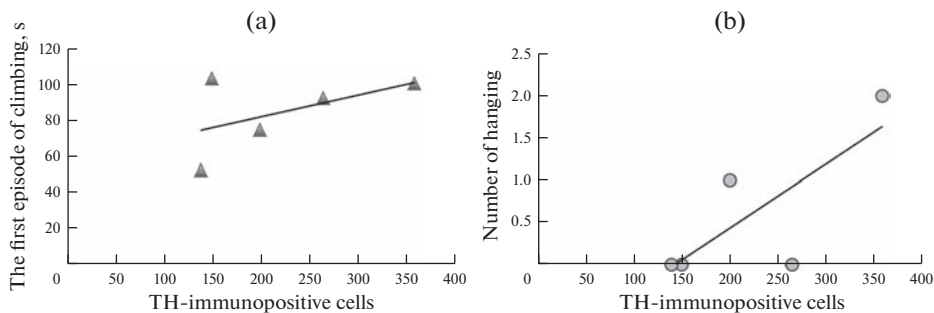


Рис. 4. Связь между длительностью первого эпизода активного плавания (the first episode of climbing, s) и числом свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта (number of hanging) и числом ТН-иммунопозитивных клеток (TH-immunopositive cells) у крыс линии WAG/Rij. По оси абсцисс – число ТН-иммунопозитивных клеток, по оси ординат – длительность первого эпизода активного плавания (а) и число свешиваний (б). Коэффициенты корреляции Пирсона: (а) – $r = 0.69$, $p < 0.05$; (б) – $r = 0.77$, $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные в настоящей работе, указывают на более низкое проявление симптомов депрессии у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД. У экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij в тесте принудительного плавания длительность 1-го эпизода активного плавания, длительность плавания и число ныряний были значимо больше, а время иммобильности — меньше (тенденция) по сравнению с контрольной группой крыс данной линии. Кроме того, в тесте “Открытое поле” у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij число выходов в центр “поля” было значимо больше, чем у контрольной группы. Число выходов в центр является показателем исследовательской мотивации, обычно пониженной при депрессии [26]. С этими данными согласуются результаты ранее проведенного нами исследования [12, 13], в котором было показано, что МОД матери в перинатальном периоде может уменьшить проявления депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Показано, что длительность иммобильности была меньше, а длительность 1-го эпизода активного плавания, число ныряний (тест принудительного плавания), а также предпочтение раствора сахарозы (тест потребления сахарозы) были больше у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с потомством, матери которых потребляли КД [12, 13]. Симптомы как абсанс-эпилепсии, так и депрессии являются ДА-зависимыми. Так, снижение активности ДА-ергической системы мозга вызывает усиление пик-волновой активности у крыс линии WAG/Rij [3] и крыс линии GAERS [4, 5]. Острое введение селективного антагониста ДА-ергических D2/D3-рецепторов раклоприда усугубляло симптомы депрессивно-подобного поведения и подавляло антидепрессантный эффект хронического введения имипрамина [6]. Выявлена также гипофункция мезолимбической ДА-ергической системы мозга — более низкая концентрации ДА в прилежащем ядре у крыс линии WAG/Rij (снижение ДА-ергического тонуса) по сравнению с крысами Wistar без патологии [7, 8]. В нашей предыдущей работе у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, был продемонстрирован более высокий ДА-ергический тонус [22] и более высокий уровень экспрессии генов, в том числе гена TH в прилежащем ядре [13] по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД.

Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов на уровне VTA показывают, что у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, число TH-иммунопозитивных клеток (ДА-ергических нейронов) в области VTA было больше по сравнению с крысами контрольной группы. Имеется целый ряд данных, свидетельствующих о высокой чувствительности VTA к эпигенетическим факторам различной природы, что может проявляться изменением числа клеток, составляющих данную область головного мозга, или их более высокой активности. Так, на модели пентилентетразолового киндлинга у мышей показана сниженная по сравнению с животными контрольной группы активность ДА-ергических нейронов в VTA в ответ на новизну [28]. Материнская забота, когда крыса-мать усиленно вылизывает и проявляет заботу о детенышах, увеличивает число TH-иммунопозитивных клеток VTA на 6-й постнатальный день, и положительный эффект материнской заботы на число ДА-ергических нейронов сохранялся также у взрослого потомства [29]. Ссаживание самок с самцами в течение 1 недели приводило к увеличению TH-иммунопозитивных клеток в VTA примерно на 12% у самцов; содержание самцов в домашней клетке с обогащенной средой также приводило к 14%-му увеличению TH-иммунопозитивных клеток VTA [30].

Различие в числе ДА-ергических нейронов в VTA у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, достигало уровня статистической значимости только у той группы животных, которая подвергалась поведенческому тестированию ($p < 0.05$ — для правого и левого полушария мозга). ДА-ергические нейроны мы определяли по числу ТН-иммунопозитивных клеток, усиленно продуцирующих ТН. ТН обеспечивает как базальный уровень дофамина, так и необходимое изменение его содержания при действии различных эндо- и экзогенных стимулов [31]. К числу экзогенных воздействий можно отнести проведенное поведенческое тестирование. Хорошо известно, что активность ДА-ергических нейронов VTA связана с движением. Например, мыши, помещенные в цилиндрический сосуд с водой, значительно увеличивали число плавательных движений в единицу времени при оптогенетической стимуляции ДА-ергических нейронов VTA [32]. Повышение продукции ТН в ДА-ергических нейронах, вероятно, обеспечивает более высокую выявляемость ТН-иммунопозитивных клеток у потомства крыс линии WAG/Rij, подвергнутого как поведенческому тестированию, так и воздействию МОД матери (по сравнению со всеми остальными группами крыс).

Результаты окрашивания срезов по Нисслю в области VTA подтверждают результаты иммуногистохимического окрашивания срезов на уровне VTA: число нейронов в области VTA у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было больше по сравнению с потомством той же линии, рожденных матерями, потреблявшими КД. Однако это различие было значимым только в группе, не подвергавшейся поведенческому тестированию. Метод окрашивания срезов по Нисслю позволяет обнаружить на срезе нейроны, выявляя специфичный для данных клеток нуклеопротеидный комплекс (тигроид), при этом, однако, невозможно выявить нейротрансмиттерную специфичность выявляемых нейронов в поле зрения исследователя и подсчитать их количество [25]. VTA представляет собой гетерогенную область, которая включает в себя множество нейронов, характеризующихся различными нейрохимическими и нейрофизиологическими свойствами. Установлено, что примерно 55–65% нейронов VTA — это ДА-ергические нейроны. Кроме того, VTA содержит также значительное число ГАМК-ергических нейронов, вырабатывающих тормозный нейромедиатор ГАМК [33]. Кроме того, эксперименты на грызунах выявили мезохабенулярный путь, состоящий из аксонов нейронов VTA, которые выделяют, помимо дофамина и ГАМК, возбуждающий нейромедиатор глутамат [34]. Таким образом, результаты, полученные в нашей работе, могут быть объяснены тем, что в отсутствие активации животных поведенческим тестированием, материнская МОД способствует увеличению числа как ДА-ергических нейронов, так и не-ДА-ергических нейронов VTA, которые, тем не менее, модулируют работу ДА-ергических нейронов. И только суммарное воздействие МОД матери (обеспечивает повышение числа выявляемых, в том числе ДА-ергических, нейронов) и поведенческого тестирования (обеспечивает повышение продукции ТН в ДА-ергических нейронах) приводит к статистически значимым различиям числа ДА-ергических нейронов у крыс линии WAG/Rij, подвергнутого как поведенческому тестированию, так и воздействию МОД матери (по сравнению со всеми остальными группами крыс).

Увеличение числа ДА-ергических нейронов в VTA, то есть в области мозга, которая содержит тела нейронов мезолимбического ДА-ергического пути, вероятнее всего, влечет за собой увеличение концентрации ДА в прилежащем ядре — конечной структуре мезолимбической системы, получающей ДА-ергические терминали из VTA [23], что приводит к повышению ДА-ергического тонуса мозга [8, 22]. Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, согласуются с предположением о том, что в основе уменьшения симптомов депрессивно-подобного поведения лежит повышение ДА-ергического тонуса у потомства крыс линии WAG/Rij,

рожденных матерями, потреблявшими МОД. Это предположение подтверждается, в том числе, данными корреляционного анализа: обнаружены значимые положительные корреляции между числом ТН-иммунопозитивных клеток и длительностью первого эпизода активного плавания ($r = 0.69, p < 0.05$) (рис. 4а), а также числом свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта ($r = 0.77, p < 0.05$) (рис. 4б).

В настоящее время морфологические и функциональные расстройства трансмиссии ДА в головном мозге рассматривают как одну из основных причин развития депрессии. Некоторые виды депрессии сопровождаются потерей ДА-ергических нейронов, а возрастные депрессивные расстройства можно прямо объяснить с позиций гибели ДА-ергических нейронов головного мозга [35]. Интересно, что у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2-х месяцев отсутствуют фенотипические проявления абсанс-эпилепсии [36] и депрессии [37]; снижения ДА-ергического тонуса (уменьшения содержания ДА в прилежащем ядре) в этом возрасте также не наблюдается [37]. В возрасте 6-ти месяцев пик-волновая активность [3, 36] и симптомы депрессии [3, 6] хорошо выражены, и сопровождаются снижением ДА-ергического тонуса [7, 8]. Наиболее вероятная причина – уменьшение сохранности ДА-ергических нейронов мезолимбической ДА-ергической системы. Можно предположить, что одним из возможных механизмов сниженного числа ДА-ергических нейронов в VTA, приводящих к формированию поведенческих симптомов депрессии у крыс линии WAG/Rij, может быть недостаточность нейротрофических факторов. Одним из эндогенных нейротрофических факторов, специфичных для ДА-ергической системы и рассматривающихся как мощный терапевтический агент, является глиальный нейротрофический фактор (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) [38].

GDNF способствует дифференцировке и выживанию ДА-ергических нейронов путем увеличения экспрессии ТН и других необходимых белков, включая белок, связанный с ядерным рецептором-1 (Nuclear receptor related-1 protein, Nurr1) [39]. GDNF может значительно увеличить квант выброса ДА из синаптических терминалей [40]. Введение GDNF в ДА-ергические нейроны крыс, выделенные из VTA, приводит к увеличению возбуждающих синапсов, и тем самым способствует высвобождению ДА из терминалей. Одна из возможностей заключается в том, что GDNF может способствовать росту локальных возбуждающих синаптических входов к структурам мозга, богатым ДА-ергическими нейронами [41]. Nurr1 играет роль фактора транскрипции на ранних этапах дифференцировки ДА-ергических нейронов среднего мозга, однако он продолжает экспрессироваться во взрослом возрасте. Экспрессия Nurr1 обычно снижается при болезни Паркинсона, и в некоторых случаях заболевания были выявлены мутации в гене этого белка. Дефицит Nurr1 в созревающих ДА-ергических нейронах приводил к быстрому истощению запасов ДА и дегенерации ДА-ергических нейронов в стриатуме [42].

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что материнская МОД во время перинатального периода увеличивает число ДА-ергических (ТН-иммунопозитивных) нейронов в VTA у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что уменьшение симптомов депрессивно-подобного поведения у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, происходит вследствие благоприятного воздействия МОД на развитие мезолимбической ДА-ергической системы мозга. МОД матери во время перинатального периода вызывает увеличение числа ДА-синтезирующих нейронов в VTA и вследствие этого повышение ДА-ергического тонуса мозга.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. — Directive 2010/63/EU) и принципами, изложенными в положениях Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН о работе с экспериментальными животными. Экспериментальные протоколы утверждены этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (протокол № 5 от 02.12.2020 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-15-00327а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.Ю.С., Н.А.Л.); постановка экспериментов, сбор данных (Е.А.Ф., Н.А.Л.); обработка данных (Е.А.Ф., К.Ю.С.); написание и редактирование рукописи (Е.А.Ф., К.Ю.С.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность лаборанту Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН Н.В. Панову за проведение транскардиальной перфузии и осуществление предварительной подготовки мозга для дальнейших иммуногистохимических исследований.

Авторы также выражают особую признательность м.н.с. Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН А.Б. Шацковой за помощь при проведении начальных этапов эксперимента для получения потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, которых кормили метилобогащенной или контрольной диетой для последующих иммуногистохимических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Саркисова КЮ, Куликов МА* (2000) Новая экспериментальная модель депрессии: крысы линии WAG/Rij, генетически предрасположенные к absence-эпилепсии. ДАН 374(5): 706–709. [*Sarkisova KY, Kulikov MA* (2000) A new experimental model of depression: WAG/Rij rats genetically predisposed to absence epilepsy. Dokl Biol Sci 374(5): 706–709. (In Russ)].
2. *Sarkisova KY, Midzyanovskaya IS, Kulikov MA* (2003) Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Behav Brain Res 144: 211–226. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00090-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00090-1)
3. *Sarkisova K, van Luijckelaar G* (2011) The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(4): 854–876. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
4. *Deransart C, Riban V, Lê B, Marescaux C, Depaulis A* (2000) Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. Neuroscience 100(2): 335–344. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00266-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00266-9)
5. *Tugba EK, Medine GIO, Ozlem A, Deniz K, Filiz OY* (2022) Prolongation of absence seizures and changes in serotonergic and dopaminergic neurotransmission by nigrostriatal pathway degeneration in genetic absence epilepsy rats. Pharmacol Biochem Behav 213: 173317. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173317>
6. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Midzyanovskaia IS, Folomkina AA* (2007) Dopamine-dependent character of depressive-like behavior in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Zh Vyssh

- Nerv Deiat Im IP Pavlova 57(1): 91–102.
<https://doi.org/10.1007/s11055-008-0017-z>
7. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Kudrin VS, Narkevich VB, Midzianovskaia IS, Biriukova LM, Folomkina AA, Basian AS* (2014) Neurochemical mechanisms of depression-like behavior in WAG/Rij rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 63(3): 303–315.
<https://doi.org/10.7868/s0044467713030106>
 8. *Sarkisova KJu, Kulikov MA, Kudrin VS, Midzyanovskaya IS, Birioukova LM* (2014) Age-related changes in behavior, in monoamines and their metabolites content, and in density of D1 and D2 dopamine receptors in the brain structures of WAG/Rij rats with depression-like pathology. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 64(6): 668–685.
<https://doi.org/10.7868/S0044467714060094>
 9. *Sarkisova KY, Gabova AV, Kulikov MA, Fedosova EA, Shatskova AB, Morosov AA* (2017) Rearing by foster Wistar mother with high level of maternal care counteracts the development of genetic absence epilepsy and comorbid depression in WAG/Rij rats. *Dokl Biol Sci* 473(1): 39–42.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617020077>
 10. *Sarkisova KY, Gabova AV* (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. *Genes Brain Behav* 17(7): e12477.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12477>
 11. *Sarkisova K, van Luijtelaaar G* (2022) The impact of early-life environment on absence epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. *IBRO Neurosci Rep* 13: 436–468.
<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.10.012>
 12. *Sarkisova KY, Gabova AV, Fedosova EA, Shatskova AB* (2020) Gender-Dependent Effect of Maternal Methyl-Enriched Diet on the Expression of Genetic Absence Epilepsy and Comorbid Depression in Adult Offspring of WAG/Rij Rats. *Dokl Biol Sci* 494(1): 244–247.
<https://doi.org/10.1134/S0012496620050075>
 13. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Rudenok MM, Stanishevskaya VA, Slominsky PA* (2023) Maternal Methyl-Enriched Diet Increases DNMT1, HCN1, and TH Gene Expression and Suppresses Absence Seizures and Comorbid Depression in Offspring of WAG/Rij Rats. *Diagnostics* (Basel) 13(3): 398.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13030398>
 14. *Van den Veyver IB* (2002) Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr* 22: 255–282.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102932>
 15. *Herbeck YE, Gulevich RG, Amelkina OA, Plyusnina IZ, Oskina IN* (2010) Conserved methylation of the glucocorticoid receptor gene exon 1(7) promoter in rats subjected to a maternal methyl-supplemented diet. *Int J Dev Neurosci* 28(1): 9–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jidevneu.2009.10.004>
 16. *Poletaeva II, Surina NM, Ashapkin VV, Fedotova IB, Merzlov IB, Perepelkina OV, Pavlova GV* (2014) Maternal methyl-enriched diet in rat reduced the audiogenic seizure proneness in progeny. *Pharmacol Biochem Behav* 127: 21–26.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.09.018>
 17. *Jaenisch R, Bird A* (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245–254.
<https://doi.org/10.1038/ng1089>
 18. *Ванюшин БФ* (2013) Эпигенетика сегодня и завтра. Вавиловск журн генетики и селекции 17 (4/2): 805–832. [*Vanyushin BF* (2013) Epigenetics today and tomorrow. Vavilovsk zhurn genetiki i seleksii 17 (4/2): 805–832. (In Russ)].
 19. *Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W* (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14(1): 47–58.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>
 20. *Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S* (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 2910–2917.
 21. *Tekin I, Roskoski RJr, Carkaci-Salli N, Vrana KE* (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neur Transm* 121(12): 1451–1481.
<https://doi.org/10.1007/s00702-014-1238-7>
 22. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Narkevich VB, Kudrin VS* (2022) Maternal Methyl-Enriched Diet Increases Dopaminergic Tone of the Mesolimbic Brain System in Adult Offspring of WAG/Rij Rats. *Dokl Biol Sci* 506(1): 145–149.
<https://doi.org/10.1134/S001249662205012X>
 23. *Trutti AC, Mulder MJ, Hommel B, Forstmann BU* (2019) Functional neuroanatomical review of the ventral tegmental area. *Neuroimage* 191: 258–268.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.01.062>
 24. *Margolis EB, Coker AR, Driscoll JR, Lemaître AI, Fields HL* (2010) Reliability in the identification of midbrain dopamine neurons. *PLoS One* 5(12): e15222.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015222>

25. *Lapshina KV, Abramova YuYu, Guzev MA, Ekimova IV* (2022) TGN-020, Inhibitor of the Water Channel Aquaporin-4, Accelerates Nigrostriatal Neurodegeneration in the Rat Model of Parkinson's Disease. *J Evol Biochem Physiol* 58(6): 2035–2047.
<https://doi.org/10.31857/S0869813922120081>
26. *Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KY* (2021) Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 51(4): 501–512.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01097-z>
27. *Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z* (2019) The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol* 1916: 69–74.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4
28. *Ahmadi M, Dufour JP, Seifritz E, Mirnajafi-Zadeh J, Saab BJ* (2017) The PTZ kindling mouse model of epilepsy exhibits exploratory drive deficits and aberrant activity amongst VTA dopamine neurons in both familiar and novel space. *Behav Brain Res* 330: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.025>
29. *Peña CJ, Neugut YD, Calarco CA, Champagne FA* (2014) Effects of maternal care on the development of midbrain dopamine pathways and reward-directed behavior in female offspring. *Eur J Neurosci* 39(6): 946–956.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12479>
30. *Tomas D, Prijanto AH, Burrows EL, Hannan AJ, Horne MK, Aumann TD* (2015) Environmental modulations of the number of midbrain dopamine neurons in adult mice. *J Vis Exp* 95: 52329.
<https://doi.org/10.3791/52329>
31. *Sukhareva EV, Kalinina TS, Bulygina VV, Dygalo NN* (2016) Tyrosine hydroxylase of the brain and its regulation by glucocorticoids. *Vavilov J Genet Breed* 20(2): 212–219.
<https://doi.org/10.18699/VJ16.156>
32. *Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K* (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behavior. *Nature* 493(7433): 537–541.
<https://doi.org/10.1038/nature11740>
33. *Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S* (2012) Braking Dopamine Systems: A New GABA Master Structure for Mesolimbic and Nigrostriatal Functions. *J Neurosci* 32(41): 14094–14101.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3370-12.2012>
34. *Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang HL, Hoffman AF, Lupica CR, Morales M* (2014) Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci* 17(11): 1543–1551.
<https://doi.org/10.1038/nn.3823>
35. *Rollo CD* (2009) Dopamine and aging: intersecting facets. *Neurochem Res* 34(4): 601–629.
<https://doi.org/10.1007/s11064-008-9858-7>
36. *Gabova AV, Sarkisova KYu, Fedosova EA, Shatskova AB, Morozov AA* (2020) Developmental Changes in Peak-Wave Discharges in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 50: 245–252.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00893-y>
37. *Fedosova EA, Sarkisova KYu, Kudrin VS, Narkevich VB, Bazyan AS* (2015) Behavioral and Neurochemical Characteristics of Two Months Old WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Int J Clin Exp Neurol* 3(2): 32–44.
<https://doi.org/10.12691/ijcen-3-2-2>
38. *Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK* (2013) GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138(2): 155–175.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>
39. *Cortés D, Carballo-Molina OA, Castellanos-Montiel MJ, Velasco I* (2017) The Non-Survival Effects of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor on Neural Cells. *Front Mol Neurosci* 10: 258.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00258>
40. *Roussa E, Oehlke O, Rahhal B, Heermann S, Heidrich S, Wiehle M, Kriegelstein K* (2008) Transforming growth factor beta cooperates with persephin for dopaminergic phenotype induction. *Stem Cells* 26(7): 1683–1694.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0805>
41. *Sariola H, Saarma M* (2003) Novel functions and signaling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116(19): 3855–3862.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00786>
42. *Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Metzger D, Chambon P, Lindqvist E, Larsson NG, Olson L, Björklund A, Ichinose H, Perlmann T* (2009) Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29(50): 15923–15932.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3910-09.2009>

The Effect of Maternal Methyl-Enriched Diet on the Number of Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area in Adult Offspring of WAG/Rij Rats

E. A. Fedosova^{a, *}, N. A. Loginova^a, and K. Yu. Sarkisova^a

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**e-mail: ekaterina.5fedosova@rambler.ru*

WAG/Rij rats are genetic model of absence epilepsy with comorbid depression. Pathologic phenotype in WAG/Rij rats was shown to be associated with reduced dopamine (DA) tone within the mesolimbic DAergic brain system. Previously, it was found that maternal methyl-enriched diet (MED) in the perinatal period increases DA content in the mesolimbic DAergic brain system and reduces absence seizures and comorbid depression in adult offspring of WAG/Rij rats. Ventral tegmental area (VTA), containing DA cells bodies, is a main source of the mesolimbic DA synthesis. The aim of this study was to test the hypothesis that increases in the mesolimbic DAergic tone induced by maternal MED in offspring may be due to an increase in the number of DA-synthesizing neurons in the VTA. Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) was used to assess the number of TH-immunopositive cells in adult offspring of WAG/Rij rats born to mothers fed control diet or MED and subjected or not subjected to behavioral testing for 2 consecutive days in the light-dark choice, open field, elevated plus maze and forced swimming tests. One hour after the forced swimming test animals were anesthetized. Brains were fixed using transcardial perfusion. The number of DAergic neurons was determined by the number of TH-immunopositive cells on brain slices at the level of VTA. The number of TH-immunopositive cells was counted in left and right hemispheres separately. A significant effect of maternal MED on the number of cells in the VTA expressing TH has been established. Adult WAG/Rij offspring born to mothers fed MED had an increased number of TH-immunopositive cells as compared with the offspring born to mothers fed control diet. Moreover, in WAG/Rij offspring born to mothers fed MED, the number of TH-immunopositive cells was greater in animals subjected to behavioral testing compared with animals not subjected to behavioral testing. The effects of maternal MED and behavioral testing on the number of TH-immunopositive cells in the VTA were equally expressed in the left and right hemispheres of the brain. Results suggest that maternal MED in the perinatal period can affect the developing mesolimbic DAergic brain system, promoting the generation and/or maintenance of DA neurons in the VTA, and thereby prevent the occurrence of genetic absence epilepsy and comorbid depression in the offspring of WAG/Rij rats.

Keywords: absence epilepsy, comorbid depression, dopaminergic neurons, VTA, maternal methyl-enriched diet, mesolimbic dopamine system, WAG/Rij rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СНИЖЕНИЕ МЫШЕЧНОЙ МАССЫ ПРИ ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННОМ
ВИСЦЕРАЛЬНОМ ОЖИРЕНИИ У КРЫС-САМЦОВ ЛИНИИ ВИСТАР:
СВЯЗЬ С ГОРМОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ**

© 2023 г. Т. А. Митюкова^{1, *}, А. А. Басалай^{1, **}, Е. Н. Чудиловская¹,
О. Е. Полулях¹, Я. В. Щербаков¹, Н. С. Костюченко¹

¹*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

**E-mail: mityukovat@gmail.com*

***E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com*

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 31.05.2023 г.

Принята к публикации 04.06.2023 г.

Снижение мышечной массы, как правило, развивается при старении организма, однако при ожирении также регистрируются признаки снижения массы и функциональной активности скелетной мускулатуры, что требует экспериментальных исследований. Цель работы — изучить влияние диет-индуцированного ожирения и оздоровительных вариантов его коррекции на масс-метрические и метаболические показатели тканей трехглавых мышц голени у крыс-самцов линии Вистар. Опыты проводились на половозрелых крысах и включали изучение масс-метрических, метаболических и гормональных показателей, характеризующих состояние мышечной ткани при стандартной (СтД, 16 нед) и высококалорийной диетах (ВКД, 16 нед), при переходе от ВКД к стандартной диете (ВКД/СтД, 8/8 нед), при подключении физических нагрузок в виде бега на тредмиле (СтД + бег, ВКД + бег и ВКД/СтД + бег, 8/8). Длительная высококалорийная диета приводила к развитию висцерального ожирения и снижению массы трехглавой мышцы голени у исследуемых животных. При ВКД в скелетных мышцах регистрировались метаболические сдвиги — нарастание содержания глюкозы, лактата, активности лактатдегидрогеназы и перекисного окисления липидов. Висцеральное ожирение сопровождалось снижением содержания тестостерона в сыворотке крови, но при этом в мышечной ткани сохранялась относительно стабильная концентрация гормона. Применение умеренных физических нагрузок при ВКД не приводило к коррекции массы висцерального жира, не предупреждало снижения мышечной массы, но вызывало нормализацию биохимических показателей в мышечной ткани и уровня тестостерона в сыворотке крови. Наиболее адекватная коррекция висцерального ожирения, мышечной массы и биохимических показателей в мышечной ткани у крыс-самцов достигалась при переходе от высококалорийной к сбалансированной диете независимо от физических нагрузок. Таким образом, коррекция диет-индуцированного висцерального ожирения, мышечной массы и сопряженных метаболических сдвигов у крыс-самцов линии Вистар требует перехода к сбалансированному питанию.

Ключевые слова: диет-индуцированное висцеральное ожирение, снижение мышечной массы, метаболизм мышечной ткани, гормональный статус, крысы-самцы линии Вистар

DOI: 10.31857/S0869813923070099, EDN: XMVPMR

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность ожирения является серьезной проблемой общественного здравоохранения. По последним данным ВОЗ, в Европейском регионе 59% взрослых людей и 28% детей страдают от избыточной массы тела и ожирения [1]. Неблагоприятные последствия ожирения выражаются в повышенном риске развития сахарного диабета 2-го типа, сердечно-сосудистой патологии, заболеваний репродуктивной системы и др. Вместе с тем существуют данные о негативном влиянии ожирения на скелетные мышцы у людей разного возраста [2]. Связанная с возрастным потерей массы и функции скелетных мышц была названа “саркопенией”. Поскольку ожирение усугубляет функциональные ограничения, увеличивая трудности при выполнении физических действий, требующих мышечной силы, было введено определение “саркопеническое ожирение” [2]. Известно, что жировая ткань действует как эндокринный орган, секретируя многочисленные гормоны и провоспалительные цитокины. У лиц, страдающих ожирением, формируется повышенный уровень циркулирующих провоспалительных цитокинов [3, 4], при этом хронически высокие уровни фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) инициируют деградацию белка и снижение его синтеза, конечным результатом чего может быть прогрессирующая атрофия скелетных мышц. Снижение синтеза белка также может быть обусловлено и другими причинами: уменьшением уровня анаболических гормонов, которые способствуют нарастанию мышечной массы, силы и регенерации скелетных мышц [5–7], а также нарастанием окислительного стресса, связанного с митохондриальной дисфункцией [8]. Таким образом, современные данные литературы свидетельствуют о том, что одним из последствий ожирения может являться саркопения, затрагивающая не только массу мышечной ткани, но и функциональные характеристики мышц у людей. Однако механизмы этих неблагоприятных влияний на сегодняшний день недостаточно изучены, что требует дополнительных исследований. По мнению Gupta и Kumar, саркопения является проявлением широко распространенной эндокринной недостаточности, и в частности связана со снижением уровня тестостерона, обеспечивающего антикатаболическую функцию, синтез белков, регенерацию нервов и противовоспалительное действие [9]. В экспериментах на крысах установлено, что в мышечной ткани может протекать локальный синтез тестостерона и эстрадиола, который обеспечивает увеличение пула гормонов в ходе физических упражнений [10], однако нет сведений об изменениях внутримышечного синтеза андрогенов и эстрогенов при ожирении. Особую значимость имеет вопрос об эффективности оздоровительных вариантов коррекции ожирения, включающих физические нагрузки, поскольку они непосредственно могут влиять на состояние мышечной ткани.

Цель исследования — изучить влияние диет-индуцированного ожирения и оздоровительных вариантов его коррекции на масс-метрические и метаболические показатели тканей трехглавых мышц голени у крыс-самцов линии Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводились на половозрелых крысах-самцах линии Вистар ($n = 80$). Животные были введены в эксперимент в возрасте 2 месяцев. На I этапе крысы были случайным образом разделены на две основные группы, которые содержались либо на стандартной диете вивария (“СтД” — контроль, $n = 26$), либо получали высококалорийную диету (“ВКД”, $n = 54$) в течение 8 нед. На II этапе животные были дополнительно разделены на подгруппы, включающие физические нагрузки и переход от ВКД на СтД в течение следующих 8 нед. Контрольная группа была разделена на две подгруппы: 1) “СтД” (контроль), $n = 13$; и 2) “СтД + бег”, $n = 13$. Группа

“ВКД” была разделена на четыре подгруппы: 3) “ВКД”, $n = 14$; 4) “ВКД + бег”, $n = 13$; 5) “ВКД/СтД”, $n = 14$; 6) “ВКД/СтД + бег”, $n = 13$.

Животные находились в режиме 12/12-часового цикла день/ночь, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 60–65%. Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем декапитации под наркозом с использованием тиопентала натрия. В соответствии с критериями комитета по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси исключение животного из эксперимента проводится в случае его заболевания либо гибели. В ходе эксперимента был отмечен 1 случай заболевания (отит) у животного из группы “ВКД/СтД”, численность группы соответственно уменьшилась — из 14 крыс осталось 13 в данной группе. Общая численность животных на выходе из эксперимента составила 79 крыс.

ВКД состояла из дополнительного включения жиров животного происхождения (свиное сало) в стандартный рацион из расчета 45% от суточной калорийности корма и замещения воды на 10%-ный раствор фруктозы в свободном доступе (*ad libitum*) [11]. Умеренные физические нагрузки осуществлялись в виде бега на тредмиле 5 дней в течение 20 мин со скоростью 15 м/мин в утреннее время с 9:00 до 12:00 натошак [12]. Общая продолжительность тренировок составляла 8 нед. Выбор модели определялся тем, что физические нагрузки на моторной беговой дорожке с низкой и средней интенсивностью оказывают наиболее благоприятное нетравмирующее влияние на мускулатуру и суставной аппарат животных и поэтому могут использоваться в составе оздоровительных мероприятий [12].

Массу тела крыс еженедельно определяли на весах SATURN (Китай). После выведения животных из эксперимента проводили забор крови и тканей, взвешивание висцеральной жировой ткани и трехглавой мышцы голени на лабораторных весах (Scout Pro, Китай). Массовые коэффициенты (МК) висцерального жира и трехглавой мышцы голени рассчитывали по формуле: $\text{МК} = (\text{масса органа/масса тела}) \times 100\%$.

Для приготовления гомогенатов навески мышечной ткани измельчали на льду ручным гомогенизатором IKA T 10 basic (IKA-WERKE, Германия) с использованием 0.2-молярного Na-фосфатного буфера (pH 7.4). Определение в гомогенатах мышц общего белка, общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), глюкозы, лактата, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы (КК) проводили на автоматическом анализаторе BS-200 (Mindray, Китай) с программным обеспечением BS-330. Использовали коммерческие наборы фирмы “Диасенс” (Беларусь) и набор “ЛАКТАТ-ВИТАЛ” (Россия), контроль качества осуществляли с применением контрольных сывороток Randox (Великобритания). Определение тестостерона, эстрадиола, кортизола и кортикостерона в сыворотке крови и гомогенатах мышечной ткани проводили с использованием ИФА-наборов фирмы ХЕМА (Россия). Малоновый диальдегид (МДА) определяли спектрофотометрическим методом [13].

Статистический анализ осуществляли с помощью ППП Statistica 10.0. Учитывая характер распределения значений по W -критерию Шапиро–Уилка, применяли параметрические, либо непараметрические методы статистики. Результаты выражали в виде средней величины и стандартного отклонения ($M \pm SD$), либо в виде медианы и процентилей (Me [25; 75]) соответственно. Статистическую значимость межгрупповых отличий оценивали с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post-hoc* анализом по F -критерию Фишера, если распределение носило нормальный характер, либо по H -критерию Краскела–Уоллиса с последующими апостериорными сравнениями при ненормальном распределении. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

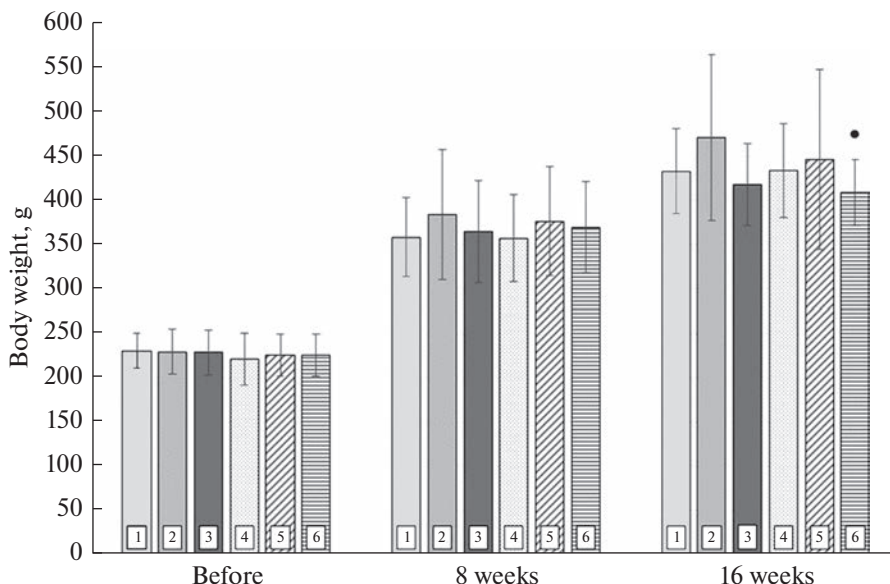


Рис. 1. Масса тела экспериментальных животных в динамике эксперимента ($M \pm SD$): 1 – “СтД”; 2 – “ВКД”; 3 – “ВКД/СтД”; 4 – “СтД + бег”; 5 – “ВКД + бег”; 6 – “ВКД/СтД + бег”. Статистическая значимость отличий при $p < 0.05$: • – от группы “ВКД”

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как видно из рис. 1, в ходе эксперимента наблюдалась возрастная динамика нарастания массы тела у крыс всех групп. По окончании 16-недельного эксперимента средние значения массы тела крыс-самцов не имели достоверных отличий за исключением значимого снижения на 13% ($p = 0.024$) в группе “ВКД/СтД + бег” по сравнению с группой “ВКД”.

Масса висцеральной жировой ткани при стандартной диете была сопоставимой у крыс, ведущих “сидячий” и физически активный образ жизни (“СтД” и “СтД + бег”), а в группах “ВКД” и “ВКД + бег” – нарастала в 3 раза ($p = 3.56 \times 10^{-7}$, $p = 7.99 \times 10^{-8}$ соответственно) по сравнению с группой “СтД”. Массовый коэффициент (МК) висцеральной жировой ткани повышался в этих группах соответственно в 2.5 ($p = 1.13 \times 10^{-9}$) и 2.9 раза ($p = 1.96 \times 10^{-12}$) по сравнению с контролем. При высококалорийном питании у самцов было выявлено достоверное снижение мышечной массы на 11% ($p = 0.041$) по сравнению с контролем, причем эта тенденция была еще более выраженной при ВКД в сочетании с бегом. У крыс группы “ВКД + бег” снижение мышечной массы по отношению к группам “СтД” и “СтД + бег” достигало 20% ($p = 6.56 \times 10^{-4}$) и 22% ($p = 1.44 \times 10^{-4}$) соответственно. При переходе к сбалансированному питанию независимо от физических нагрузок отмечалась нормализация массы трехглавой мышцы голени. Аналогичные сдвиги претерпевал и МК трехглавой мышцы голени у самцов – достоверное снижение в группе “ВКД” на 16% ($p = 1.47 \times 10^{-5}$) по отношению к контролю и в группе “ВКД + бег” на 23% ($p = 1.06 \times 10^{-7}$) и 24% ($p = 8.51 \times 10^{-9}$) по сравнению с группами “СтД” и “СтД + бег” соответственно. При переходе к сбалансированному питанию независимо от физических нагрузок отмечалась нормализация показателя (табл. 1).

Таблица 1. Массы и массовые коэффициенты (МК) органов и тканей крыс-самцов в зависимости от типа диеты и физических нагрузок ($M \pm SD$)

Группы	Показатель			
	масса висцеральной жировой ткани, г	МК висцеральной жировой ткани, %	масса трехглавой мышцы голени, г	МК трехглавой мышцы голени, %
Без физических нагрузок				
1. СтД	7.99 $\pm$ 2.64	1.82 $\pm$ 0.49	2.64 $\pm$ 0.33	0.61 $\pm$ 0.05
2. ВКД	22.99 $\pm$ 11.97*#	4.64 $\pm$ 1.67*#	2.34 $\pm$ 0.35*#	0.51 $\pm$ 0.07*#
3. ВКД/СтД	7.06 $\pm$ 3.28*•&	1.68 $\pm$ 0.73*•&	2.67 $\pm$ 0.34*•&	0.64 $\pm$ 0.06*•&
С физическими нагрузками				
4. СтД + бег	6.68 $\pm$ 2.79	1.52 $\pm$ 0.56	2.71 $\pm$ 0.44	0.62 $\pm$ 0.07
5. ВКД + бег	24.27 $\pm$ 9.92*#	5.31 $\pm$ 1.43*#	2.11 $\pm$ 0.49*#	0.47 $\pm$ 0.06*#
6. ВКД/СтД + бег	6.64 $\pm$ 2.68*•&	1.61 $\pm$ 0.63*•&	2.52 $\pm$ 0.30•&	0.62 $\pm$ 0.05*•&

Статистическая значимость отличий при $p < 0.05$: * – от группы “СтД”, • – от группы “ВКД”, # – от группы “СтД + бег”, & – от группы “ВКД + бег”.

Учитывая связь между анаболическими гормонами и характеристиками мышечной массы и силы, представляло интерес обратиться к особенностям гормонального фона при ожирении и его коррекции (табл. 2). Очевидно, что у самцов в норме преобладающим половым гормоном является тестостерон, причем его содержание примерно на порядок превосходит содержание эстрадиола. При диет-индуцированном висцеральном ожирении уровень тестостерона в сыворотке крови снижался почти в 3 раза ($p = 0.047$) по отношению к контролю. Одновременно регистрировалось достоверное ($p = 0.041$) снижение массы трехглавой мышцы голени. Однако восстановление концентрации гормона у крыс группы “ВКД + бег” не приводило к коррекции мышечной массы. Пятикратное ($p = 0.032$) нарастание уровня тестостерона в группе “ВКД/СтД + бег” по сравнению с группой “ВКД” сопровождалось нормализацией мышечной массы. Что касается эстрадиола, то его концентрация в сыворотке крови самцов не претерпевала существенных изменений.

В отношении гормонов коры надпочечников у крыс известно, что преобладающим является кортикостерон, а кортизол рассматривается как минорный стероидный компонент коры надпочечников и, чаще всего, не учитывается в качестве показателя стресс-реакции. Как видно из табл. 2, содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс контрольной группы было примерно в 10 раз выше, чем кортизола. Однако характер изменений обоих стероидных гормонов в эксперименте носил однотипный характер. Достоверное повышение уровня кортикостерона и кортизола было отмечено только в группе “ВКД + бег” по сравнению с “СтД + бег” ($p = 0.011$, $p = 0.003$ соответственно), что свидетельствует о наличии стресс-реакции при подключении физических нагрузок на фоне висцерального ожирения. Минимальные срединные значения этих гормонов были отмечены при сочетанной коррекции ожирения (“ВКД/СтД + бег”), и эти значения были значимо ниже, чем в группе “ВКД + бег” ($p = 0.008$, $p = 0.002$ соответственно). Во всех экспериментальных группах сохранялись достоверные ($p < 0.05$) корреляции между уровнями кортикостерона и кортизола (коэффициент корреляции в пределах 0.81–0.96).

Учитывая современные представления о синтезе тестостерона и эстрадиола во внегонадных тканях, и в частности в мышцах [10, 14], было проведено определение концентраций тестостерона и эстрадиола в гомогенатах мышечной ткани в расчете на г ткани. Как видно из данных табл. 3, содержание этих гормонов в мышечной ткани превосходило их концентрации в кровяном русле. Уровень тестостерона в

Таблица 2. Уровень тестостерона, эстрадиола, кортизола и кортикостерона в сыворотке крови крыс-самцов в зависимости от типа диеты и физических нагрузок (Ме [25; 75])

Группы	Показатель			
	тестостерон, нмоль/л	эстрадиол, нмоль/л	кортизол, нмоль/л	кортикостерон, нмоль/л
Без физических нагрузок				
1. СтД	7.78 [5.35; 24.70]	0.65 [0.50; 0.76]	79.90 [57.00; 112.90]	727.60 [489.70; 1013.80]
2. ВКД	2.73 [2.11; 5.22]*	0.43 [0.19; 0.62]	92.60 [61.00; 163.40]	817.20 [565.50; 1027.60]
3. ВКД/СтД	3.46 [1.83; 8.90]	0.52 [0.43; 0.78]	77.40 [27.40; 98.20]&	696.60 [261.00; 958.60]
С физическими нагрузками				
4. СтД + бег	7.79 [3.29; 9.62]	0.73 [0.52; 0.87]	59.20 [22.80; 71.60]	551.70 [293.40; 731.00]
5. ВКД + бег	7.19 [2.67; 18.03]	0.56 [0.52; 0.64]	114.20 [97.10; 200.80]#	951.70 [927.60; 1127.60]#
6. ВКД/СтД + бег	13.94 [6.19; 22.54]*	0.65 [0.47; 0.81]	52.10 [32.40; 66.20]&	513.80 [410.30; 634.50]&

Статистическая значимость отличий при $p < 0.05$: * – от группы “СтД”, • – от группы “ВКД”, # – от группы “СтД + бег”, & – от группы “ВКД + бег”.

мышечной ткани у самцов крыс в группе контроля был примерно в 1.5 раза выше, чем эстрадиола, хотя соотношения циркулирующих в крови гормонов отличались десятикратным преобладанием тестостерона. Интересно, что диет-индуцированное висцеральное ожирение и снижение мышечной массы не сопровождалось резкими сдвигами содержания тестостерона и эстрадиола в мышечной ткани. Через сутки после окончания 8-недельного тренировочного периода также не было выявлено существенных сдвигов концентраций изучаемых гормонов. Повышение содержания эстрадиола на 21% ($p = 0.045$) было отмечено в группе крыс “ВКД + бег” по сравнению с группой “ВКД/СтД”.

Биохимические показатели мышечной ткани представлены в табл. 4. У крыс группы “СтД + бег” характеристики метаболизма не отличались от контроля. У крыс группы “ВКД” на фоне снижения мышечной массы было зарегистрировано достоверное повышение концентрации глюкозы на 35% ($p = 0.021$), лактата на 28% ($p = 0.038$) и тенденция к повышению активности ЛДГ на 31% ($p = 0.061$) по отношению к контролю, а также повышение в мышечной ткани концентрации лактата на 30% ($p = 0.037$) и активности ЛДГ на 40% ($p = 0.006$) по сравнению с группой “СтД + бег”. Подключение физических нагрузок на фоне ВКД и переход к сбалансированному питанию независимо от физических нагрузок служили адекватными подходами для нормализации метаболических сдвигов в мышечной ткани.

Состояние перекисного окисления липидов оценивали по уровню МДА в тканях трехглавых мышц голени. Как видно из рис. 2, у крыс группы “ВКД” было зарегистрировано достоверное повышение концентрации МДА на 52% ($p = 0.007$) в мышечной ткани по сравнению с группой “СтД + бег”. Отмечена тенденция к нарастанию концентрации МДА в группе “ВКД + бег” по сравнению с “СтД + бег” на 31% ($p = 0.065$). При переходе к стандартной диете значение показателя возвращалось к норме.

Рассматривая влияние гормонального фона и перекисного окисления липидов на массу трехглавой мышцы голени у самцов крыс, представляло интерес оценить

Таблица 3. Уровень тестостерона и эстрадиола в тканях трехглавых мышц голени у крыс-самцов в зависимости от типа диеты и физических нагрузок ($M \pm SD$)

Группы	Показатель	
	тестостерон, нмоль/г ткани	эстрадиол, нмоль/г ткани
Без физических нагрузок		
1. СтД	59.52 $\pm$ 15.13	40.60 $\pm$ 10.52
2. ВКД	53.70 $\pm$ 13.19	41.18 $\pm$ 9.24
3. ВКД/СтД	56.38 $\pm$ 11.70	34.55 $\pm$ 7.15 ^{&}
С физическими нагрузками		
4. СтД + бег	57.43 $\pm$ 14.60	38.29 $\pm$ 8.03
5. ВКД + бег	62.97 $\pm$ 12.27	41.88 $\pm$ 5.99
6. ВКД/СтД + бег	64.04 $\pm$ 10.66	36.06 $\pm$ 8.69

Статистическая значимость отличий при $p < 0.05$: & – от группы “ВКД + бег”.

Таблица 4. Биохимические показатели в тканях трехглавых мышц голени у крыс-самцов в зависимости от типа диеты и физических нагрузок (Ме [25; 75])

Группы	Показатель						
	Белок, г/г ткани	ОХ, ммоль/г ткани	ТГ, ммоль/г ткани	Глюкоза, ммоль/г ткани	Лактат, ммоль/г ткани	ЛДГ, Ед/г ткани $\times 10^{-3}$	КК, Ед/г ткани $\times 10^{-6}$
Без физических нагрузок							
1. СтД	46.20 [41.00; 48.60]	1.00 [0.90; 1.10]	12.90 [9.30; 17.70]	1.70 [1.60; 2.00]	30.49 [26.62; 33.80]	619.00 [584.00; 688.00]	7.80 [6.19; 8.72]
2. ВКД	51.10 [47.40; 53.80]	1.10 [1.00; 1.20]	14.95 [13.30; 16.10]	2.30 [1.90; 2.50] [*]	38.94 [34.67; 48.02] [#]	808.50 [748.00; 922.00] [#]	7.89 [7.39; 8.77]
3. ВКД/СтД	46.00 [43.40; 48.10]	1.00 [1.00; 1.10]	13.70 [11.20; 14.40]	1.90 [1.80; 2.20]	35.54 [32.38; 35.86]	583.00 [540.00; 818.00]	7.56 [7.28; 8.51]
С физическими нагрузками							
4. СтД + бег	44.00 [39.70; 48.70]	1.00 [0.90; 1.10]	15.50 [14.00; 16.30]	1.80 [1.80; 2.00]	30.01 [25.12; 36.80]	579.00 [498.00; 712.00]	7.29 [6.94; 7.98]
5. ВКД + бег	52.70 [48.90; 54.50]	1.10 [1.00; 1.30]	15.60 [11.60; 17.30]	2.10 [1.90; 2.30]	36.25 [35.15; 39.49]	651.00 [584.00; 751.00]	7.94 [7.27; 9.04]
6. ВКД/СтД + бег	47.70 [40.10; 51.30]	1.00 [1.00; 1.20]	14.50 [10.70; 16.40]	1.80 [1.60; 2.10]	35.30 [31.28; 40.99]	651.00 [529.00; 745.00]	7.62 [6.77; 9.21]

Статистическая значимость отличий при $p < 0.05$: * – от группы “СтД”, # – от группы “СтД + бег”.

выявленные корреляции. В группе “СтД” мышечная масса имела достоверную обратную корреляцию с концентрацией эстрадиола, как в крови ($r = -0.56$, $p = 0.045$), так и в мышечной ткани ($r = -0.64$, $p = 0.035$). В группе “СтД + бег” была выявлена положительная корреляция мышечной массы с уровнем МДА в мышечной ткани ($r = 0.70$, $p = 0.007$), что, возможно, указывает на физиологическую роль активных форм кислорода при сбалансированном питании и умеренных физических нагрузках в условиях, когда содержание МДА не выходит за пределы нормы [15]. В группе “ВКД” на фоне резкого снижения тестостерона в сыворотке крови сохранялась отрицательная корреляция между мышечной массой и содержанием

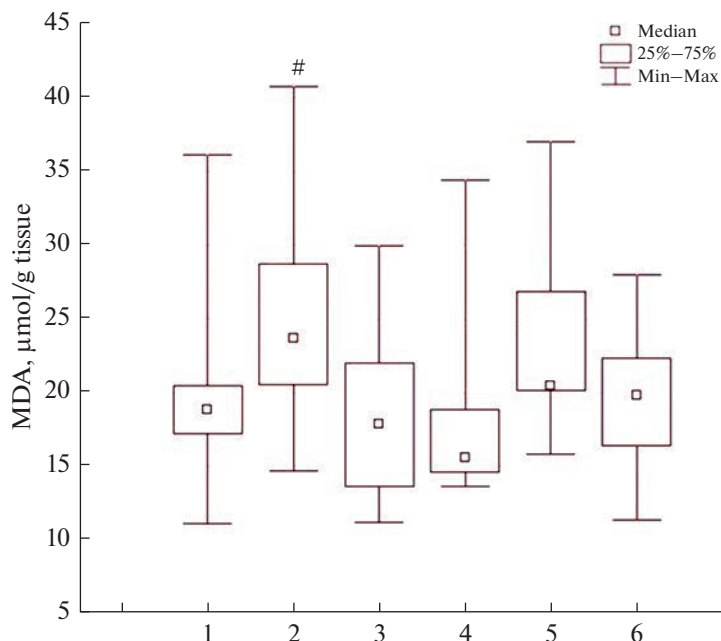


Рис. 2. Уровень МДА в тканях трехглавых мышц голени у крыс-самцов в зависимости от типа диеты и физических нагрузок (Ме [25; 75]): 1 – “СтД”; 2 – “ВКД”; 3 – “ВКД/СтД”; 4 – “СтД + бег”; 5 – “ВКД + бег”; 6 – “ВКД/СтД + бег”. Статистическая значимость отличий при $p < 0.05$: # – от группы “СтД + бег”.

эстрадиола в крови ($r = -0.55$, $p = 0.045$), и появилась значимая положительная корреляция с тестостероном крови ($r = 0.61$, $p = 0.022$), при этом мышечный МК давал высокую степень корреляции с тестостероном мышечной ткани ($r = 0.93$, $p = 4.07 \times 10^{-5}$). Противоположные взаимосвязи были выявлены в группе сочетанной коррекции ожирения “ВКД/СтД + бег”: на фоне супрафизиологического повышения содержания тестостерона в крови появлялась отрицательная корреляция между мышечным МК и тестостероном сыворотки крови ($r = -0.55$, $p = 0.049$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования были направлены на выяснение патогенетических факторов, играющих роль в снижении мышечной массы при ожирении у самцов крыс. Предположительно, к таким факторам можно отнести неблагоприятные сдвиги в состоянии гормонального статуса и нарастание продукции активных форм кислорода.

Классические представления о регуляции репродуктивного статуса связаны с осью гипоталамус–гипофиз–гонады. Известно, что при избыточном питании лептин подавляет экспрессию кисспептина/GPR54 в гипоталамусе, что вызывает снижение секреции гонадолиберина и соответственно снижение уровня тестостерона, циркулирующего в крови, у мужчин с ожирением [16]. Однако современные исследования значительно изменили классические представления о том, что синтез половых гормонов происходит исключительно в гонадах. Показано, что андрогены и эстрогены синтезируются в различных органах и тканях, таких как мозг, кожа, печень, почки, кости и т.д. [17]. Авторы [16, 17] убедительно доказали, что экспрессия

мРНК и белков, связанных со стероидогенезом: 3β -гидроксистероиддегидрогеназа (3β -ГСДГ), 17β -ГСДГ, 5α -редуктаза и ароматаза цитохрома P-450, обнаруживается в скелетных мышцах. Благодаря этому тестостерон, эстрадиол и 5α -дигидротестостерон (ДГТ) могут локально синтезироваться в скелетных мышцах из дегидроэпиандростерона (ДГЭА) [18], который циркулирует в крови в избыточном количестве. Полученные нами данные согласуются с вышеприведенными работами [10, 17, 18] и позволяют предположить, что локальный синтез тестостерона обеспечивает относительно высокий и стабильный уровень гормона в мышцах и, по-видимому, в какой-то степени защищает мышечный метаболизм от резких перепадов анаболических влияний, обусловленных вариациями функциональной активности гонад.

Что касается показателей оценки стресс-реакции у крыс, то, как правило, проводится определение содержания кортикостерона в сыворотке крови, поскольку именно этот гормон является преобладающим стероидным гормоном коры надпочечников у грызунов [19], что было подтверждено также и в нашей работе. Однако, как показали полученные нами данные, динамика стрессорной реакции была однотипно отражена также и сдвигами концентрации кортизола в крови. Исходя из этого, кортизол, наряду с кортикостероном, тоже может использоваться при изучении реакции коры надпочечников на стрессирующие воздействия у крыс.

Оценка показателей метаболизма в мышечной ткани при диет-индуцированном ожирении у крыс выявило повышение содержания глюкозы, лактата и активности ЛДГ, что может отражать усиленное поступление энергетических субстратов из кровяного русла в мышечную ткань, а также активацию метаболизма глюкозы при высококалорийном питании. Однако современные литературные данные обращают внимание на признаки нарушения метаболической гибкости в скелетных мышцах при ожирении [20]. Показано, что на фоне избытка энергетических субстратов в мышечной ткани развивается неспособность адаптироваться к возникающим метаболическим проблемам, что проявляется в виде снижения окисления липидов и углеводов и накопления токсичных недоокисленных продуктов [20]. Биохимические отклонения, выявленные в наших экспериментах, были сформированы за 8 недель высококалорийной диеты и носили обратимый характер, возвращаясь к норме за последующие 8 недель физических нагрузок даже на фоне избыточного питания, а также при нормализации диеты независимо от физической активности крыс-самцов линии Вистар.

Достоверное нарастание уровня МДА в мышечной ткани крыс при высококалорийном питании позволяет рассматривать перекисное окисление липидов как один из повреждающих факторов, сопутствующих снижению мышечной массы, что согласуется с литературными данными [8].

Полученные нами результаты в целом подтверждают представления о том, что избыточное питание и ожирение оказывают неблагоприятное воздействие на мышечную ткань и могут служить причинами саркопении [2, 3]. Анализ гормональных влияний приводит к выводу о том, что среди рассматриваемых стероидных гормонов именно тестостерон играет критичную роль для сохранения оптимальной мышечной массы у самцов крыс, что также согласуется с данными литературы [5, 6]. Корреляционные связи указывают на существенную зависимость мышечной массы от анаболического влияния тестостерона, однако эта связь значимо проявляется только при сниженном уровне гормона у крыс группы "ВКД". Концентрация тестостерона в крови, двукратно превышающая норму ("ВКД/СтД + бег"), сопровождается извращением корреляционной зависимости между МК и тестостероном (положительная взаимосвязь меняется на отрицательную). По-видимому, для поддержания нормального объема скелетной мускулатуры необходимо сбалансированное в рамках физиологической нормы влияние андрогенов, что согласуется с литературными данными [5–7]. Можно предположить, что относительная ста-

билизация анаболических влияний на состояние мышечной ткани достигается за счет локального синтеза тестостерона и эстрадиола [10, 17, 18].

ВЫВОДЫ:

1. Длительная высококалорийная диета приводит к развитию висцерального ожирения и снижению массы трехглавой мышцы голени у крыс-самцов линии Вистар.
2. На фоне снижения мышечной массы при ожирении в скелетных мышцах регистрируются метаболические сдвиги — нарастание содержания глюкозы, лактата и активности ЛДГ, а также нарастание перекисного окисления липидов.
3. Висцеральное ожирение сопровождается снижением содержания тестостерона в сыворотке крови, но при этом в мышечной ткани сохраняются относительно стабильные концентрации тестостерона и эстрадиола.
4. Корреляционный анализ указывает на положительную связь мышечной массы с содержанием тестостерона в условиях его дефицита.
5. Применение регулярных умеренных физических нагрузок при высококалорийной диете не приводит к снижению массы висцерального жира, не предупреждает потерю мышечной массы, но способствует нормализации биохимических сдвигов в мышечной ткани крыс и вызывает нормализацию уровня тестостерона в сыворотке крови.
6. Наиболее адекватная коррекция висцерального ожирения, массы мышц и биохимических отклонений в мышечной ткани у крыс-самцов достигается при переходе от высококалорийной к сбалансированной диете независимо от физических нагрузок.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции были согласованы с комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол №1 от 22 января 2021 г.) и соответствовали положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных целях (ETS N 123).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена на средства государственного бюджета Института физиологии НАН Беларуси в рамках ГПНИ “Фундаментальные и прикладные науки — медицине”, тема НИР “Изучить особенности нейрогуморального статуса и микробиома при ожирении; оценить эффективность вариантов коррекции массы тела”, № государственной регистрации 20210915.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Т.А.М.), планирование эксперимента (Т.А.М., А.А.Б.), сбор данных (Т.А.М., А.А.Б., Е.Н.Ч., О.Е.П., Я.В.Щ., Н.С.К.), обработка данных (А.А.Б., Е.Н.Ч.), написание и редактирование манускрипта (Т.А.М., А.А.Б., Е.Н.Ч., О.Е.П., Я.В.Щ., Н.С.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The European Health Report 2021. Taking stock of the health-related Sustainable Development Goals in the COVID-19 era with a focus on leaving no one behind. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2. Tomlinson DJ, Erskine RM, Morse CI, Winwood K, Pearson GO (2016) The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age. *Biogerontology* 17(3): 467–483.
<https://doi.org/10.1007/s10522-015-9626-4>
3. Mercier S, Mosoni L, Obled C, Patureau Mirand P, Breuille D (2002) Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J Nutr* 132(7): 1921–1928.
<https://doi.org/10.1093/jn/132.7.1921>
4. Романцова ТИ, Сыч ЮП (2019) Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении. *Ожирение и метаболизм* 16(4): 3–17. [Romantsova TR, Sych YuP (2019) Immunometabolism and metainflammation in obesity. *Obesity and metabolism* 16(4): 3–17. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/omet12218>
5. Van den Beld AW, De Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW (2000) Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with muscle strength, bone density, and body composition in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3276–3282.
<https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6825>
6. Auyeung TW, Lee JS, Kwok T, Leung J, Ohlsson C, Vandenput L, Leung PC, Woo J (2011) Testosterone but not estradiol level is positively related to muscle strength and physical performance independent of muscle mass: a cross-sectional study in 1489 older men. *Eur J Endocrinol* 164(5): 811–817.
<https://doi.org/10.1530/EJE-10-0952>
7. Gharahdaghi N, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Wilkinson DJ, Atherton PJ (2021) Links between testosterone, oestrogen, and the growth hormone/insulin-like growth factor axis and resistance exercise muscle adaptations. *Front Physiol* 11: 621226.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.621226>
8. Salucci S, Falcieri E (2020) Polyphenols and their potential role in preventing skeletal muscle atrophy. *Nutr Res* 74: 10–22.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.11.004>
9. Gupta P, Kumar S (2022) Sarcopenia and endocrine ageing: Are they related? *Cureus* 14(9): 1–10.
<https://doi.org/10.7759/cureus.28787>
10. Aizawa K, Iemitsu M, Otsuki T, Maeda S, Miyauchi T, Mesaki N (2008) Sex differences in steroidogenesis in skeletal muscle following a single bout of exercise in rats. *J Appl Physiol* 104: 67–74.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00558.2007>
11. Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T (2015) Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Sci Med* 47(2): 14–21.
<https://doi.org/10.14748/ssm.v47i2.1145>
12. Wang R, Tian H, Guo D, Tian Q, Yao T, Kong X (2020) Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci* 9(3): 211–227.
<https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.09.008>
13. Стальная ИД, Гаришвили ТГ (1977) Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: *Современные методы в биохимии. М. Медицина.* 66–68. [Stalnaya ID, Garishvili TG (1977) Method for the determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. In: *Modern methods in biochemistry. M. Medicine.* 66–68. (In Russ)].
14. Aizawa K, Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Mowa CN, Miyauchi T, Mesaki N (2007) Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(2): E577–E584.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00367.2006>
15. Jitcă G, Ōsz BE, Tero-Vescan A, Miklos AP, Rusz C-M, Bătrînu M-G, Vari CE (2022) Positive aspects of oxidative stress at different levels of the human body: a review. *Antioxidants (Basel)* 11(3): 572.
<https://doi.org/10.3390/antiox11030572>
16. Zhai L, Zhao J, Zhu Y, Liu Q, Niu W, Liu C, Wang Y (2018) Downregulation of leptin receptor and kisspeptin/GPR54 in the murine hypothalamus contributes to male hypogonadism caused by high-fat diet-induced obesity. *Endocrine* 62: 195–206.
<https://doi.org/10.1007/s12020-018-1646-9>
17. Sato K, Iemitsu M (2018) The role of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in skeletal muscle. *Vitam Horm* 108: 205–221.
<https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.03.002>
18. Sato K, Iemitsu M (2015) Exercise and sex steroid hormones in skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 145: 200–205.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.03.009>
19. Комольцев ИГ, Франкевич СО, Широбокова НИ, Костюнина ОВ, Волкова АА, Башкатова ДА, Шальнева ДВ, Кострюков ПА, Салып ОЮ, Новикова МР, Гуляева НВ (2022) Время суток нанесения удара влияет на выраженность немедленных судорог и повышение уровня кортикостерона при моделировании черепно-мозговой травмы. *Рос физиол журн им*

- ИМ Сеченова 108(12): 1668–1679. [Komolisev IG, Frankevich SO, Shirobokova NI, Kostyunina OV, Volkova AA, Bashkatova DA, Shalneva DV, Kostrukov PA, Salyp OYu, Novikova MR, Gulyaeva NV (2022) Acute corticosterone elevation and immediate seizure expression in rats depends on the time of the day when lateral fluid percussion brain injury has been applied. *Russ J Physiol* 108(12): 1668–1679. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S086981392212007X>
20. Mengeste AM, Rustan AC, Lund J (2021) Skeletal muscle energy metabolism in obesity. *Obesity* 29(10): 1582–1595.
<https://doi.org/10.1002/oby.23227>

Decrease in Muscle Mass in Diet-Induced Visceral Obesity in Male Wistar Rats: Relationship with Hormonal and Metabolic Parameters

**T. A. Mityukova^{a, *}, A. A. Basalai^{a, **}, K. N. Chudilovskaya^a, O. Y. Poluliakh^a,
Ya. V. Shcherbakov^a, and M. S. Kastsyuchenko^a**

^a*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

^{*}*e-mail: mityukova@gmail.com*

^{**}*e-mail: anastasiya.basalay@gmail.com*

Decrease in muscle mass, as a rule, develops with the aging of the body, but in obesity the signs of decrease in mass and functional activity of the skeletal muscles are also registered, which requires experimental research. The aim of the work was to study the effect of diet-induced obesity and health variants of its correction on mass-metric and metabolic tissue parameters of musculus triceps surae in male Wistar rats. The experiments were carried out on sexually mature male Wistar rats and included the study of mass-metric, metabolic and hormonal indices characterizing the state of muscle tissue under the standard (Std, 16 weeks) and high-caloric diet (HCD, 16 weeks), during the transition from HCD to standard diet (HCD/StD, 8/8 weeks), when physical activity in the form of running on a treadmill was added (StD + running, HCD + running and HCD/StD + running, 8/8). Prolonged high-caloric diet led to the development of visceral obesity and decreased musculus triceps surae mass in male Wistar rats. Metabolic shifts were registered in the skeletal muscles during HCD, such as an increase in glucose, lactate, lactate dehydrogenase activity, and lipid peroxidation. Visceral obesity was accompanied by a decrease in serum testosterone content, but the concentration of the hormone in muscle tissue remained relatively stable. Application of moderate physical activity in HCD did not lead to correction of visceral fat mass, did not prevent decrease in muscle mass, but caused normalization of biochemical indices in muscle tissue and serum testosterone level. The most adequate correction of visceral obesity, muscle mass and biochemical indices in muscle tissue in male rats was achieved by switching from a high-caloric to a balanced diet regardless of physical activity. Thus, correction of diet-induced visceral obesity, muscle mass and associated metabolic shifts in male Wistar rats requires a transition to a balanced diet.

Keywords: diet-induced visceral obesity, muscle mass reduction, muscle tissue metabolism, hormonal status, male rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОГЛИОЦИТОВ СПИННОГО МОЗГА
КРЫСЫ ПРИ ОСТРОМ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ**

© 2023 г. Е. А. Колос¹, *, Д. Э. Коржевский¹

¹*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: koloselena1984@yandex.ru*

Поступила в редакцию 04.05.2023 г.

После доработки 04.06.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

В настоящее время широко известно, что ключевым фактором в развитии многих неврологических патологий и нейродегенеративных заболеваний является нейровоспаление. Динамика развития и продолжительность нейровоспалительных реакций являются критическими аспектами в понимании закономерностей формирования физиологических, биохимических и поведенческих последствий различных неврологических нарушений. Во многих работах процесс развития нейровоспаления, а также глиальная реакция изучаются при экспериментальном системном воспалении. Детально исследуется влияние острого системного воспаления на состояние микроглиоцитов головного мозга, в то время как микроглия спинного мозга изучается в меньшей степени. Цель настоящего исследования состояла в оценке топографических и временных особенностей морфофункциональных изменений клеток микроглии спинного мозга крыс при экспериментальном ЛПС-индуцированном системном воспалении. Установлено, что на ранних этапах нейровоспаления (через 24 ч после введения ЛПС) происходит активация микроглиоцитов в вентральном белом и вентральном сером веществе спинного мозга. При этом микроглиоциты дорсальной части спинного мозга не проявляют морфологических признаков активации. Отмечено увеличение плотности популяции микроглиоцитов в вентральном канатике спинного мозга, где также выявлены скопления (агрегаты) реактивных микроглиоцитов.

Ключевые слова: нейровоспаление, микроглия, липополисахарид, спинной мозг

DOI: 10.31857/S0869813923070063, **EDN:** XMINUF

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования указывают на то, что ключевым фактором в развитии многих неврологических патологий и нейродегенеративных заболеваний является нейровоспаление [1–3]. Нейровоспаление представляет собой процесс активации врожденной иммунной системы ЦНС и характеризуется множеством клеточных и молекулярных изменений в нервной ткани, опосредованных продукцией цитокинов и хемокинов. Эти медиаторы продуцируются резидентной глией ЦНС (микроглией и астроцитами), эндотелиальными клетками и периферическими иммунными клетками [4]. Процесс нейровоспаления включает в себя активацию глиальных клеток, высвобождение ими про- и противовоспалительных молекул, продукцию активных форм кислорода и, нередко, миграцию периферических лейкоцитов в ЦНС. В значительной мере нейровоспаление носит защитный характер, однако при длительном течении и развитии чрезмерной активности процесса про-

исходит нарушение структурной и функциональной связи клеток в нервной системе, что ведет к повреждению гематоэнцефалического барьера. Нейровоспалительные реакции приводят к нейродегенерации, а нейродегенерация усиливает проявления нейровоспаления в ЦНС [5]. Показано, что уменьшение активности процессов нейровоспаления снижает тяжесть неврологических и нейродегенеративных заболеваний, в большинстве случаев улучшая их исход [6–10].

Глиocyты — самая многочисленная клеточная популяция ЦНС — осуществляет контроль гомеостаза нервной ткани, обеспечивает иммунные реакции и действует как первая линия защиты при повреждениях ЦНС. Ключевую роль в опосредовании нейровоспалительных реакций играет микроглия, представляющая собой основную популяцию иммунных клеток в головном и спинном мозге [4]. Учитывая разнообразие функций микроглии и ее способность оказывать противоположные эффекты на развитие воспалительных процессов в ЦНС, понимание происхождения, регуляции и разнообразия реактивных изменений микроглиоцитов является необходимым для разработки методов модуляции нейровоспалительных процессов. Для установления патофизиологических механизмов, лежащих в основе нейродегенеративных заболеваний, и создания препаратов для лечения заболеваний нервной системы, разрабатываются соответствующие модели для исследований нейровоспаления. В настоящее время для изучения различных этапов развития нейровоспаления в экспериментальных условиях используют модель ЛПС-индуцированного системного воспаления [11–13]. Большое количество исследований посвящено анализу процессов активации и реактивных изменений астроцитов и микроглии головного мозга при парентеральном введении ЛПС. Реактивные изменения глиоцитов спинного мозга при системном воспалении изучены фрагментарно [14–16]. Очевидно, что глубокое понимание механизмов и временных особенностей изменения активности микроглии, происходящих на разных этапах нейровоспаления, может пролить свет на детали патогенеза нейродегенерации спинного мозга и привести к более целенаправленной иммуномодулирующей терапии, эффективной при патологии спинного мозга.

Цель настоящего исследования состояла в оценке топографических и временных особенностей морфофункциональных изменений клеток микроглии спинного мозга при экспериментальном ЛПС-индуцированном системном воспалении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование выполнено на крысах-самцах Вистар ($n = 14$). Подопытным животным ($n = 7$) вводили липополисахарид (ЛПС) *E. coli* (055:B5; Sigma) внутривентрально в дозе 2 мг/кг. Животным контрольной группы ($n = 7$) внутривентрально вводили физиологический раствор в соответствующем объеме. Для подтверждения наличия системной иммунной реакции на введение ЛПС оценивали изменение лейкоцитарной формулы крови экспериментальных животных и животных группы контроля. У всех крыс проводили забор периферической капиллярной крови до начала эксперимента и через 24 ч после введения ЛПС (опытная группа) или физиологического раствора (контрольная группа). Определение числа лейкоцитов в крови животных проводили подсчетом в камере Горяева, а также выполняли подсчет лейкоцитов в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе. Установлено, что количество лейкоцитов в крови экспериментальных крыс возросло в 4 раза по сравнению с контрольными животными ($p < 0.05$), а количество нейтрофилов в крови подопытных животных увеличивалось в 2.5 раза ($p < 0.05$).

Через 24 ч после введения ЛПС (или физиологического раствора) у животных выделяли шейные отделы спинного мозга (CIII–CIV). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [17] в течение 24 ч, обезжизняли в спиртах

возрастающих концентраций и заливали в парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. На полученных срезах после депарафинирования и регидратации проводили иммуногистохимическую реакцию на кальций-связывающий белок Iba-1, являющийся микроглиально-макрофагальным маркером [18, 19]. В настоящее время известно, что в органах ЦНС наряду с микроглией присутствуют макрофаги, которые в норме локализуются в определенных участках мозга. Для спинного мозга такими участками являются периваскулярная рыхлая соединительная ткань сосудов и оболочки спинного мозга, которые в настоящем исследовании не рассматривались. В исследовании использовали поликлональные козы антитела (разведение 1 : 1000, AbCam, Великобритания). В качестве вторичных реактивов применяли антитела из набора VECTASTAIN® Universal Quick kit (PK-8800; Vector Laboratories Inc, США) с добавлением нормальной мышиной сыворотки (Dako, Дания). Для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3'3'-диаминобензидин DAB+ (Dako, Дания). Часть срезов подкрашивали толуидиновым синим. Полученные препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия), оснащенного камерой ICC50 (Leica, Германия). Для анализа микрофотографий использовали программное обеспечение LAS EZ (Leica, Германия). Оценку структурных и количественных изменений микроглиоцитов проводили в нескольких зонах спинного мозга: дорсальном сером веществе (I–V пластинки Рекседа), вентральном сером веществе (VI–IX пластинки Рекседа), дорсальном белом веществе (дорсальные канатики), боковом белом веществе (боковые канатики) и вентральном белом веществе (передние канатики). Для оценки реакции микроглии на парентеральное введение ЛПС получали фотографии областей серого и белого вещества спинного мозга крыс, расположенные близко друг к другу, но без перекрытия. Было получено не менее 4 изображений на каждую исследуемую зону каждого животного. В ходе исследования подсчитывали общее количество клеток микроглии на единицу площади исследуемой зоны (мм^2), то есть плотность распределения клеток микроглии. При подсчете учитывали только Iba-1-иммунопозитивные клетки, ядра которых расположены в плоскости среза. Иммунопозитивные фрагменты, не содержащие ядра клетки в плоскости среза, не учитывали. Также в настоящем исследовании с помощью программного обеспечения ImageJ определяли долю площади спинного мозга контрольных и экспериментальных животных, занимаемую иммунопозитивными клетками. Сравнение данных проводилось на основе *t*-критерия Стьюдента, результаты статистического анализа считались значимыми при $p < 0.05$. Числовые данные в таблицах представлены в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения.

Специфичность иммуногистохимической реакции на Iba-1 определяли с помощью постановки отрицательного и положительного контролей. Положительный контроль осуществляли путем проведения иммуногистохимического выявления Iba-1 на архивных срезах головного мозга крыс, фиксированных и обработанных аналогично исследуемому спинному мозгу. При постановке отрицательного контроля на срезы спинного мозга крыс вместо первичных антител наносили разбавитель для антител (S0809, Dako, Дания).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении отрицательного контроля для иммуногистохимической реакции на Iba-1 не обнаружено иммунопозитивных клеток и других структур на срезах спинного мозга исследуемых животных. При положительном иммуногистохимическом контроле позитивная реакция отмечена в округлых и веретеновидных клетках головного мозга крыс, обладающих длинными тонкими ветвящимися отростками, то есть в клетках, имеющих морфологические признаки рамифицированных

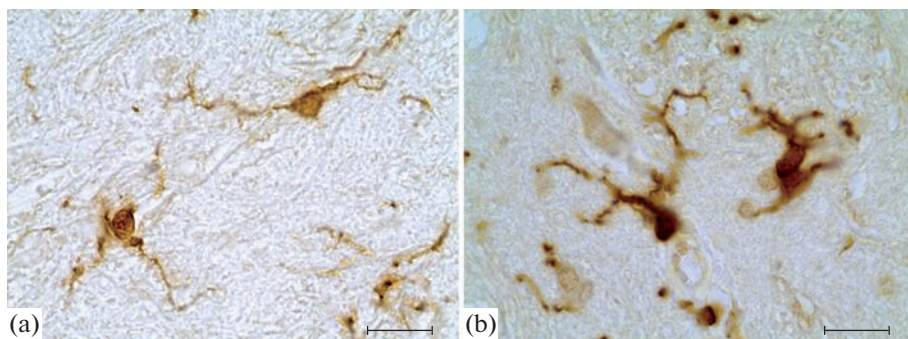


Рис. 1. Иммунопозитивные клетки вентрального серого вещества спинного мозга крыс группы контроля (а) и экспериментальной группы (б). Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Масштабный отрезок – 20 мкм.

микроглиоцитов. Нейроны и другие глиоциты (олигодендроциты, эпендимоциты, астроциты) головного мозга крыс не проявляют иммунореактивности, что свидетельствует о высокой специфичности использованного протокола.

В настоящем исследовании были использованы морфологические критерии оценки состояния микроглиоцитов. Клетки с разветвленными тонкими отростками представляют собой “покоящуюся” глию; реактивная микроглия, находящаяся в некоторой степени активации, характеризуется ретракцией отростков и увеличением тела, амебоидная микроглия, находящаяся в крайней степени активации, представляет собой фагоцитирующие клетки [19, 20]. Соответственно разные степени активации микроглии демонстрируют различные размеры тел и отростков, что позволяет оценить состояние активации микроглии по изменению площади, занимаемой иммунопозитивными клетками. Данный подход часто применяется при исследовании реактивных изменений глиоцитов [21–24].

У животных группы контроля иммунопозитивные клетки равномерно распределены по всем областям спинного мозга. В сером веществе вентральной части спинного мозга присутствуют Iba-1-иммунопозитивные ($Iba1^+$) клетки с округлым телом, обладающие тонкими радиально расположенными длинными тонкими ветвящимися отростками (рис. 1а). То есть клетки вентрального серого вещества имеют морфологические признаки рамифицированных микроглиоцитов. Лишь единичные гипертрофированные клетки микроглии имели признаки активации: круглое тело и толстые короткие первичные отростки с редким ветвлением. В области дорсального серого вещества иммунореактивность проявляют мелкие клетки с овальным или округлым телом и несколькими тонкими ветвящимися отростками. Немногочисленные иммунопозитивные клетки белого вещества спинного мозга представляют собой мелкие клетки округлой формы с двумя, реже тремя, тонкими ветвящимися отростками. Также в белом веществе обнаруживается большое количество тонких иммунопозитивных отростков клеток, тела которых не попали в плоскость среза (рис. 2а).

У экспериментальных животных в области вентрального серого вещества также идентифицируются многочисленные иммунопозитивные клетки, обладающие признаками рамифицированных клеток. Однако в ходе исследования в области вентрального серого вещества было идентифицировано также большое количество $Iba1^+$ -клеток с признаками реактивных изменений. Такие клетки обладают увеличенным телом неправильной формы и укороченными маловетвящимися утолщен-

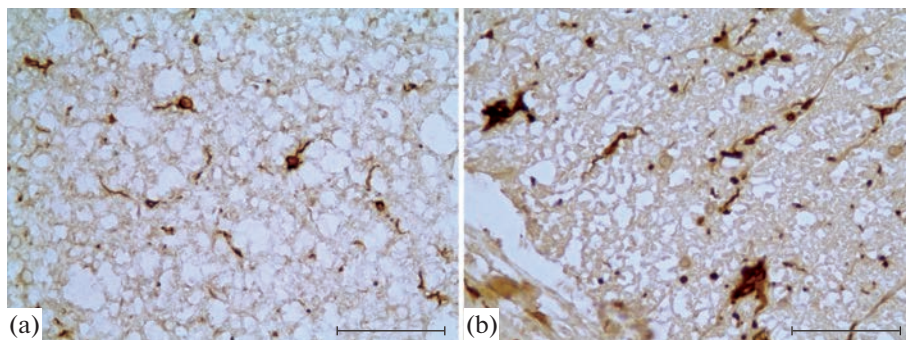


Рис. 2. Иммунопозитивные клетки вентрального канатика спинного мозга крыс группы контроля (а) и экспериментальной группы (б). Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Масштабный отрезок — 50 мкм.

ными отростками (рис. 1b). В области дорсального серого вещества идентифицируются мелкие клетки с овальным или округлым телом и несколькими тонкими ветвящимися отростками. При анализе иммунопозитивных клеток белого вещества спинного мозга было отмечено, что Iba1⁺-клетки дорсального канатика спинного мозга подопытных животных сохраняют признаки рамифицированных клеток, в то время как иммунопозитивные клетки вентрального канатика претерпевают значительные изменения. В данной области спинного мозга подопытных животных было идентифицировано большое количество иммунопозитивных клеток с телом неправильной формы и толстыми короткими отростками. Также в области вентрального белого вещества спинного мозга подопытных животных присутствуют клетки с гипертрофированным телом, нередко лишенные отростков (рис. 2b). Кроме того, в области вентрального канатика идентифицируется большое количество иммунопозитивных толстых маловетвящихся отростков клеток, тела которых не попали в плоскость среза. Отмечено, что в области переднего белого вещества спинного мозга подопытных животных обнаруживаются скопления Iba-1-иммунопозитивных клеток (клеточные агрегаты), содержащие от 4 до 6 клеточных ядер (рис. 3). Клетки, образующие такие структуры, обладают малым количеством коротких, толстых отростков, которые окружают волокна белого вещества. Нередко в цитоплазме клеток, образующих подобные агрегаты, присутствуют крупные вакуоли.

В настоящем исследовании установлено, что у экспериментальных животных количество иммунопозитивных клеток на единицу площади вентрального канатика спинного мозга значительно возрастает по сравнению с группой контроля ($p < 0.05$) (табл. 1). Кроме того, площадь, занимаемая Iba-1-иммунопозитивными клетками в вентральном сером и вентральном белом веществе спинного мозга, также достоверно увеличивается ($p < 0.05$) через 24 ч после парентерального введения ЛПС (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальная стимуляция развития воспаления может быть достигнута различными способами, наиболее часто в исследованиях применяют введение лабораторным животным бактериального ЛПС. ЛПС — компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, является часто применяемым провоспалительным агентом в экспериментальной модели нейровоспаления на животных, используется

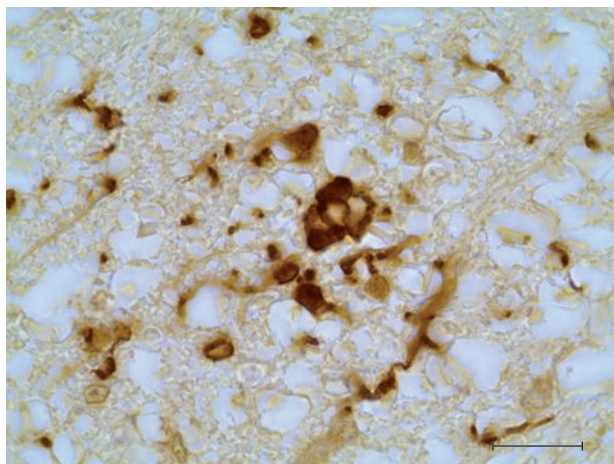


Рис. 3. Клеточный агрегат, образованный Iba-1-иммунопозитивными клетками в вентральном белом веществе спинного мозга крысы через 24 ч после парентерального введения ЛПС. Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Масштабный отрезок — 20 мкм.

для стимуляции нейровоспалительных реакций *in vivo* [11, 25, 26] и *in vitro* [27, 28]. Системное введение ЛПС, даже в низких дозах, индуцирует выработку провоспалительных цитокинов иммунными клетками и может вызвать воспаление в ЦНС, точный механизм развития которого до конца не выяснен. Было показано, что периферическое введение ЛПС вызывает активацию микроглии в головном мозге грызунов и изменение ее морфологии от разветвленной до амeboидной формы [29–31]. В настоящее время имеется ограниченная информация о реактивных изменениях микроглии спинного мозга при ЛПС-индуцированных воспалительных состояниях. Лишь единичные исследования касаются данного вопроса. Кроме того, основное внимание исследователи уделяют грудному и поясничному отделу спинного мозга [15, 16].

В настоящем исследовании показано, что через 24 ч после внутрибрюшинного введения ЛПС, микроглия шейного отдела спинного мозга проявляет признаки реактивных изменений. Причем морфологические изменения проявляют только клетки вентральной части спинного мозга. В работе, посвященной исследованию микроглии поясничного отдела спинного мозга неонатальных крыс при системном воспалении, выявлены значительные реактивные изменения в дорсальных ро-

Таблица 1. Изменение плотности распределения Iba1⁺-клеток в спинном мозге крыс через 24 ч после введения ЛПС в дозе 2 мг/кг

Область спинного мозга	Подопытная группа (<i>n</i> = 7; кл/мм ²)	Контрольная группа (<i>n</i> = 7; кл/мм ²)
Дорсальное серое вещество	131.56 ± 11.00	139.06 ± 3.86
Вентральное серое вещество	74.84 ± 26.43	68.68 ± 25.63
Дорсальное белое вещество	74.37 ± 13.88	78.11 ± 13.49
Латеральное белое вещество	85.93 ± 15.75	82.03 ± 13.64
Вентральное белое вещество	99.47 ± 3.44*	75.77 ± 5.89

* — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Изменение доли площади, занятой Iba1⁺-структурами в спинном мозге крыс через 24 ч после введения ЛПС в дозе 2 мг/кг

Область спинного мозга	Подопытная группа (n = 7; %)	Контрольная группа (n = 7; %)
Дорсальное серое вещество	0.78 ± 0.06	0.82 ± 0.16
Вентральное серое вещество	1.05 ± 0.20*	0.50 ± 0.10
Дорсальное белое вещество	1.30 ± 0.25	1.18 ± 0.28
Латеральное белое вещество	1.44 ± 0.07	1.70 ± 0.29
Вентральное белое вещество	1.92 ± 0.24*	1.18 ± 0.10

* — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

гах спинного мозга [15]. Авторы отмечают увеличение размера клеток микроглии, но не их количества. В ходе настоящего эксперимента не было отмечено структурных и количественных изменений микроглиоцитов в области дорсального белого и серого вещества шейного отдела спинного мозга взрослых крыс через 24 ч после введения ЛПС. Данный факт может свидетельствовать как о различии в реактивных изменениях глиальных клеток на разных уровнях спинного мозга, так и о возрастном различии реактивности микроглиоцитов в ответ на острое системное воспаление. Данные предположения требуют дополнительных исследований.

При оценке микроглиальной реакции через 24 ч после парентерального введения ЛПС мы обнаружили, что процент площади, занимаемой Iba1⁺-элементами в вентральном сером веществе мозга экспериментальных животных, увеличился в 2 раза по сравнению с контролем. Этот результат согласуется с ранее полученными данными [14]. Кроме того, отмечено, что через 24 ч после введения ЛПС значительно возрастает площадь, занимаемая Iba1⁺-клетками в вентральном белом веществе спинного мозга, по сравнению с контролем. Данный факт может свидетельствовать как об увеличении количества микроглиоцитов в анализируемой области, так и об увеличении объема цитоплазмы отдельных клеток микроглии за счет их активации без увеличения числа клеток. Для выяснения этого вопроса мы провели количественный анализ клеток микроглии. Отмечено, что общее число микроглиоцитов в сером веществе передних рогов спинного мозга не изменяется при системном воспалении, в то время как количество Iba1⁺-клеток вентрального белого вещества достоверно возрастает через сутки после введения ЛПС. Гипертрофические изменения клеток вентрального серого вещества свидетельствуют о вступлении микроглиоцитов в процесс активации. Отдельные исследования показывают, что через 24 ч после введения ЛПС в передних рогах спинного мозга у мышей наблюдаются дистрофические изменения нейронов, однако инфильтрация нейтрофилами и лимфоцитами отсутствует [16]. В ходе настоящего исследования мы не обнаружили признаков гибели нейронов спинного мозга или каких-либо морфологических признаков нейродегенерации. Также, с применением гистологической окраски, нами показано отсутствие нейтрофильной инфильтрации нервной ткани. Данный факт свидетельствует о том, что активация микроглии не ассоциирована с патологическими изменениями нервных клеток вентральных рогов или их гибелью и, вероятно, связана лишь с реорганизацией синаптических связей в данной области.

В настоящем исследовании установлено, что через 24 ч после введения ЛПС микроглиоциты вентрального белого вещества спинного мозга проявляют морфологические признаки реактивных изменений. Также в данной области шейного отдела спинного мозга отмечено увеличение плотности популяции микроглиоцитов

и присутствие групп активированных микроглиоцитов (агрегатов). Нередко клетки в составе агрегатов содержат вакуоли, что может свидетельствовать о поглощении микроглиоцитами продуктов распада миелина. До сих пор отсутствуют убедительные доказательства того, что нарушение или повреждение аксонов в трактах белого вещества индуцируется активированной микроглией. В ряде исследований высказывается предположение, что активация микроглии может привести к нарушению трактов белого вещества с вовлечением в этот процесс нейротоксических цитокинов активированной глии [32–35]. Считается, что активация микроглии как первичное событие, либо как следствие повреждения миелинизирующих клеток, стимулирует демиелинизацию [34]. Другие же работы доказывают, что микроглия необходима для ремиелинизации и стимуляции олигодендроцитов [33–36]. Такие противоположные данные могут свидетельствовать о том, что в белом веществе активированная микроглия может играть как повреждающую, так и протективную роль, но ее точные функции до сих пор неясны. Известно, что в вентральном канатике спинного мозга располагается комплекс как двигательных, так и сенсорных путей. Здесь проходят нисходящие тракты: вестибулоспинальный тракт, кортикоспинальный тракт, ретикулоспинальный и восходящий передний спиноталамический путь, а также аксоны двигательных нейронов спинного мозга. Как следует из клинических исследований, при сепсисе и полиорганной дисфункции, осложняющей различные первичные заболевания, присутствует ранняя тяжелая двигательная и сенсорная полинейропатия [37–39]. Однако причина таких явлений не ясна и чаще расценивается как периферическое нарушение нервов и мышц [40–42]. Можно предположить, что в такие нарушения вносит вклад и нейровоспаление, поддерживаемое активацией микроглии в вентральном канатике спинного мозга.

В нашем исследовании отмечено, что через 24 ч после введения ЛПС в области переднего белого вещества увеличивается плотность популяции $Iba1^{+}$ -клеток, а также присутствуют агрегаты иммунопозитивных клеток и $Iba1^{+}$ -клетки, содержащие вакуоли в своей цитоплазме. Ранее подобные скопления микроглиоцитов были идентифицированы нами в белом веществе спинного мозга стареющих крыс [24]. Их образование, вероятно, связано с возрастной демиелинизацией аксонов. Однако, в отличие от эффекта острого системного воспаления, при старении процессы демиелинизации и активации микроглии преобладают в дорсальном канатике спинного мозга что, вероятно, вносит вклад в развитие возрастных сенсорных нарушений. Установлено, что моноциты проникают в ЦНС уже через 24 ч после введения высоких доз ЛПС [43]. Можно предположить, что при использовании модели ЛПС-индуцированного системного воспаления, популяцию активированных $Iba1^{+}$ -клеток вентрального канатика могут пополнять периферические иммунные клетки путем инфильтрации. Однако в исследованиях головного мозга показано, что лишь при хроническом воспалении или при введении токсических доз ЛПС происходит нарушение гематоэнцефалического барьера и транзитное рекрутирование нейтрофилов и моноцитов в паренхиму головного мозга [43–46]. Согласно литературным данным, при введении низких доз ЛПС первые признаки нарушения гематоэнцефалического барьера отмечаются не ранее 27 ч после инъекции [47]. Возможно, степень участия мононуклеарных фагоцитов в процессах изменения популяции микроглии вентрального канатика спинного мозга поможет раскрыть применение дополнительных иммуногистохимических маркеров.

В настоящей работе установлено, что микроглия дорсальных и вентральных канатиков спинного мозга по-разному реагирует на введение ЛПС. Причина установленного факта неясна. Можно предположить, что это связано с особенностями гемато-спинномозгового барьера этих областей. Гемато-спинномозговой барьер

обеспечивает поддержание тканевого гомеостаза спинного мозга путем избирательного транспорта молекул и клеток и состоит из нефенестрированных эндотелиальных клеток с плотными межклеточными контактами, базальной мембраны, перицитов и ножек астроцитов [48]. В литературе имеются отдельные данные о том, что степень покрытия перицитами кровеносных сосудов вентрального рога выше, чем сосудов заднего рога спинного мозга [49]. Данный факт свидетельствует о структурных различиях гемато-спинномозгового барьера вентральной и дорзальной областей спинного мозга. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что гемато-спинномозговой барьер является более проницаемым, чем гемато-энцефалический барьер, в связи с относительно низкой экспрессией белков плотных контактов [50]. Отмечено также, что при патологии именно в вентральной области спинного мозга происходит нарушение гемато-спинномозгового барьера, наблюдается дегенерация эндотелия, снижение популяции перицитов и увеличение плотности сосудов [49, 51]. Однако в исследованиях нарушения барьера головного мозга показано, что изменение его проницаемости происходит лишь при введении токсичной дозы ЛПС [45, 46]. Таким образом, вопрос о состоянии гемато-спинномозгового барьера при остром системном воспалении нуждается в дальнейших исследованиях.

ВЫВОДЫ

В настоящем исследовании на модели ЛПС-индуцированного острого системного воспаления изучены ранние морфофункциональные изменения микроглиоцитов в шейном отделе спинного мозга крыс. Установлено, что на ранних этапах нейровоспаления (через 24 ч после введения ЛПС) происходит активация микроглиоцитов в вентральном белом и вентральном сером веществе спинного мозга. Отмечено увеличение плотности популяции микроглиоцитов в вентральном канатике спинного мозга. В этой области выявлены также скопления (агрегаты) реактивных микроглиоцитов. При этом микроглиоциты дорсальной части спинного мозга не проявляют морфологических признаков активации. Динамика развития и продолжительность нейровоспалительных реакций являются критическими аспектами в понимании механизмов и модуляции физиологических, биохимических и поведенческих последствий нейровоспаления в спинном мозге.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали стандартам, утвержденным “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Исследование было одобрено этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.К., Д.Э.К. — разработали эксперимент, провели анализ материала, участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen WW, Zhang X, Huang WJ* (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Reports* 13(4): 3391–3396.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948>
2. *Stuckey SM, Ong LK, Collins-Praino LE, Turner RJ* (2021) Neuroinflammation as a Key Driver of Secondary Neurodegeneration Following Stroke? *Int J Mol Sci* 22(23): 13101.
<https://doi.org/10.3390/ijms222313101>
3. *Hanna L, Poluyi E, Ikwuegbuenyi C, Morgan E, Imaguezegie G* (2022) Peripheral inflammation and neurodegeneration; a potential for therapeutic intervention in Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Egypt J Neurosurg* 37: 15.
<https://doi.org/10.1186/s41984-022-00150-4>
4. *DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP* (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* 139 (Suppl 2): 136–153.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
5. *Ransohoff RM* (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* (New York) 353(6301): 777–783.
<https://doi.org/10.1126/science.aag2590>
6. *Bassani TB, Vital MA, Rauh LK* (2015) Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *Arquivos de Neuro-psiquiatr* 73(7): 616–623.
<https://doi.org/10.1590/0004-282X20150057>
7. *Wang J, Tan L, Wang HF, Tan CC, Meng XF, Wang C, Tang SW, Yu JT* (2015) Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *J Alzheimer's Disease*: JAD 44(2): 385–396.
<https://doi.org/10.3233/JAD-141506>
8. *McGeer PL, Rogers J, McGeer EG* (2016) Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years. *J Alzheimer's Disease*: JAD 54(3): 853–857.
<https://doi.org/10.3233/JAD-160488>
9. *Kadusevicius E* (2021) Novel Applications of NSAIDs: Insight and Future Perspectives in Cardiovascular, Neurodegenerative, Diabetes and Cancer Disease Therapy. *Int J Mol Sci* 22(12): 6637.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126637>
10. *Oliveira NSS, de Moraes AFB, Tavares APG, de Figueiredo BQ, de Matos BA, Amorim GS, Miranda LD, Oliveira RC* (2021) The use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) as one of the pharmacological alternatives for patients with Alzheimer's Disease: a systematic literature review. *Res Society and Development* 10(16): e146101623609.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.23609>
11. *Catorce MN, Gevorkian G* (2016) LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Current Neuropharmacol* 14(2): 155–164.
<https://doi.org/10.2174/1570159x14666151204122017>
12. *Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP* (2019) Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 20(9): 2293.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
13. *Tamura Y, Yamato M, Kataoka Y* (2022) Animal Models for Neuroinflammation and Potential Treatment Methods. *Front Neurol* 13: 890217.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.890217>
14. *Kolos EA, Korzhevskii DE* (2017) Activation of Microglyocytes in the Anterior Horns of Rat Spinal Cord after Administration of Bacterial Lipopolysaccharide. *Bull Exp Biol Med* 163(4): 515–518.
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3841-8>
15. *Wen W, Gong X, Cheung H, Yang Y, Cai M, Zheng J, Tong X, Zhang M* (2021) Dexmedetomidine Alleviates Microglia-Induced Spinal Inflammation and Hyperalgesia in Neonatal Rats by Systemic Lipopolysaccharide Exposure. *Front Cell Neurosci* 15:725267.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.725267>
16. *Hirotsu A, Miyao M, Tatsumi K, Tanaka T* (2022) Sepsis-associated neuroinflammation in the spinal cord. *PloS One* 17(6): e0269924.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269924>
17. *Grigorev IP, Korzhevskii DE* (2018) Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Modern Technol Med* 10 (2): 156–165.
<https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>

18. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 (Pt 17): 3073–3084. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>
19. Kolos EA, Korzhevskii DE (2020) Spinal Cord Microglia in Health and Disease. *Acta Naturae* 12(1): 4–17. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10934>
20. Fernandez-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Duran P, Fernandez-Llebrez P, Lopez-Avalos MD (2017) Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci* 11: 235. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>
21. Nuvolone M, Paolucci M, Sorce S, Kana V, Moos R, Matozaki T, Aguzzi A (2017) Prion pathogenesis is unaltered in the absence of SIRP α -mediated “don’t-eat-me” signaling. *PloS One* 12(5): e0177876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177876>
22. Kartalou G I, Salgueiro-Pereira AR, Endres T, Lesnikova A, Casarotto P, Pousinha P, Delanoe K, Edelmann E, Castren E, Gottmann K, Marie H, Lessmann V (2020) Anti-Inflammatory Treatment with FTY720 Starting after Onset of Symptoms Reverses Synaptic Deficits in an AD Mouse Model. *Int J Mol Sci* 21(23): 8957. <https://doi.org/10.3390/ijms21238957>
23. Tyrtysnaia A, Bondar A, Konovalova S, Sultanov R, Manzhulo I (2020) N-Docosahexanoyl ethanolamine Reduces Microglial Activation and Improves Hippocampal Plasticity in a Murine Model of Neuroinflammation. *Int J Mol Sci* 21(24): 9703. <https://doi.org/10.3390/ijms21249703>
24. Kolos EA, Korzhevskii DE (2022) Age-related changes in microglia of the rat spinal cord. *J Evol Biochem Physiol* 58(4): 1142–1151. <https://doi.org/10.1134/S0022093022040172>
25. Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D (2015) Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation* 12:114. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>
26. Kolos EA, Korzhevskii DE (2020) Immunohistological Detection of Active Satellite Cells in Rat Dorsal Root Ganglia after Parenteral Administration of Lipopolysaccharide and during Aging. *J Evol Biochem Physiol* 169(5): 665–668. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04950-2>
27. Cao L, Fei L, Chang TT, DeLeo JA (2007). Induction of interleukin-1 β by interleukin-4 in lipopolysaccharide-treated mixed glial cultures: microglial-dependent effects. *J Neurochem* 102(2): 408–419. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04588.x>
28. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173(4): 649–665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
29. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neurosci* 10(11): 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
30. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91(2): 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
31. Stratoulis V, Venero JL, Tremblay ME, Joseph B (2019) Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *The EMBO J* 38(17): e101997. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101997>
32. Yang X, Zhang JD, Duan L, Xiong HG, Jiang YP, Liang HC (2018) Microglia activation mediated by toll-like receptor-4 impairs brain white matter tracts in rats. *J Biomed Res* 32(2): 136–144. <https://doi.org/10.7555/JBR.32.20170033>
33. Lee J, Hamanaka G, Lo EH, Arai K (2019) Heterogeneity of microglia and their differential roles in white matter pathology. *CNS Neurosci & Therap* 25(12): 1290–1298. <https://doi.org/10.1111/cns.13266>
34. Marzan DE, Brügger-Verdon V, West BL, Liddelov S, Samanta J, Salzer JL (2021) Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia* 69(6): 1583–1604. <https://doi.org/10.1002/glia.23980>
35. Xu L, Wang J, Ding Y, Wang L, Zhu YJ (2022) Current Knowledge of Microglia in Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Neurol* 12: 796704. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.796704>
36. Sariol A, Mackin S, Allred MG, Ma C, Zhou Y, Zhang Q, Zou X, Abrahante JE, Meyerholz DK, Perlman S (2020) Microglia depletion exacerbates demyelination and impairs remyelination in a neurotropic coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(39): 24464–24474. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007814117>

37. Bolton CF, Gilbert JJ, Hahn AF, Sibbald WJ (1984) Polyneuropathy in critically ill patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47(11): 1223–1231.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.47.11.1223>
38. Hund EF, Fogel W, Krieger D, DeGeorgia M, Hacke W (1996) Critical illness polyneuropathy: clinical findings and outcomes of a frequent cause of neuromuscular weaning failure. *Crit Care Med* 24(8): 1328–1333.
<https://doi.org/10.1097/00003246-199608000-00010>
39. Plaut T, Weiss L (2022) Electrodiagnostic Evaluation of Critical Illness Neuropathy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Stat Pearls Publ. 2023.
40. Hund E (2001) Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol* 248(11): 929–934.
<https://doi.org/10.1007/s004150170043>
41. Nayci A, Atis S, Comelekoglu U, Ozge A, Ogenler O, Coskun B, Zorludemir S (2005) Sepsis induces early phrenic nerve neuropathy in rats. *Europ Respir J* 26(4): 686–692.
<https://doi.org/10.1183/09031936.05.0111004>
42. Axer H, Grimm A, Pausch C, Teschner U, Zinke J, Eisenach S, Beck S, Guntinas-Lichius O, Brunkhorst FM, Witte OW (2016) The impairment of small nerve fibers in severe sepsis and septic shock. *Crit Care* (London, England) 20: 64.
<https://doi.org/10.12669/pjms.38.1.4396>
43. Trzeciak A, Lerman YV, Kim TH, Kim MR, Mai N, Halterman MW, Kim M (2019) Long-Term Microgliosis Driven by Acute Systemic Inflammation. *J Immunol* (Baltimore, Md: 1950) 203(11): 2979–2989.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900317>
44. Thomson CA, McColl A, Graham GJ, Cavanagh J (2020) Sustained exposure to systemic endotoxin triggers chemokine induction in the brain followed by a rapid influx of leukocytes. *J Neuroinflammation* 17: 94.
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01759-8>
45. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, & Kataoka Y (2009) Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol* 29(3): 309–316.
<https://doi.org/10.1007/s10571-008-9322-x>
46. Wu F, Chen X, Zhai L, Wang H, Sun M, Song C, Wang T, Qian Z (2020) CXCR2 antagonist attenuates neutrophil transmigration into brain in a murine model of LPS induced neuroinflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 529(3): 839–845.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.124>
47. He H, Geng T, Chen P, Wang M, Hu J, Kang L, Song W, Tang H (2016) NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. *Scient Rep* 6: 27711.
<https://doi.org/10.1038/srep27711>
48. Chopra N, Menounos S, Choi JP, Hansbro PM, Diwan AD, Das A. (2021) Blood-Spinal Cord Barrier: Its Role in Spinal Disorders and Emerging Therapeutic Strategies. *J Neuro Sci* 3: 1–27.
<https://doi.org/10.3390/neurosci3010001>
49. Yamadera M, Fujimura H, Inoue K, Toyooka K, Mori C, Hirano H, Sakoda S (2015) Microvascular disturbance with decreased pericyte coverage is prominent in the ventral horn of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration* 16(5-6): 393–401.
<https://doi.org/10.3109/21678421.2015.1011663>
50. Ge S, Pachter JS (2006) Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord. *J Neuroimmunol* 177(1–2): 209–214.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.05.012>
51. Winkler EA, Sengillo D, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV (2013). Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125(1): 111–120.
<https://doi.org/10.1007/s00401-012-1039-8>

Reactive Changes of Rat Spinal Cord Microgliaocytes after Acute Systemic Inflammation

E. A. Kolos^a, * and D. E. Korzhevskii^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia*

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

It is widely known that neuroinflammation is a key factor in the development of many neurological pathologies and neurodegenerative diseases. The dynamics of development and duration of neuroinflammatory responses are critical aspects in understanding the patterns of physiological, biochemical and behavioral consequences. The most common

object of study is neuroinflammation that develops after experimental systemic inflammation. The effect of acute systemic inflammation on brain microgliocytes has been studied extensively, while spinal cord microglia have been studied less frequently. The purpose of this study was to assess the topographic and temporal features of morpho-functional changes in rat spinal cord microglial cells after experimental LPS-induced systemic inflammation. It has been established that in the early stages of neuroinflammation (24 hours after LPS administration), microgliocytes are activated in the ventral white and ventral gray matter of the spinal cord. At the same time, microgliocytes of the dorsal part of the spinal cord do not show morphological attribute of activation. An increase in the population density of microgliocytes in the ventral funiculus of the spinal cord was noted. Accumulations (aggregates) of reactive microgliocytes were also found in this area.

Keywords: neuroinflammation, microglia, lipopolysaccharide, spinal cord

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**РЕАКЦИЯ ЛАМИНИНА МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧКИ
НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНУЮ ДЕГИДРАТАЦИЮ КРЫС**

© 2023 г. И. И. Хегай*

*Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

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

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 31.05.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Ламинин является основным водорастворимым белком базальной мембраны эпителиальной ткани. Исследовано содержание ламинина в почечной паренхиме у крыс, находившихся в течение 60 ч на альтернативной водной диете с избыточным потреблением воды либо полным отсутствием питьевой воды в пище. Показано, что осмотическое концентрирование мочи, развивающееся вследствие водной депривации, сопровождается количественным изменением состава ламинина. Установлено, что в мозговом веществе почки дегидратированных крыс возрастает количество бета-цепи ламинина. Данный эффект наблюдается только у крыс линии WAG с нормально экспрессирующимся геном вазопрессина и отсутствует у мутантных крыс линии Brattleboro, неспособных синтезировать гормон. Повышение уровня бета-ламинина также не распространяется на корковое вещество. На основании исходных и новых данных предполагается, что ламинин как ключевой регуляторный элемент в составе базальной мембраны канальцевого эпителия участвует в адаптивной реакции концентрирующей системы почки к условиям продолжительной дегидратации. Гипергидратация не влияет на уровень ламинина в почечной паренхиме.

Ключевые слова: WAG, Brattleboro, дегидратация, почка, мозговое вещество, осмотическое концентрирование, ламинин, бета-пептид, вазопрессин

DOI: 10.31857/S0869813923070051, **EDN:** XMAGUM

ВВЕДЕНИЕ

Осмотическое концентрирование и разведение мочи являются адаптивными процессами, направленными на поддержание гомеостаза внутренней среды. Оба экскреторных механизма зависят от гормональной регуляции мочевыделительной функции почек и реализуются через изменение морфологических и биохимических свойств канальцевого аппарата. Эпителиальная выстилка почечных канальцев с внешней стороны тесно контактирует с базальной мембраной, образованной высокомолекулярными белками и протеогликанами. Белковая фракция представлена в основном коллагеном и ламинином. Фибриллярный коллаген формирует густую трехмерную сеть, выполняющую функцию поддерживающего скаффолда, стабилизирующего эпителиальную ткань, а водорастворимый ламинин осуществляет динамичное взаимодействие белков базальной мембраны с интегринами эпителиальных клеток. Белковые комплексы ламинина иницируют процесс формирования и реорганизации базальной мембраны, связываясь с рецепторным аппара-

том клеток и другими молекулами внеклеточного матрикса, задействованными в регуляции барьерной и обменной функции [1, 2]. Молекула ламинина имеет структуру гетеротримера, состоящего из трех типов пептидных цепей, собранных в форме креста. Три коротких ветви представляют одноцепочечные N-концевые ответвления от альфа-, бета- и гамма- пептидных цепей, способные объединяться с другими молекулами ламинина при образовании светлой базальной пластинки. Наиболее длинная четвертая ветвь собрана из C-концевых отделов всех трех пептидов, и через данный фрагмент осуществляется взаимодействие с коллагеном темной базальной пластинки и клеточными интегринами [3]. Эпителиальные ткани экспрессируют преимущественно ламинин 332. Цифры в названии белка обозначают конкретные варианты цепей, входящие в состав тканеспецифичного ламинина. Изоформа ламинина 332 представляет гетеротример, собранный из альфа 3-, бета 3-, гамма 2-подтипов пептидных мономеров [4, 5]. Пептиды ламинина связаны между собой дисульфидными мостиками и распадаются на отдельные молекулы под действием восстановителей в денатурирующих условиях. Различные типы пептидных цепей кодируются гомологичными генами, локализованными в разных хромосомах [6]. Уровень экспрессии генов отдельных цепей ламинина изменяется при заживлении ран или канцерогенезе, а также в экстремальных физиологических условиях [5, 7, 8]. Актуальной задачей является анализ реакции ламинина почечной паренхимы на продолжительное функционирование в состоянии гипергидратации и дегидратации.

Корковое и мозговое вещество почки различаются по составу канальцев и строению эпителиальной выстилки. В коре локализованы структуры нефрона, преимущественно связанные с осмотическим разведением и начальными стадиями концентрирования первичной мочи. В мозговом слое преобладают собирательные трубки, в которых происходит факультативная реабсорбция воды за счет изменения проницаемости канальцевых стенок для воды и повышения осмолярности медуллярного интерстиция. В этой связи целью работы было исследование реакции ламинина базальной мембраны эпителия на действие продолжительной контрастной физиологической нагрузки на почку с учетом локализации белка во внешнем или внутреннем слое почечной паренхимы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на взрослых крысах линий WAG и Brattleboro массой тела 200–250 г. На протяжении всего эксперимента животные находились в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым режимом, температурой в пределах $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажностью 40–60%. В каждой линии было задействовано по 20 самцов, представленных двумя группами по 10 крыс. Группы различались альтернативным режимом доступа к воде. Одна группа получала в качестве питья и еды только 4%-ный раствор сахарозы, другая была лишена доступа к питьевой воде и потребляла стандартный гранулированный корм для животных вивария. Лабораторные грызуны сравнительно безболезненно переносят такие нагрузки на моче-выделительную систему, мыши — продолжительностью двое суток, крысы — до трех суток [9]. В нашем эксперименте тестирование продолжалось в течение 60 ч и в итоге приводило либо к гипергидратации, либо к состоянию дегидратированности организма. В начале и конце срока испытания собирались пробы мочи, а в завершение эксперимента после анестезии тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутривенно) почки извлекались для последующего биохимического анализа. Осмолярность экскретуемой мочи измеряли криоскопическим методом [10] на криоскопическом миллиосмометре МТ-2 (“Буревестник” Санкт-Петербург). Из декапсулированной почки выделяли фрагменты коркового и мозгово-

го вещества, взвешивали и гомогенизировали на льду в лизирующем растворе следующего состава (в мМ): 300 сахарозы, 25 имидазола, 1 ЭДТА, 1 PMSF, pH 7.2. Гомогенаты осветляли центрифугированием при следующих условиях: ускорение 2000 g, 10 мин при 0°C. Белки супернатанта фракционировали электрофорезом в полиакриламидном геле (5% концентрирующий 0.15 М Трис-НСl pH 6.8, 10% разделяющий 0.4 М Трис-НСl pH 8.8) в денатурирующих условиях [11]. Буфер для нанесения белковых проб содержал 2.5% додецилсульфата натрия, 0.5% β-меркаптоэтанол, 50% глицерола, 1% бромфенолового синего, 0.15 М Трис-НСl, pH 6.8. Белки денатурировали в водяной бане в течение 10 мин при 100°C. После электрофореза в 0.025 М Трис-глицин электродном буфере гели фиксировали в 70%-ном растворе изопропанола и окрашивали Coomassie G-250. Для оценки молекулярного веса использовали миозин (210 кДа), актинин (100 кДа) и бычий сывороточный альбумин (66 кДа). Все реагенты были фирмы Sigma-Aldrich. Количественная оценка белковых полос выполнена на сканере Umax Astra 3450 с использованием вычислительной программы Band Leader 3.00.

Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$). Корреляционный анализ выполнен с использованием пакета программ STATISTICA 10. Уровень достоверности различий между линиями крыс и между функциональными состояниями почек оценивали по *t*-критерию Стьюдента для независимых переменных с учетом поправки Бонферрони. Нормальность распределения проверяли критерием Shapiro–Wilk, проверку на равенство дисперсий не проводили, так как использованы равные по размеру выборки. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Осмолярность экскретируемой мочи является интегральным количественным параметром, адекватно характеризующим комплексную работу почек в процессе поддержания водного гомеостаза. Данные по осмолярности мочи, полученные во всех экспериментальных группах, представлены в табл. 1. У крыс линии WAG уже в исходном состоянии наблюдалось выделение умеренно концентрированной мочи. Уровень концентрирования снижался примерно вдвое при дальнейшем содержании на диете с повышенным поступлением раствора сахарозы в организм и, наоборот, повышался более чем в два раза в ответ на продолжительное отсутствие питьевой воды. Менее выраженные изменения осмолярности зафиксированы у крыс Brattleboro. Изотоническая в начале эксперимента моча при избыточном потреблении раствора сахарозы без твердой пищи имела тенденцию к дальнейшему разбавлению. У животных, не имевших доступа к питьевой воде, образовывалась и отделялась гипертоническая моча, но значительно меньшей осмолярности, чем у крыс WAG. Различия в диапазоне изменения осмолярности экскретируемой мочи ($n = 10$, $p < 0.001$), наблюдаемые в условиях действия противоположных нагрузок

Таблица 1. Осмолярность экскретируемой мочи у крыс линий WAG и Brattleboro при различных функциональных нагрузках на концентрирующую систему почки

Линия крыс	Функциональная нагрузка		
	исходный фон	гипергидратация	дегидратация
WAG	867 $\pm$ 76	508 $\pm$ 42	2137 $\pm$ 107#
Brattleboro	282 $\pm$ 39*	275 $\pm$ 24*	697 $\pm$ 28*#

Данные представлены в миллиосмоль/литр (мОсм/л). Достоверность различий: между линиями крыс – * – $p < 0.01$; между гипергидратированными и дегидратированными крысами – # – $p < 0.01$.

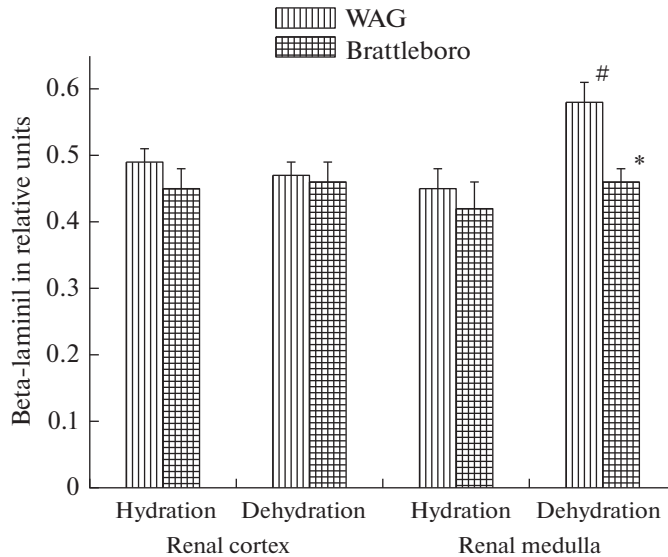


Рис. 1. Содержание бета-ламинина в условных единицах в пересчете на глобулярный актин в корковом и мозговом веществе. Достоверность различий: между крысами WAG и Brattleboro: * — $p < 0.01$; между гипергидратированными и дегидратированными крысами: # — $p < 0.01$.

на концентрирующую систему, свидетельствуют о неодинаковом функциональном состоянии почек в исследованных линиях крыс.

Кора и мозговое вещество почки различаются по структуре и клеточному составу канальцевых отделов, но общим свойством всех типов почечного эпителия является наличие базальной мембраны. Ламинин относится к главным водорастворимым белкам базальной мембраны. Белок присутствует в высокой концентрации, достаточной для прямой детекции в окрашенных полиакриламидных гелях [12]. В денатурирующих условиях гетеротример ламинин представлен тремя полосами в области 160, 127 и 100 килодальтон [6, 7, 13]. Анализ фракционированных пептидных мономеров ламинина не выявил существенных межлинейных различий по уровню альфа- и гамма-цепей в исследованных экспериментальных группах ($n = 10$, $p > 0.05$). По этим пептидам также не обнаружено различий между животными, находившимися на распаивании 4%-ным водным раствором сахарозы, либо на альтернативном кормлении сухим кормом ($n = 10$, $p > 0.05$). Более информативные данные были получены при рассмотрении бета-цепей ламинина. Количественная оценка содержания бета-ламинина, сделанная в относительных единицах, представлена на рис. 1.

У крыс WAG выявлена изменчивость содержания пептида в мозговом слое почки. Зафиксирован достоверно более высокий уровень бета-ламинина в условиях дегидратации по сравнению с гипергидратированными животными той же линии ($n = 10$, $p < 0.01$). У крыс Brattleboro аналогичная реакция на дегидратацию отсутствовала ($n = 10$, $p > 0.05$). Также не выявлено каких-либо достоверно значимых межлинейных различий бета-ламинина в корковом веществе почки в группах с повышенным потреблением воды.

В табл. 2 представлены коэффициенты корреляции между осмолярностью экскретируемой мочи и содержанием бета-ламинина в почечных слоях. Очевидно, что

Таблица 2. Коэффициенты корреляции осмолярности мочи и бета-ламинина в почке у крыс линий WAG и Brattleboro

Линия крыс	Паренхима почки	
	корковый слой	мозговой слой
WAG	-0.674 ± 0.261	0.983 ± 0.065
Brattleboro	0.373 ± 0.329	0.625 ± 0.277

высокая корреляция, свидетельствующая о достоверной взаимосвязи параметров, отмечена только у крыс линии WAG в мозговом веществе почки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе мочеобразования можно выделить несколько разнонаправленных фаз. Первичная изотоничная моча образуется в результате ультрафильтрации в почечных клубочках, локализованных в коре. При прохождении в корковых проксимальных канальцах происходит интенсивная обратная реабсорбция воды. Дальнейшее продвижение по нефрону сопровождается реабсорбцией ионов и приводит к разбавлению внутриканальцевой жидкости вплоть до гипоосмотического уровня в водонепроницаемых отделах петли Генле. Конечная моча представляет результат факультативной реабсорбции воды в собирательных трубках мозгового вещества и полностью зависит от гормональной регуляции вазопрессинном [14]. Почечный эпителий на всем протяжении почечных канальцев представляет одинарный слой, все клетки которого непосредственно контактируют с базальной мембраной. Вследствие тесного взаимодействия, изменения в структуре базальной мембраны могут иметь прямое отношение к характеру процессов, происходящих в эпителиальных клетках. Показано, что базальная мембрана обладает трофической функцией, избирательно пропуская питательные вещества к клеткам. Белки базальной мембраны участвуют в восстановлении почечной функции после различных нарушений, связанных с повреждением структуры эпителия. Взаимодействие коллагена, ламинина и интегринов инициирует внутриклеточные механизмы репарации [15]. Связывание ламинина изменяет конформацию цитоплазматического сегмента интегрин и активирует киназу фокальной адгезии FAK. Внутриклеточная трансдукция распространяется на rho GTP и MAPK-сигнальные пути [16]. Отдельные цепи ламинина по-разному участвуют в сигнальной трансдукции. Альфа- и гамма-пептиды ламинина 332 задействованы в регуляции адгезии и миграции клеток [13, 17]. Бета-пептид оказывает более выраженные тканеспецифичные эффекты. Повышенная концентрация локализуется в базальной мембране мышечной и почечной ткани. Трансгенная инактивация бета-ламинина приводит к нарушению функции почки [4]. Результаты нашего эксперимента подтверждают узкую направленность эффектов бета-ламинина, связанную с концентрирующей функцией почек. Одним из возможных механизмов действия бета-ламинина может быть изменение структуры белков цитоскелета эпителиальных клеток [18].

Выявленные межлинейные различия свидетельствуют о том, что повышенное содержание бета-пептида ламинина в почке реализуется только при наличии нормально экспрессирующегося гена вазопрессина. У мутантных крыс Brattleboro, неспособных синтезировать и секретировать гормон, стимулирующий эффект дегидратации не проявляется. Физиологическое действие вазопрессина заключается в быстрой гормональной регуляции концентрирующей функции и адекватной коррекции метаболизма воды. В условиях дегидратации концентрация вазопрессина,

циркулирующего в крови, стабильно возрастает в несколько раз [19–21]. Помимо антидиуретической реакции, реализуемой через V2-рецепторы собирательных трубок мозгового вещества, при продолжительном воздействии вазопрессина включаются дополнительные регуляторные механизмы, связанные с другими типами рецепторов. Вазопрессин активирует V1A-рецепторы в тромбоцитах, печени, гладкомышечной ткани [22, 23] и V2-рецепторы в эндотелии кровеносных сосудов [24]. Минорные эффекты вазопрессина направлены на стимуляцию синтеза и секреции ряда белковых факторов роста и адгезии, имеющих прямое отношение к пролиферации клеток. Известно, что введение препаратов вазопрессина купирует симптомы острой почечной недостаточности, развивающейся при септическом шоке [25]. Можно предположить, что именно пролонгированная повышенная секреция вазопрессина, вызванная дегидратацией, является причиной повышения уровня бета-ламиниона в мозговом веществе почки.

Таким образом, состояние дегидратации приводит к активации синтеза бета-ламиниона в почке. Данный эффект наблюдается только в случае нормальной экспрессии гена вазопрессина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные и национальные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры с участием животных соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН, протокол № 98/1 от 05.11.2021.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0021 “Генофонды населения Сибири, генетические маркеры заболеваний человека и молекулярные основы формирования патологических процессов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yurchenco PD, Cheng YS* (1993) Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J Biol Chem* 268(23): 17286–17299. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85334-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85334-6)
2. *MakKiM, Rena M* (2017) Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease. *The Anatom Record* 300(8): 1371–1390. <https://doi.org/10.1002/ar.23567>
3. *Yamada M, Sekiguchi K* (2015) Molecular Basis of Laminin-Integrin Interactions. *Curr Top Membr* 76: 197–229. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.07.002>
4. *Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JCR, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Manuel M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD* (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24(5): 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.05.006>
5. *Walter V, DeGraff DJ, Yamashita H* (2022) Characterization of laminin-332 gene expression in molecular subtypes of human bladder cancer. *Am J Clin Exp Urol* 10(5): 311–319. eCollection 2022.

6. Aumailley M (2013) The laminin family. *Cell Adh Migr* 7(1): 48–55.
<https://doi.org/10.4161/cam.22826>
7. Rousselle P, Beck K (2013) Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adh Migr* 7(1): 122–134.
<https://doi.org/10.4161/cam.23132>
8. Khegay II, Ivanova LN (2015) Regression of Walker 256 carcinosarcoma in vasopressin-deficient Brattleboro rats is accompanied by a changed laminin pattern. *Biochem Genet* 53(1–3): 1–7.
<https://doi.org/10.1007/s10528-015-9665-1>
9. Bekkevold CM, Robertson KL, Reinhard MK, Battles AH, Neil E Rowland NE (2013) Dehydration Parameters and Standards for Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52(3): 233–239.
10. Smit WM, Ruyter JH, van Wijk HF (1960) A new cryoscopic micro-method for the determination of molecular weights. *Analyt Chim Acta* 22: 8–16.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88232-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88232-X)
11. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
12. Sasaki T, Takagi J, Giudici C, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E, Deutzmann R, Timpl R, Sonnenberg A, Bächinger HP, Tonge D (2010) Laminin-121—recombinant expression and interactions with integrins. *Matrix Biol* 29(6): 484–493.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.05.004>
13. Koshikawa N, Mingegishi T, Sharabi A, Quaranta V, Seiki M (2005) Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. *J Biol Chem* 280(1): 88–93.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M411824200>
14. Смирнов АВ, Наточин ЮВ (2019) Нефрология: фундаментальная и клиническая. Нефрология 23 (4): 9–26. [Smirnov AV, Natochin YuV (2019) Nephrology: fundamental and clinical. Nephrology (Saint-Petersburg) 23 (4): 9–26. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1561-6274-2019-23-4-9-26>
15. Nony PA, Schnellmann RG (2003) Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 304(3): 905–912.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.035022>
16. Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R (2005) Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett* 223(1): 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.030>
17. Phan H-P, Sugino M, Niimi T (2009) The production of recombinant human laminin-332 in a Leishmania tarentolae expression system. *Protein Express Purificat* 68(1): 79–84.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.07.005>
18. Colognato H, Yurchenco PD (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218(2): 213–234.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200006\)218:2<213::AID-DVDY1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<213::AID-DVDY1>3.0.CO;2-R)
19. Wade CE, Keil LC, Ramsay DJ (1983) Role of Volume and Osmolality in the Control of Plasma Vasopressin in Dehydrated Dogs. *Neuroendocrinology* 37(5): 349–353.
<https://doi.org/10.1159/000123574>
20. Bouby N, Fernandes S (2003) Mild dehydration, vasopressin and the kidney: animal and human studies *Eur J Clin Nutr* 57(Suppl 2): S39–S46.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601900>
21. Bankir L, Bouby N, Ritz E (2013) Vasopressin: a novel target for the prevention and retardation of kidney disease? *Nat Rev Nephrol* 9(4): 223–239.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.22>
22. Phillips PA, Abrahams JM, Kelly JM, Mooser V, Trinder D, Johnston CI (1990) Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V1 and V2 selective ligands. *Endocrinology* 126(3): 1478–1484.
<https://doi.org/10.1210/endo-126-3-1478>
23. Holmes CL, Landry DW, Granton JT (2003) Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1—receptor physiology. *Crit Care* 7(6): 427–434.
<https://doi.org/10.1186/cc2337>
24. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Gunther G, Rosenthal W, Vischer UM (2000) Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest* 106(1): 107–116.
<https://doi.org/10.1172/JCI95116>
25. Gordon AC, Russell JA, Walley KR, Singer J, Ayers D, Storms MM, Holmes CL, Hébert PC, Cooper DJ, Mehta S, Granton JT, Cook DJ, Jeffrey J, Presneill JJ (2010) The effects of vasopressin on acute kidney injury in septic shock. *Intens Care Med* 36(1): 83–91.
<https://doi.org/10.1007/s00134-009-1687-x>

Reaction of Kidney Medullary Laminin to Prolonged Dehydration of Rats**I. I. Khegay****^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia***e-mail: khegay@bionet.nsc.ru*

Laminin is the main water-soluble protein in the basement membrane of epithelial tissue. The content of laminin in the renal parenchyma was studied in rats that were on an alternative water diet for 60 h with excessive water intake or a complete lack of drinking water in the food. It has been shown that the osmotic concentration of urine, which develops as a result of water deprivation, is accompanied by a quantitative change in the composition of laminin. It has been established that the amount of laminin beta chain increases in the kidney medulla of dehydrated rats. This effect is observed only in WAG rats with normally expressed vasopressin gene and is absent in mutant Brattleboro rats unable to synthesize the hormone. The increase in the level of beta-laminin also does not extend to the cortical substance. Based on the original and new data, it is assumed that laminin, as a key regulatory element in the basement membrane of the tubular epithelium, participates in the adaptive reaction of the concentrating system of the kidney to conditions of prolonged dehydration. Hyperhydration does not affect the level of laminin in the renal parenchyma.

Keywords: WAG, Brattleboro, dehydration, kidney, medulla, osmotic concentration, laminin, beta peptide, vasopressin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭЭГ-АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА
У ДЕТЕЙ 5–7 ЛЕТ**

© 2023 г. Ю. Н. Комкова¹, *, Г. А. Сугрובה², М. М. Безруких¹

¹Институт возрастной физиологии Российской академии образования, Москва, Россия

²Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

*E-mail: julie.komkova@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2022 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Исследование направлено на оценку индивидуальных и возрастных особенностей функционального состояния различных отделов головного мозга и закономерностей их онтогенетических изменений на основе структурного анализа паттернов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в состоянии спокойного бодрствования у детей 5–7 лет. Обследовано 266 детей, которые были разделены на три возрастные группы: 1–5 лет (средний возраст 4.98 ± 0.33), 2–6 лет (средний возраст 6.03 ± 0.35) и 3–7 лет (средний возраст 6.85 ± 0.22). Одним из показателей функционального созревания головного мозга являются характеристики альфа-ритма, регистрируемого преимущественно в затылочных областях. Выявлены существенные возрастные преобразования его параметров: представленность регулярного альфа-ритма с частотой 8–10 Гц нарастает от 5 к 7 годам. Встречаемость альфа-ритма сниженной частоты значительно уменьшается к 7 годам, а полиритмичного — к 6 годам. Эти изменения обусловлены происходящими на всем протяжении исследуемого возрастного периода усложнениями структурно-функциональной организации коры больших полушарий на клеточном уровне и совершенствованием ее взаимосвязей с подкорковыми структурами. Снижение случаев представленности высокоамплитудной электрической активности (ЭА) альфа-диапазона с признаками гиперсинхронии в каудальных отделах может свидетельствовать о созревании системы неспецифической активации ретикулярной формации ствола мозга от 5 к 7 годам. Возрастная динамика проявляется и в значимом снижении случаев представленности на ЭЭГ ЭА тета-диапазона, и в ее зональном распределении у детей от 5 к 7 годам. Такие изменения отражают процесс прогрессивного формирования функциональных связей между отдельными областями коры, а также корой и подкорковыми структурами, в частности таламо-кортикальными. Встречаемость ЭА альфа- (менее 5.0%) и бета-диапазона (около 13.0%), топографически представленные в передних отделах коры, значимо не различались с возрастом. В то же время генерализованная активность в виде волн разного частотного диапазона, характеризующая функциональное состояние преимущественно гипоталамических структур, встречается на ЭЭГ детей 7 лет достоверно чаще, чем в 5 лет. Возможно, такая динамика связана с повышенной реактивностью гипоталамо-гипофизарной системы в ответ на адаптационные стрессы, обусловленные переходом к систематическому обучению, и может рассматриваться как особенность данного возрастного периода. На фоне существенных перестроек функционирования мозга все его структуры становятся особенно чувствительными к высоким интеллектуальным и эмоциональным нагрузкам, характерным для современных детей дошкольного возраста. Новизна данного исследования состоит в выявлении закономерностей, структуры и характера изменений ЭА головного мозга у нормотипичных детей

5–7 лет, что позволяет оценить функциональное состояние коры и регуляторных систем мозга. Результаты получены на большой выборке детей, растущих в современных социокультурных условиях, и могут стать ориентиром для формирования возрастных нормативов.

Ключевые слова: ЭЭГ, дети, ритмы, электрическая активность, кора головного мозга, подкорковые структуры, функциональные связи

DOI: 10.31857/S0869813923070075, **EDN:** XJCVZQ

ВВЕДЕНИЕ

Современная социальная среда предъявляет повышенные требования к уровню развития познавательной сферы детей и подростков, возможности управлять собственным поведением, быстро принимать решения в условиях многозадачности. Эти способности закладываются на ранних этапах развития и определяют успешность освоения ребенком определенных компетенций в соответствии с возрастом. На этапе от 5 к 7 годам существенно меняется характер деятельности ребенка — увеличиваются интеллектуальные и эмоциональные нагрузки, поскольку к началу систематического обучения он должен овладеть большим количеством базовых учебных навыков. В связи с этим необходимо понимать закономерности созревания мозга на этом этапе онтогенеза и насколько функционирование различных структур головного мозга и уровень их зрелости соответствует этим нагрузкам.

Нейрофизиологические исследования свидетельствуют об активном морфо-функциональном созревании регуляторных структур головного мозга в этот период. Одним из определяющих факторов данного процесса является дифференциация функциональных связей между корой и подкорковыми структурами, темпы и интенсивность этого процесса сугубо индивидуальны, и от них зависят успешность освоения и реализации школьно-значимых функций [1, 2]. С помощью фМРТ-исследований показаны непрерывные преобразования специфических таламо-кортикальных взаимодействий в течение длительного периода — от первого детства к зрелому возрасту. Эти изменения преимущественно обусловлены процессами созревания нейронов и их связей, от которых зависит уровень сформированности таких когнитивных способностей, как скорость обработки информации, избирательное внимание и когнитивная гибкость [2].

Изучение специфики онтогенетических изменений функциональной организации отдельных структур и систем головного мозга, определяющих процесс формирования ВПФ в дошкольный и дошкольный период, своевременное выявление дефицитов в их становлении, а также учет индивидуальной траектории развития ребенка могут позволить спрогнозировать на ранних этапах риски дезадаптации к учебной деятельности и нивелировать их действие. Однако такие исследования немногочисленны, выборки, ограниченные по объему, охватывают широкие возрастные диапазоны, что затрудняет оценку электрической активности (ЭА) с целью выявления возрастных закономерностей созревания мозговых структур [1, 3–5]. Такая ситуация, скорее всего, вызвана различиями подходов, методов и методик анализа активности мозга, трудностями использования технологий визуализации мозга у детей, а также сложностью определения для них границ нормы и патологии. Исследования, приводимые в литературе, сосредоточены в основном на изучении топографического распределения ритмов с учетом возраста [4, 6–8]. Актуальной проблемой остается анализ возрастных изменений представленности ЭА разного диапазона и ее локализации на ЭЭГ в зависимости от предполагаемого источника.

Одним из показателей функционального созревания головного мозга, изучению которого уделяется особое внимание, являются характеристики альфа-ритма, регистрируемого в каудальных отделах с фокусом преобладания в затылочных областях [8–10]. Зачастую исследователи сосредоточены больше на анализе его частотного диапазона, такая точка зрения распространена и в отношении других вариаций ЭА [7, 11–13]. Накопленный опыт демонстрирует, что в онтогенезе происходит возрастание частоты альфа-ритма [8, 10]. В то же время исследования особенностей, связанных с его модуляцией по амплитуде и степени регулярности по частоте и форме, единичны, проводятся с участием детей с дефицитами в состоянии когнитивных процессов и не делают акцент на возрастной динамике [5, 14, 15]. Данные структурного анализа ЭЭГ у детей с хорошей успеваемостью показали снижение встречаемости в каудальных отделах альфа-ритма с амплитудой свыше 110 мкВ с признаками гиперсинхронии от 5 к 8 годам, что нехарактерно для детей с трудностями в обучении [5]. Согласно исследованиям ЭА мозга у детей 3–7 лет с дефицитами внимания, среди причин возникновения такой активности выделяют задержку миелинизации структур ретикулярной формации (РФ) ствола мозга [15]. Появление высокоамплитудного альфа-ритма может быть обусловлено синхронизированной дендритной поляризацией, а также в связи с пониженным уровнем регионарной метаболической активности [9].

Задачи других исследований в основном сосредоточены на изучении ЭА отдельных областей и их взаимосвязи с эффективностью когнитивных процессов [3, 4, 16, 17].

Несмотря на преимущества применения различных подходов в изучении ЭА мозга и многочисленные данные о суммарной ЭА мозга, остаются недостаточно исследованными возрастные закономерности и генез суммарной ЭА мозговых структур.

Качественный анализ ЭЭГ покоя, используемый в настоящем исследовании, позволяет оценить индивидуальные особенности функционирования структур мозга у детей 5–7 лет и выявить возрастные изменения в их состоянии [18]. В пользу успешного использования данного метода, основанного на выделении электроэнцефалографических паттернов по их функциональному значению, а не только по физическим параметрам (частота, амплитуда и т.д.), свидетельствуют результаты многочисленных исследований [5, 19–21].

В связи с этим, цель настоящего исследования состояла в выявлении возрастных закономерностей, структуры и характера изменений ЭА головного мозга у нормотипичных детей 5–7 лет ($n = 266$).

Среди задач наиболее значимыми являлись анализ встречаемости ЭА разного частотного диапазона с учетом топографического распределения и выделение возрастных закономерностей и особенностей ритмогенных структур коры головного мозга и их взаимосвязей с подкорковыми структурами в состоянии покоя у детей 5–7 лет.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании принимали участие дети 5–7 лет с письменного согласия родителей. Все дети, согласно данным медицинских карт, относились к I–II группам здоровья. Исследование проводили в первой половине дня (с 9 до 13 ч), в период наибольшей активности физиологических функций.

Регистрация ЭЭГ в ситуации спокойного бодрствования проведена у 266 детей.

В табл. 1 представлены данные о среднем возрасте и количестве детей для каждой возрастной группы, прошедших электроэнцефалографическое исследование.

Запись ЭЭГ осуществлялась в состоянии спокойного бодрствования с использованием компьютерного электроэнцефалографа “NEUROTRAVEL” (ATES MEDICA,

Таблица 1. Возрастной состав детей, принявших участие в ЭЭГ-исследовании

Возрастная группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Средний возраст	4.98 ± 0.33	6.03 ± 0.35	6.85 ± 0.22
Общее количество детей в группе	$n = 43$; 27 мальчиков	$n = 70$; 37 мальчиков	$n = 153$; 90 мальчиков

Россия) при частоте оцифровки 256 Гц с полосой пропускания усилителя 0.1–70 Гц при закрытых глазах и при функциональных нагрузках: гипервентиляции (1.5–2.5 мин) и ритмической фотостимуляции (РФС) от 14 симметричных отведений правого и левого полушарий: затылочных (O_1 , O_2), теменных (P_3 , P_4), центральных (C_3 , C_4), задневисочных (T_5 , T_6), височных (T_3 , T_4) и лобных (F_3 , F_4 , F_7 , F_8), расположенных по международной схеме 10–20, при монополярной регистрации в качестве референтных использовались ушные электроды.

В настоящей работе был использован метод экспертного анализа для визуального выделения паттернов ЭЭГ, осуществляемый на базе компьютерной системы “ЭЭГ-ЭКСПЕРТ” [18] и позволяющий провести автоматическую диагностику функционального состояния различных систем мозга [5, 18]. Программа “Диалог”, включенная в систему “ЭЭГ-ЭКСПЕРТ”, содержит описания различных электрофизиологических паттернов в соответствии с клинической электроэнцефалограммой, представленных в форме анкеты. В ходе экспертного анализа с помощью этой программы выбираются ЭЭГ-паттерны, необходимые для дальнейшего анализа.

Такой подход к анализу ЭЭГ имеет свои преимущества, так как дает возможность унифицированного описания ЭЭГ-паттернов, объединяемых в структурные единицы — блоки не по физическим параметрам (частота, амплитуда и т.д.), а по их функциональному значению, характеризующему функциональное состояние как коры в целом, так и ее отдельных областей, а также — состояние регуляторных структур [5, 18]. На основании индивидуального анализа ЭЭГ проводилась оценка функционального состояния головного мозга в каждой группе испытуемых.

Важным показателем функционального состояния коры больших полушарий являются характеристики альфа-ритма с фокусом в теменно-затылочных областях [4, 5, 14]. В настоящем исследовании первоочередное внимание было уделено изучению возрастных закономерностей формирования альфа-ритма в каудальных отделах. К числу анализируемых признаков, характеризующих альфа-ритм, были отнесены его частота, амплитуда и степень регулярности по частоте и форме (варианты представлены в табл. 2).

Также был проведен анализ других вариантов ЭА, в ходе которого ЭЭГ-паттерны разного частотного диапазона (тета-, альфа-, бета-диапазонов) оценивались в зависимости от их зонального распределения (типы представлены в табл. 3).

Критерием наличия/отсутствия определенного паттерна на ЭЭГ являлось его появление не менее 3 раз в течение 3-минутной записи.

Для дальнейшего анализа ЭЭГ-паттернов, характеризующих функциональное состояние ритмогенных структур коры головного мозга и их взаимосвязей с подкорковыми структурами, мы исходили из экспертных оценок, предложенных специалистами-разработчиками структурного анализа ЭЭГ [18], а также данными, указывающими на значение связей между глубинными структурами и корой при определении характера суммарной ЭА с учетом вероятного источника [22, 23]. Аргументом в пользу применения анализа скальповой ЭЭГ для оценки состояния связей коры и подкорковых структур являются и результаты других исследований [9, 24, 25].

Таблица 2. Варианты альфа-ритма в каудальных отделах

Вариант альфа-ритма	Описание
Регулярный модулированный (8–10 Гц)	Альфа-ритм постоянной частоты и формы с периодическим изменением амплитуды
Дезорганизованный (8–10 Гц)	Альфа-ритм с нарушением регулярности по форме и амплитуде
Высокоамплитудный с признаками гиперсинхронии	Амплитуда альфа-ритма превышает 100 мкВ
Полиритмия	Альфа-ритм, флуктуирующий по частоте в диапазоне не менее 2 Гц при отсутствии доминирующей частоты
Сниженной частоты (6–7 Гц)	Альфа-ритм с частотой 6–7 к/с
Сниженной амплитуды (ниже 40 мкВ)	Амплитуда альфа-ритма не превышает 40 мкВ
Высокочастотный	Альфа-ритм с частотой более 10 Гц
Фрагментарный	Альфа-ритм в виде эпизодически появляющихся групп колебаний длительностью до 1 с

Таблица 3. Типы и локализация ЭЭГ-паттернов

ЭЭГ-паттерны	Локализация /отведения
БС вспышки острых быстрых и медленных волн различной частоты	Генерализовано
БС активность тета-диапазона	Генерализовано
БС активность тета-диапазона	Лобные и/или лобные и центральные
БС активность альфа-диапазона	Лобные и лобно-височные
БС активность бета-диапазона	Лобные и/или лобные и центральные
БС активность в виде групп острых волн (разрядов) тета-диапазона	Затылочные, теменные, задневисочные
Асинхронная низковольтная активность	Каудальные
БС-активность тета-, альфа-диапазона	Теменные и центральные

По результатам обработки ЭЭГ для каждой экспериментальной группы строились распределения частоты встречаемости обозначенных в табл. 2 и 3 вариантов ЭЭГ-паттернов, характеризующих функциональное состояние мозга.

Статистическая оценка групповых различий частоты встречаемости ЭЭГ-паттернов, описанных выше, осуществлялась с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона. Выбор данного критерия был продиктован объемами сравниваемых выборок детей, неравным количеством детей в возрастных группах и характером распределений анализируемых переменных. Результаты статистической значимости множественных сравнений подвергались корректировке (p-values) методом контроля за False discovery rate (FDR) [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве ЭЭГ-показателей, отражающих функциональное состояние коры головного мозга, в настоящей работе использованы определенные характеристики α -ритма при регионарном распределении в каудальных отделах с преобладанием в затылочных областях. На основе критериев структурного анализа были выделены

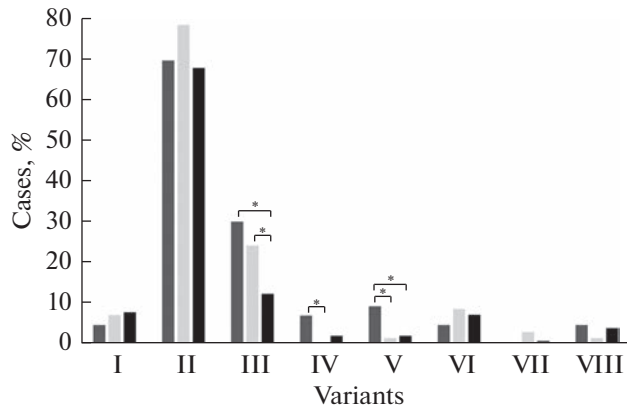


Рис. 1. Встречаемость разных вариантов альфа-ритма у детей 5–7 лет.

По оси абсцисс – варианты аналогичны описанию в табл. 4, по оси ординат – встречаемость (%).

Столбики – возрастные группы: темно-серые, светло-серые, черные – 1-я, 2-я, 3-я группы соответственно.

* – p -values значимое при FDR = 0.2 коррекции на множественные сравнения.

разные варианты альфа-ритма, широко представленные на ЭЭГ в исследуемых возрастных группах.

К числу характеристик альфа-ритма были отнесены его частота, амплитуда и степень регулярности по частоте и форме. Оценка состояния ритмогенных структур коры показала, что у большинства детей основной ритм с частотой 8–10 Гц носил дезорганизованный характер – флуктуировал по форме и амплитуде. Преобладание такого “рисунка” ритма наблюдается и на ЭЭГ детей младшего школьного возраста [5], что не позволяет рассматривать его как возрастной тренд формирования корковой ритмики.

Распределение вариантов альфа-ритма, наблюдаемых на ЭЭГ детей 5–7-летнего возраста, представлено на рис. 1, межгрупповые сравнения их встречаемости отражены в табл. 4.

Как видно из рис. 1, распределение вариантов альфа-ритма в анализируемых возрастных группах во многом типично, но при этом наблюдается ряд особенностей. Общим для всех трех возрастных групп является большая представленность в каудальных отделах высокоамплитудной (амплитуда может достигать 110 мкВ и выше) заостренной ЭА с признаками гиперсинхронии. Высокая частота встречаемости такой активности, отмеченной у детей дошкольного возраста, связывалась с низким уровнем функционирования системы неспецифической активации [5].

Возрастная специфика функционального состояния коры наиболее ярко проявлялась на ЭЭГ детей 1-й группы и характеризовалась наличием в каудальных отделах в ряде случаев полиритмии и альфа-ритма в виде эпизодически появляющихся групп колебаний длительностью до 1 с (фрагментарный).

Наряду с обозначенными вариантами альфа-ритма наблюдались медленные осцилляции (частотой 6–7 Гц), проявляющие свойства сходные с тета-ритмом и топографически соотносимые с затылочными областями. Такая ЭА у детей описывается и в ряде исследований (см. обзор [8, 11]).

В двух других возрастных группах детей (6 и 7 лет) на ЭЭГ чаще отмечался регулярный альфа-ритм. В ряде случаев был выявлен сниженный по амплитуде альфа-ритм, который нельзя однозначно трактовать как возрастную особенность и соотно-

Таблица 4. Результаты статистического сравнения частоты встречаемости разных вариантов альфа-ритма у детей 5–7 лет

Вариант альфа-ритма	Результаты сравнения								
	1-я и 2-я группа			1-я и 3-я группа			2-я и 3-я группа		
	χ^2	p	p^*	χ^2	p	p^*	χ^2	p	p^*
I. Регулярный модулированный (8–10 Гц)	0.285	0.594	0.771	0.516	0.473	0.754	0.033	0.855	0.913
II. Дезорганизованный (8–10 Гц)	1.108	0.293	0.611	0.500	0.823	0.913	2.636	0.104	0.333
III. Высокоамплитудный с признаками гиперсинхронии	0.483	0.487	0.754	7.798	0.005	0.067	4.996	0.025	0.133
IV. Полиритмия	5.017	0.025	0.133	2.846	0.092	0.315	1.391	0.238	0.601
V. Сниженной частоты (6–7 Гц)	3.905	0.048	0.188	5.253	0.022	0.133	0.077	0.781	0.913
VI. Сниженной амплитуды (ниже 40 мкВ)	0.622	0.430	0.732	0.349	0.555	0.772	0.130	0.718	0.884
VII. Высокочастотный	1.251	0.263	0.611	0.282	0.595	0.772	1.757	0.185	0.522
VIII. Фрагментарный	2.401	0.121	0.363	0.715	0.398	0.732	0.982	0.322	0.644

* – p -values значимое при FDR = 0.2 коррекции на множественные сравнения.

силь с нормой. Такой же вариант основного ритма встречается у детей с перинатальным поражением ЦНС в анамнезе. При этом авторами отмечается высокая вероятность его сохранения и на более поздних этапах онтогенеза, что может создавать почву для формирования трудностей в обучении и социальной адаптации [14].

Сниженную частоту [5, 8, 10] и полиритмию [5], отмеченные среди детей 3-й группы в единичных случаях (рис. 1), можно расценивать как один из вариантов альфа-ритма, характерный для дошкольного возраста. Такая структура альфа-ритма коры в младшем школьном возрасте, связанная с поведенческими и когнитивными дефицитами, с началом систематического обучения может стать фактором риска возникновения трудностей в формировании школьно-значимых функций ребенка [27]. Своевременное выявление особенностей формирования корковой ритмики на ранних стадиях онтогенеза у детей с типичным развитием даст возможность организовать эффективную работу по снижению таких рисков.

Другие варианты альфа-ритма в исследуемых группах составляли менее 10% при отсутствии различий между ними.

Таким образом, результаты исследования показали, что вектор развития корковой ритмики в возрастной период от 5 к 7 годам направлен в сторону модуляции альфа-ритма в каудальных отделах, его доминирования на частоте 8–10 Гц и снижении признаков его гиперсинхронизации, что свидетельствует о морфофункциональном созревании коры больших полушарий и ее связей с подкорковыми структурами.

Для оценки и анализа возрастных изменений ЭА подкорковых структур и их связей с корой в настоящем исследовании было проведено сопоставление частоты встречаемости различных вариантов ЭЭГ-паттернов, приведенных в табл. 3. Сравнительный анализ результатов их представленности у детей 5–7 лет дан в табл. 5.

Распределение разных видов ЭЭГ-паттернов в дошкольном и дошкольном возрасте характеризовалось преобладанием генерализованных изменений (II) (рис. 2). Такой вариант ЭА в виде групп билатерально-синхронных острых волн разной частоты значимо чаще встречался на ЭЭГ детей старшей возрастной группы.

Другой вариант генерализованных изменений в виде БС активности тета-диапазона встречался независимо от возраста в меньшем проценте случаев (от 15.7 до 18.6%).

Согласно полученным данным, число случаев ЭА тета-диапазона в каудальных отделах у детей 6 и 7 лет к началу систематического обучения значимо снижалось (рис. 2) по сравнению с данным показателем у детей 5-летнего возраста (табл. 5).

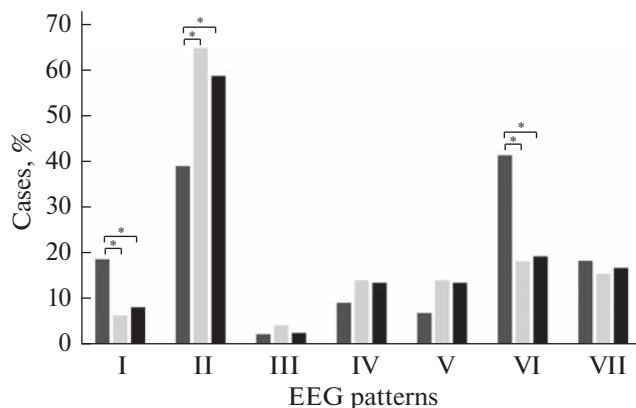


Рис. 2. Встречаемость разных типов ЭЭГ-паттернов у детей 5–7 лет.

По оси абсцисс – паттерны ЭЭГ (аналогично описанию в табл. 5), по оси ординат – встречаемость (%). Столбики – возрастные группы: темно-серые, светло-серые, черные – 1-я, 2-я, 3-я группы соответственно.

* – p -values значимое при FDR = 0.2 коррекции на множественные сравнения.

Зональное распределение медленноволнового компонента в лобных, теменных и центральных отведениях в виде групп волн тета-диапазона у детей дошкольного возраста имело значительную выраженность, что усложняло дифференциацию ее по указанным выше областям. Используя метод обратных фаз при биполярном

Таблица 5. Результаты статистического сравнения частоты встречаемости разных типов ЭЭГ-паттернов у детей 5–7 лет

ЭЭ-паттерны	Результаты сравнения								
	1-я и 2-я группа			1-я и 3-я группа			2-я и 3-я группа		
	χ^2	p	p^*	χ^2	p	p^*	χ^2	p	p^*
БС активность в виде групп острых волн (разрядов) тета-диапазона в затылочных, теменных, задневисочных отведениях (I)	4.663	0.031	0.155	4.242	0.039	0.170	0.327	0.568	0.771
Генерализованные БС вспышки острых быстрых и медленных волн различной частоты (II)	7.400	0.007	0.067	5.396	0.020	0.133	0.789	0.375	0.720
БС активность альфа-диапазона в лобных и лобно-височных отделах (III)	0.300	0.584	0.771	0.011	0.915	0.915	0.441	0.507	0.761
БС активность бета-диапазона в лобных и/или лобных и центральных отведениях (IV)	0.609	0.435	0.732	0.590	0.442	0.732	0.013	0.911	0.915
БС активность тета-диапазона в лобных и/или лобных и центральных отведениях (V)	1.389	0.237	0.628	2.621	0.270	0.628	0.031	0.911	0.915
Асинхронная низковольтная активность в каудальных отделах, БС-активность тета-, альфа-диапазона в каудальных отделах (VI)	7.257	0.007	0.067	8.988	0.003	0.067	0.033	0.856	0.913
Генерализованная БС активность тета-диапазона (VII)	0.159	0.690	0.872	0.061	0.805	0.913	0.057	0.812	0.913

* – p -values значимое при FDR = 0.2 коррекции на множественные сравнения.

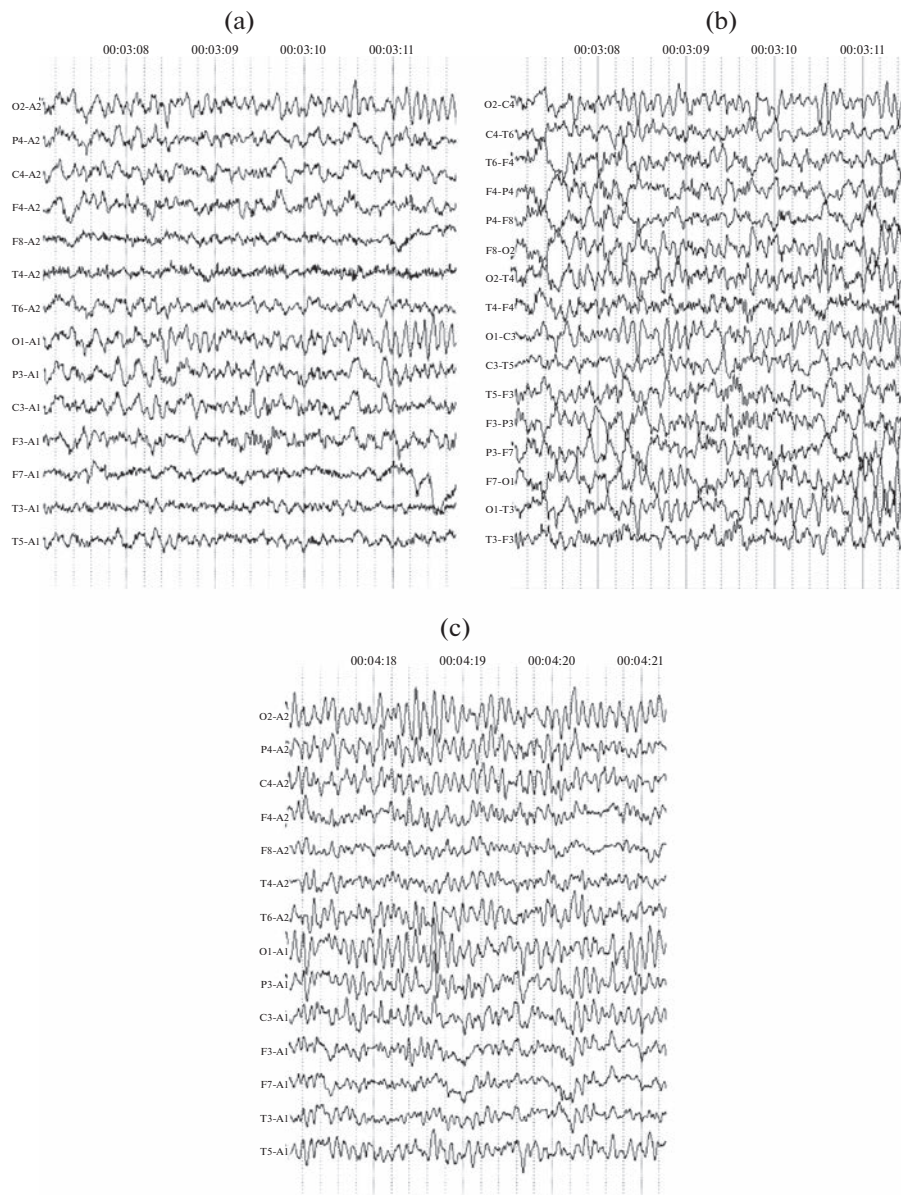


Рис. 3. Фрагмент ЭЭГ. Билатерально-синхронная активность в теменных и центральных отведениях: (а) — группы волн тета-диапазона (монополярный монтаж); (б) — группы волн тета-диапазона (биполярный монтаж); (с) — группы волн частотой 4–6 Гц (тета-диапазона) и 8–10 Гц (альфа-диапазона).

монтаже (phase reversal technique), мы определили ее регионарную принадлежность [28]. Оказалось, что у большей части детей анализируемых групп, преимущественно в 5 лет, доминировали выраженные изменения БС активности тета-диапазона с проекцией в теменные и/или центральные отведения (рис. 3), проявления которой снижались к 7 годам. Индивидуально в ряде случаев к медленному компо-

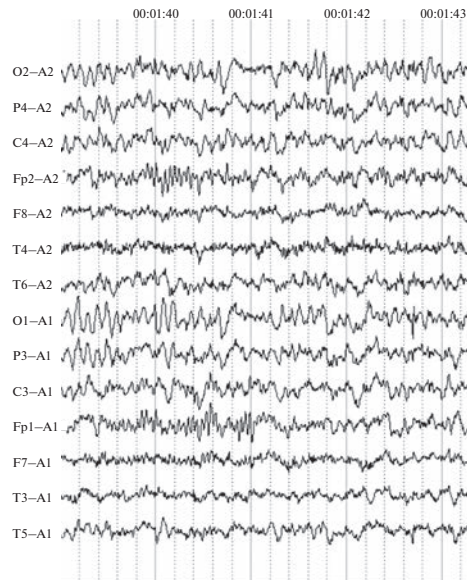


Рис. 4. Фрагмент ЭЭГ. Билатерально-синхронные группы бета-волн в лобных областях.

ненту в описанных выше областях добавлялся быстрый, по частоте соответствующий альфа-диапазону. Наличие таких колебаний в описанных выше диапазонах в теменных и в центральных отделах может сопровождаться низковольтной активностью в каудальных отделах.

В то же время, как видно из рис. 2 и табл. 5, частота встречаемости медленноволновой активности с проекцией в лобные и/или центральные отведения не различалась с возрастом.

Появлению на ЭЭГ в состоянии покоя бета-волновой активности в лобных, центральных и/или передневисочных отведениях у типично развивающихся детей дошкольного возраста ранее не уделялось должного внимания. Одной из возможных причин этого, на наш взгляд, являются трудности дифференцировки данного вида активности у маленьких детей из-за их двигательной активности и появления множества артефактов, которые ошибочно могут быть приняты за высокочастотную ЭА.

Наши данные показывают, что такая активность (фрагменты ЭЭГ — рис. 4) во всех возрастных группах встречается на ЭЭГ примерно в 13.0% случаев независимо от возраста (рис. 2 и 4).

Не были обнаружены возрастные различия представленности в аналогичных отведениях альфа-активности в виде всплесков, встречающейся в менее 5.0% случаев. Наличие таких ЭЭГ-паттернов, отмеченное нами у детей дошкольного возраста, в литературе связывают с влиянием корковых и подкорковых структур и их взаимодействия как составляющих звенья лимбической системы мозга [19, 29, 30].

Таким образом, на ЭЭГ детей 5–7 лет с возрастом значимо снижалась встречаемость медленноволнового компонента в затылочных, теменных и/или центральных отведениях, а генерализованная активность в виде острых волн различной частоты увеличивалась. Представленность ЭА в виде волн тета-диапазона в передних отделах не зависела от возраста. Значимые различия между анализируемыми возрастными группами по ЭА бета- и альфа-диапазона в передних отделах также не были выявлены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ ЭА позволил выявить индивидуальные и возрастные особенности функционального состояния головного мозга и закономерности его онтогенетических изменений в состоянии спокойного бодрствования у детей 5–7 лет.

Результаты исследования демонстрируют значительные перестройки в электрогенезе коры головного мозга и подкорковых структур у детей от 5 к 7 годам.

В морфофункциональном состоянии коры головного мозга детей этого возраста происходят существенные преобразования, которые проявляются, прежде всего, в изменении характеристик альфа-ритма, регистрируемого в теменно-затылочных отделах.

На протяжении исследуемого возрастного периода, несмотря на отсутствие значимых различий между группами, в каждой из них отмечался рост случаев регулярного модулированного ритма с частотой 8–10 Гц. При этом уменьшалась представленность полиритмии к 6 годам и ритма сниженной частоты и высокоамплитудного альфа-ритма с признаками гиперсинхронии к 7 годам, что свидетельствует о становлении зрелого ритмогенеза и согласуется с ранее проведенными исследованиями [5, 8, 14].

Наблюдаемое увеличение альфа-частоты до 8–10 Гц в затылочных отделах происходит последовательно с возрастом и соотносится с процессом созревания коры головного мозга, характерным для нормотипичных детей [10, 11]. Эта возрастная зависимость может быть отражением развития нейронных связей, лежащих в основе механизмов генерации ритма, параллельно с другими изменениями в мозге [10]. Результаты многочисленных исследований указывают на большое количество физиологических модуляций альфа-ритма, характеризующих его как сложный ритм с многочисленными источниками, обеспечиваемыми таламо-кортикальными и кортико-кортикальными взаимодействиями [31].

Хорошо известно, что в дошкольном возрасте в коре больших полушарий происходят структурные и функциональные изменения на клеточном уровне в виде замедления темпов роста коры в ширину [32, 33] и снижения плотности нейронов. На этом фоне отмечаются процессы дифференцировки и специализации пирамидных нейронов за счет усложнения ветвления их базальных дендритов, а также увеличения синаптических связей [33, 34]. Как показали исследования, в предшкольном возрасте усиливаются дистантные взаимодействия между каудальными и лобными отделами коры, а также связи между симметричными зонами правого и левого полушарий [35]. Эти изменения у дошкольников обеспечивают совершенствование интегративных корковых процессов, уровень которых определяет формирование когнитивных функций.

Отмеченная нами высокая представленность в каудальных отделах высокоамплитудного альфа-ритма с признаками гиперсинхронии с возрастом значимо снижается. Происхождение такой активности в литературе соотносится с неоптимальным состоянием системы неспецифической активации со стороны ретикулярной формации ствола мозга [5, 22]. Это предположение подтверждается результатами ЭЭГ и транскраниальной магнитной стимуляции у детей 3–7 лет с дефицитом внимания, согласно которым такая высокоамплитудная альфа-активность связывается с признаками задержки миелинизации в ретикулярной формации стволовых структур головного мозга [15]. Высокая амплитуда альфа-ритма, обусловленная синхронизированной дендритной поляризацией, может коррелировать с пониженным уровнем региональной метаболической активности [9]. Среди факторов, вызывающих такое состояние, выделяют неоптимальное кровообращение в позвоночных артериях [20]. Такой дефицит у детей предшкольного и младшего школьного возраста может являться причиной снижения работоспособности, быстро на-

ступающего утомления и поведенческой расторможенности, а также проявляться в ухудшении обработки невербальной (зрительной и соматосенсорной) информации [5].

Встречающиеся среди детей 7 лет единичные случаи полиритмии и альфа-ритма сниженной частоты можно рассматривать как неоптимальный вариант формирования ритмогенных структур коры головного мозга. Наличие полиритмии и альфа-ритма сниженной частоты на ЭЭГ к началу систематического обучения ряд авторов связывают с действием большого количества факторов риска в раннем развитии [14, 27], что может оказывать влияние на освоение и становление познавательной сферы (школьно-значимых функций).

Развитие коры и подкорковых регуляторных структур в онтогенезе — взаимообусловленные процессы [36].

Структурный анализ ЭЭГ-паттернов, позволяющий провести оценку возрастных изменений в функциональном состоянии отдельных мозговых структур и их связей как регуляторных систем, выявил на ЭЭГ преобладание ЭА в виде генерализованных групп острых волн разного диапазона (преимущественно альфа- и тета-диапазона) и/или острых монофазных и двухфазных пиков. Согласно клинко-энцефалографическим исследованиям, подобные ЭЭГ-паттерны могут свидетельствовать о дисфункции преимущественно гипоталамических структур мозга [37]. Стоит обратить внимание, что эта активность отмечалась ранее в большей степени у подростков, и ее появление на ЭЭГ связывалось с нейрогуморальными перестройками [38]. Несмотря на то, что такие ЭЭГ-паттерны не рассматривались как характерные для детей дошкольного возраста [5], результаты настоящего исследования свидетельствуют о широкой представленности такой ЭА на ЭЭГ детей 5–7 лет. Это может служить основанием для рассмотрения вопроса о расширении представлений о допустимых вариантах ЭА с учетом возраста, а также дальнейшего изучения влияния изменений ЭА гипоталамического происхождения на функциональное состояние организма в зависимости от степени их выраженности.

Хорошо известно, что гипоталамус — отдел промежуточного мозга, где сосредоточены высшие центры регуляции вегетативных функций. В связи с этим, неоптимальное функциональное состояние гипоталамических структур может проявляться в чрезмерном вегетативном и эмоциональном напряжении, что в свою очередь негативно сказывается на мозговой организации когнитивной деятельности и ее эффективности, ухудшая общее функциональное состояние организма и снижая работоспособность. Высокая встречаемость на ЭЭГ генерализованной активности, свидетельствующей о повышенной “включенности” гипоталамо-гипофизарной системы у детей 6–7 лет, возможно, вызвана функциональным напряжением и перегрузкой при подготовке к систематическому обучению. Это определяет необходимость учета таких особенностей функционального состояния мозга дошкольника при определении учебной и физической нагрузки.

Как показывают данные литературы, в состоянии покоя у детей и подростков в восходящем онтогенезе ЭЭГ изменяется в сторону повышения мощности быстрых волн и снижения — в пределах более низких частот (т.е. дельта- и тета-диапазона) [6, 12]. В нашем исследовании медленноволновая активность (тета-диапазона) доминировала в центральных и теменных областях, в меньшем проценте случаев наблюдались генерализованные волны и ЭА в центральных и/или лобных областях того же частотного диапазона (17 и 13% соответственно). При этом значимые различия между анализируемыми возрастными группами обнаружены в распределении тета-активности с регионарной представленностью в теменных и центральных областях, такая активность преобладала в 1-й группе.

Показано, что встречаемость на ЭЭГ низкочастотной активности с возрастом уменьшается, при этом после 9–10 лет скорость таких изменений постепенно снижается [10]. Имеются сведения о зависимости распространения ЭА у детей с при-

знаками СДВГ от их принадлежности к невнимательному или комбинированному типу: в первом случае наблюдалось диффузное распространение ЭА тета-диапазона, а во втором — увеличение мощности такой активности во всех областях мозга, кроме каудальных. При этом, независимо от наличия или отсутствия признаков дефицита внимания и гиперактивного поведения, с возрастом увеличивалась спектральная мощность в альфа- и бета-диапазоне [39], что также свидетельствует о снижении тета-активности с возрастом.

Наблюдаемые в настоящем исследовании на ЭЭГ детей ЭА тета-диапазона в виде всплесков в каудальных отделах значимо снижались от 5 к 7 годам.

Природа возникновения колебаний тета-диапазона и их соотношение с регионарной принадлежностью на ЭЭГ продолжает обсуждаться в литературе. Результаты экспериментального исследования электрической стимуляции различных неокортикальных областей, среднего мозга и структур ретикулярной формации, а также медиального пучка переднего мозга показали синхронизирующие влияния со стороны данных структур на появление тета-активности. При этом корковые воздействия чаще подавляли и десинхронизировали ее, а ретикулярная стимуляция тонически увеличивала частоту, регулярность и плотность всплесков тета-активности [40].

Актуальной проблемой остается анализ возрастных изменений представленности ЭА тета-диапазона и их локализация на ЭЭГ в зависимости от предполагаемого источника [41]. В электроэнцефалографическом исследовании от раннего детства к зрелости с помощью метода логистической регрессии проведен анализ зависимости распределения мощности колебаний тета-диапазона и их регионарной принадлежности от возраста. Показано, что с возрастом их наибольшая мощность смещается от теменно-срединных отведений у детей к передним (лобно-срединным) у участников исследования более старшего возраста [11].

В качестве глубинного источника такой активности в теменно-центральных областях предполагаются структуры мезодиэнцефального происхождения [5]. Степень ее выраженности может быть обусловлена особенностями функционального состояния головного мозга в условиях гипоксии на ранних этапах развития [42].

Описание различных подходов к анализу природы биоэлектрической активности тета-диапазона в лобных и центральных отведениях, как правило, сосредоточено на описании связи между передними отделами коры и структурами таламуса [5, 43]. Так, у пациентов с болезнью Паркинсона на ЭЭГ была выявлена максимальная таламокортикальная когерентность в тета-диапазоне во фронтальных областях. Авторы объясняют участие таламуса в синхронизации активности между данными областями коры с учетом анатомии таламокортикальной сети, которая характеризуется широко расходящимися таламокортикальными и кортикоталамическими связями [44].

Взаимосвязь уровня активности таламуса и появления тета-колебаний на ЭЭГ во фронтальных отделах коры подтверждают и результаты экспериментальных исследований нейронной активности у животных, согласно которым при искусственной гипоксии в передних отделах коры наблюдается появление тета-осцилляций и усиление ритмической спайковой активности нейронов медиодорзального ядра таламуса [43].

Наблюдаемая в исследованиях на детях медленноволновая активность в передних отведениях на ЭЭГ, по мнению авторов [5], может свидетельствовать о незрелости префронтальной коры и ее связей со структурами таламуса. В ходе комплексного анализа познавательных процессов у детей дошкольного и младшего школьного возраста было выявлено связь таких ЭЭГ-паттернов с дефицитами различных компонентов управляющих функций [5, 19, 21].

В нашем исследовании выявлена бóльшая представленность тета-активности в теменных и центральных отведениях и в меньшей степени во фронтальных отделах, что согласуется с результатами исследования, где авторы отмечали смещение фокуса максимальной мощности тета-активности к передним областям в школьном возрасте [11]. Опираясь на данные доступной нам литературы, мы предполагаем, что выявленное снижение случаев представленности на ЭЭГ медленноволновой активности у детей от 5 к 7 годам может свидетельствовать не только о созревании коры головного мозга, но и о совершенствовании функциональных связей между подкорковыми структурами и корой, в частности таламо-кортикальных.

Очень интересны, на наш взгляд, возрастные изменения распределения активности альфа- и бета-диапазона топографически представленной в передних отделах коры.

У детей 5–7 лет, независимо от возраста, были обнаружены ЭЭГ-паттерны в виде альфа-активности в лобных, центральных и/или передневисочных отведениях. Такая ЭА в ряде работ расценивается как признак неоптимального функционального состояния структур лимбической системы мозга [19, 29, 30]. Так, ЭЭГ исследование пациентов с опухолевым поражением лимбических структур показало увеличение интенсивности альфа-ритма в височной области пораженного полушария [30]. При обсуждении вопроса о латерализации лобного альфа-ритма в левом или правом полушарии как ЭЭГ-биомаркера эмоционального и мотивационного состояния рассматривается обусловленность таких влияний взаимодействиями внутри префронтальной коры и нисходящими афферентными потоками на эмоциональные структуры мозга. Ведущая роль отводится миндалине, имеющей двусторонние связи с префронтальной и передней височной корой [45].

Наличие такой активности связывают со снижением функциональных возможностей лимбической системы в обеспечении процессов эмоционально-мотивационной регуляции поведения и когнитивной деятельности [19]. Результаты метаанализа литературных данных о взаимосвязи в раннем возрасте индивидуальных особенностей саморегуляции и мощности ритма альфа-диапазона в лобных областях демонстрируют прямую зависимость силы связи от возраста, которая определяется степенью зрелости лобной коры [16].

Менее изученным остается вопрос о представленности ЭА бета-диапазона в передних отделах на ЭЭГ детей в состоянии спокойного бодрствования.

Появление такой активности в лобных, центральных и/или передневисочных отведениях мозга ЭА наблюдалось примерно у 13% детей всей анализируемой нами выборки независимо от возраста. Следует отметить, что такие ЭЭГ-паттерны отмечаются у детей и взрослых с отклонениями регуляторных компонентов поведения и эмоциональной сферы [17, 21, 46] в виде персевераций в двигательной и тактильной сфере, а также у детей с ограничениями социального контакта [47, 48]. Они связываются с неоптимальным состоянием нейронных сетей, объединяющих базальные ганглии, таламус и передние отделы коры, и рассматриваются как признак изменения ЭА лобно-базального происхождения [21, 49]. В эксперименте у детей с признаками синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) по сравнению с контрольной группой отмечалось увеличение активности коры в основном лобных областей в виде усиления мощности бета- и альфа-диапазона [50]. Преобладание бета-активности в лобных областях коры отличает их низким уровнем регуляции и контроля [17]. В доступной нам литературе обнаружено единственное исследование на нормотипичных детях, показавшее, что усиление бета-активности с возрастом может происходить быстрее в лобной области [51]. Кроме того, в литературе имеются сведения о роли бета-колебаний, возникающих в моторной коре, при мультимодальном восприятии речи [52, 53].

Происхождение такой активности преимущественно изучается на животных и пациентах с болезнью Паркинсона. Данные, полученные в сравнительном эксперименте на здоровых обезьянах и с двигательными расстройствами, свидетельствуют о взаимосвязи между ЭЭГ-сигналами высокочастотного диапазона от нейронов базальных ганглиев и лобной коры головного мозга. Авторы отмечают, что активность базальных ганглиев не просто отражает активность коры, а участвует в ее формировании. Подобные взаимосвязи были обнаружены и на людях с болезнью Паркинсона [54, 55]. В ряде исследований была выявлена зависимость между мощностью ЭА бета-диапазона и уровнем дофамина — бета-мощность увеличивалась с истощением дофамина [56, 57].

Поскольку статистической значимости между возрастными группами по появлению ЭА бета- и альфа-диапазона в передних отделах не наблюдается, а в анализируемой нами литературе наличие этих феноменов связывается со специфическими особенностями поведения и познавательного развития, есть основания принять их как индивидуальные варианты функционального состояния мозга. В то же время нельзя исключать и возрастной аспект изменения такой активности. Обращает на себя внимание (хотя различия и не значимы), постепенное увеличение от 5 к 7 годам представленности бета-осцилляций в передних отделах, что требует дальнейшего изучения на разных этапах возрастного развития.

Полученные нами данные о функциональном состоянии коры и подкорковых структур головного мозга, а также их связей у дошкольников 5–7 лет укладываются в рамки имеющихся онтогенетических представлений о возрастных закономерностях ритмогенеза мозга в состоянии покоя у детей и подростков в части снижения ЭА в пределах низких частот (т.е. дельта- и тета-диапазона) [6, 12], что параллельно может сопровождаться увеличением представленности более быстрых ритмов, особенно альфа- и бета-диапазонов [7, 13].

В то же время выявленные возрастные изменения биоэлектрической активности головного мозга позволили обозначить варианты неоптимального функционального состояния головного мозга, которые могут стать основой выделения маркеров дефицитов когнитивных функций и поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов настоящего исследования и данных литературы позволил выделить качественные прогрессивные изменения и возрастные закономерности в состоянии ритмогенных структур коры головного мозга и их взаимосвязей с подкорковыми структурами от 5 к 7 годам.

Наиболее существенные перестройки в характере основного ритма ЭЭГ в затылочных областях, связанные с морфофункциональным созреванием коры головного мозга, проявляются как значимое уменьшение числа случаев на ЭЭГ альфа-ритма сниженной частоты — к 7 годам, полиритмичного — к 6 годам; а также как рост числа случаев регулярного ритма с частотой 8–10 Гц от 5 к 7 годам. Эти возрастные закономерности могут быть отражением развития нейронных связей, лежащих в основе механизмов генерации ритма, параллельно с другими изменениями в мозге.

Благодаря совершенствованию системы неспецифической активации со стороны ретикулярной формации ствола мозга к 7 годам значительно снижается частота представленности высокоамплитудного альфа-ритма с признаками гиперсинхронии.

О дифференциации функциональных связей между отдельными областями коры, а также коры и подкорковых структур, в частности таламо-кортикальных, свидетельствует значительное снижение случаев представленности на ЭЭГ медленно-волновой активности тета-диапазона у детей от 5 к 7 годам: в 5 лет ЭА тета-диапа-

зона преобладает в каудальных отделах и теменно-центральных областях, а к 7 годам случаи ее встречаемости в аналогичных отделах значительно снижаются.

Обнаруженная на ЭЭГ детей ЭА альфа- (менее 5.0%) и бета-диапазона (около 13.0%), топографически представленная в передних отделах коры, значимо не различалась с возрастом. Постепенное увеличение от 5 к 7 годам представленности бета-активности в передних отделах и регулирующая роль этих зон мозга в обеспечении когнитивной деятельности и поведения требует ее дальнейшего изучения на разных этапах возрастного развития.

Особенностью исследуемого возрастного периода является нарастание на ЭЭГ представленности генерализованной активности, связанной с большим включением гипоталамических структур в формирование ЭА головного мозга. Возможно, усиление таких подкорковых влияний у детей обусловлено психоэмоциональным напряжением, вызванным интенсивной подготовкой к школе, превышающей их функциональные возможности.

Знание особенностей коркового электрогенеза и формирования связей между корой и подкорковыми структурами в дошкольном возрасте имеет важную прогностическую ценность для выявления маркеров когнитивных дефицитов, что позволит в дальнейшем минимизировать риски дезадаптации при систематическом обучении.

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, могут стать ориентиром для формирования возрастных нормативов показателей функционального состояния головного мозга у нормотипичных детей 5–7 лет, растущих в современных социокультурных условиях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены Комиссией по этике Ученого совета Института возрастной физиологии РАО (Москва, протокол № 1 от 05.10.2020 г.).

Информированное согласие. В исследовании принимали участие дети 5–7 лет с письменного согласия родителей. Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа выполнена за счет средств, выделяемых для выполнения государственного задания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.Н.К. — концепция исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, ответственность за целостность всех частей статьи.

Г.А.С. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, подготовка иллюстраций и таблиц, написание текста.

М.М.Б. — написание и редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Long X, Benischek A, Dewey D, Lebel C (2017) Age-related functional brain changes in young children. *NeuroImage* 155: 322–330.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.04.059>
2. Steiner L, Federspiel A, Slavova N, Wiest R, Grunt S, Steinlin M, Everts R (2020) Functional topography of the thalamo-cortical system during development and its relation to cognition. *Neuroimage* 223: 117361.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117361>
3. Whedon M, Perry NB, Bell MA (2020) Relations between frontal EEG maturation and inhibitory control in preschool in the prediction of children's early academic skills. *Brain and Cognition* 146: 105636.
<https://doi.org/10.1016/j.bandc.2020.105636>
4. Perone S, Palanisamy J, Carlson SM (2018) Age-related change in brain rhythms from early to middle childhood: Links to executive function. *Dev Sci* 21(6): e12691.
<https://doi.org/10.1111/desc.12691>
5. Machinskaya RI, Lukashevich IP, Fishman MN (1997) Dynamics of brain electrical activity in 5- to 8-year-old normal children and children with learning difficulties. *Human Physiol* 23(5): 517–522.
6. Paulino C, Flores A, Gomez C (2011) Developmental Changes in the EEG Rhythms of Children and Young Adults Analyzed by Means of Correlational, Brain Topography and Principal Component Analysis. *J Psychophysiol* 25: 143–158.
<https://doi.org/10.1027/0269-8803/a000052>
7. Miskovic V, Ma X, Chou CA, Fan M, Owens M, Sayama H, Gibb BE (2015) Developmental changes in spontaneous electrocortical activity and network organization from early to late childhood. *Neuroimage* 118: 237–247.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.06.013>
8. Cuevas K, Bell MA (2022) EEG frequency development across infancy and childhood. Gable PA, Miller MW, Bernat EM (eds). *The Oxford handbook of human EEG frequency*. Oxford.
<https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780192898340.013.13>
9. Feige B, Scheffler K, Esposito F, Di Salle F, Hennig J, Seifritz E (2005) Cortical and subcortical correlates of electroencephalographic alpha rhythm modulation. *J Neurophysiol* 93(5): 2864–2872.
<https://doi.org/10.1152/jn.00721.2004>
10. Eeg-Olofsson O (1970) The development of the electroencephalogram in normal children and adolescents from the age of 1 through 21 years. *Acta Paediatr Scand Suppl* 2 08:Suppl208: 1+.
11. Cellier D, Riddle J, Petersen I, Hwang K (2021) The development of theta and alpha neural oscillations from ages 3 to 24 years. *Dev Cogn Neurosci*. 50: 100969.
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2021.100969>
12. Clarke AR, Barry RJ, McCarthy R, Selikowitz M (2001) Age and sex effects in the EEG: development of the normal child. *Clin Neurophysiol* 112(5): 806–814.
[https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(01\)00488](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(01)00488)
13. Marshall PJ, Bar-Haim Y, Fox NA (2002) Development of the EEG from 5 months to 4 years of age. *Clin Neurophysiol* 113(8): 1199–1208.
[https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(02\)00163-3](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(02)00163-3)
14. Kozhushko NY, Ponomarev VA, Matveev YK, Evdokimov SA (2011) Developmental features of the formation of the brain's bioelectrical activity in children with remote consequences of a perinatal lesion of the CNS: II. EEG typology in health and mental disorders. *Human Physiol* 37(3): 271–277.
<https://doi.org/10.1134/S0362119711020095>
15. Ucles P, Lorente S, Rosa F (1996) Neurophysiological methods testing the psychoneural basis of attention deficit hyperactivity disorder. *Childs Nerv Syst* 12(4): 215–217.
<https://doi.org/10.1007/BF00301253>
16. Hofstee M, Huijding J, Cuevas K, Deković M (2022) Self-regulation and frontal EEG alpha activity during infancy and early childhood: A multilevel meta-analysis. *Dev Sci* 25(6): e13298.
<https://doi.org/10.1111/desc.13298>
17. Clarke AR, Barry RJ, Dupuy FE, McCarthy R, Selikowitz M, Johnstone SJ (2013) Excess beta activity in the EEG of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a disorder of arousal? *Int J Psychophysiol* 89(3): 314–319.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2013.04.009>

18. *Lukashevich IP, Machinskaya RI, Fishman MN* (1999) The EEG-expert automatic diagnostic system. *Biomed Eng* 33(6): 302–307.
<https://doi.org/10.1007/BF02385390>
19. *Semenova OA, Machinskaya RI* (2016) Assessing Regulatory Components of the Cognitive Performance in Children Aged 5–10 with EEG Patterns of the Limbic System Non-Optimal Functioning. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 66(4): 458–469.
<https://doi.org/10.7868/S0044467716040109>
20. *Лукашевич ИП, Мачинская РИ, Шкловский ВМ* (2004) Особенности вегетативной регуляции и характер судорог у детей с заиканием. *Физиол человека* 30(4): 50–53. [*Lukashevich IP, Machinskaya RI, Shklovskij VM* (2004) Features of autonomic regulation and the nature of seizures in children with stuttering. *Human Physiol* 30(4): 50–53. (In Russ)].
21. *Semenova OA, Machinskaya RI* (2015) The influence of the functional state of brain regulatory systems on the efficiency of voluntary regulation of cognitive activity in children: ii. neuropsychological and eeg analysis of brain regulatory functions in 10–12-year-old children with learning difficulties. *Human Physiol* 41(5): 478–486.
<https://doi.org/10.1134/S0362119715050126>
22. *Жирмунская ЕА* (1991) Клиническая электроэнцефалография. Обзор литературы и перспективы использования метода. М. “МЭЙБИ”. [*Zhirmunskaya EA* (1991) Clinical Electroencephalography. Literature Review and Prospects for Using the Method M. “MEJBI”. (In Russ)].
23. *Goldman-Rakic PS, Porrino LJ* (1985) The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. *J Comp Neurol* 242(4): 535–560.
<https://doi.org/10.1002/cne.902420406>
24. *Seeber M, Cantonas LM, Hoevels M, Sesia T, Visser-Vandewalle V, Michel CM* (2019) Subcortical electrophysiological activity is detectable with high-density EEG source imaging. *Nat Commun* 10(1): 753.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08725-w>
25. *Gatev P, Wichmann T* (2009) Interactions between cortical rhythms and spiking activity of single basal ganglia neurons in the normal and parkinsonian state. *Cereb Cortex* 19(6): 1330–1344.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn171>
26. *Benjamini Y, Hochberg Y* (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57 (1): 289–300.
<https://doi.org/10.2307/2346101>
27. *Bezrukih MM, Loginova ES, Partalis EM* (2015) Children with impaired cognitive development: complex assessment and Intervention. *Human Physiol* 41(4): 356–366.
<https://doi.org/10.1134/S0362119715040040>
28. *Hughes JR* (1994) EEG in Clinical Practice. Second edition. Boston. Butterworth-Heinemann.
29. *Connemann BJ, Mann K, Lange-Asschenfeldt C, Ruchow M, Schreckenberger M, Bartenstein P, Gründer G* (2005) Anterior limbic alpha-like activity: a low-resolution electromagnetic tomography study with lorazepam challenge. *Clin Neurophysiol* 116(4): 886–894.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2004.11.015>
30. *Boldyreva GN* (2018) Atypical forms of cerebral α -activity in the case of lesions in regulatory structures of the human brain. *Human Physiol* 44(3): 246–256.
<https://doi.org/10.1134/S0362119718020032>
31. *Lozano-Soldevilla D* (2018) On the physiological modulation and potential mechanisms underlying parieto-occipital alpha oscillations. *Front Comput Neurosci* 12: 23.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2018.00023>
32. *Remer J, Croteau-Chonka E, Dean DC, D’Arpino S, Dirks H, Whiley D, Deoni SCL* (2017) Quantifying cortical development in typically developing toddlers and young children, 1–6 years of age. *Neuroimage* 153: 246–261.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.04.010>
33. *Цехмистренко ТА, Василева ВА, Шумейко НС, Черных НА* (2009) Структурные преобразования коры больших большого мозга и мозжечка человека в постнатальном онтогенезе. В кн: Развитие мозга и формирование познавательной деятельности ребенка. Фарбер ДА, Безруких ММ (ред). М. Изд-во Московск психолого-социальн института. Воронеж “Модэк”. 9–63 [*Cekhmistrenko TA, Vasileva VA, Humejko NS, HERNYH NA* (2009) Structural changes of the human cerebral cortex and cerebellum in postnatal ontogenesis. In: Brain development and formation of cognitive activity. Farber DA, Bezrukih MM (red). M. Publ House of the Moscow Psychol and Social Institute. Voronezh “Modek”. 9–63. (In Russ)].
34. *Tsekhmistrenko TA, Chernykh NA* (2013) Developmental Characteristics of The Microstructure of Layer V of the Frontal Cortex in Humans. *Neurosci Behav Physiol* 43: 582–586.
<https://doi.org/10.1007/s11055-013-9775-3>

35. Алферова ВВ (1990) Отражение возрастных особенностей функциональной организации мозга в электроэнцефалограмме покоя. В кн: Структурно-функциональная организация развивающегося мозга. Фарбер ДА, Семенова ЛК, Алферова ВВ (ред). Л. Наука. 45–65. [Alferova VV (1990) Reflection of age-related features of the functional organization of the brain in the resting electroencephalogram. In: Structural and functional organization of the developing brain. Farber DA, Semenova LK, Alferova VV (red). L. Nauka. 45–65. (In Russ)].
36. Бетелева ТГ, Дубровинская НВ, Фарбер ДА (1977) Сенсорные механизмы развивающегося мозга. М. Наука. [Beteleva TG, Dubrovinskaya NV, Farber DA (1977) Sensory Mechanisms of the Developing Brain. M. Nauka (In Russ)].
37. Латаш П (1968) Гипоталамус, приспособительная активность и электроэнцефалограмма. М. Наука [Latash P (1968) Hypothalamus, Adaptive Activity and Electroencephalogram. M. Nauka. (In Russ)].
38. Фарбер ДА, Алферова ВВ (1972) Энцефалограмма детей и подростков. М. Педагогика [Farber DA, Alferova VV (1972) Electroencephalogram in Children and Adolescents. M. Pedagogika. (In Russ)].
39. Ahmadi M, Kazemi K, Kuc K, Cybulska-Klosowicz A, Zakrzewska M, Racicka-Pawlukiewicz E, Helfroush MS, Aarabi A (2020) Cortical source analysis of resting state EEG data in children with attention deficit hyperactivity disorder. Clin Neurophysiol 131(9): 2115–2130. <https://doi.org/doi:10.1016/j.clinph.2020.05.028>
40. Бразжник ЕС, Виноградова ОС, Каранов АМ (1984) Регуляция тета-активности септальных нейронов корковыми и стволовыми структурами. Журн высш нерв деятелн им ИП Павлова 34(1): 71–80. [Brazhnik ES, Vinogradova OS, Karanov AM (1984) Regulation of the theta activity of septal neurons by cortical and brain stem structures. Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova 34(1): 71–80. (In Russ)].
41. Orekhova EV, Stroganova TA, Posikera IN, Elam M (2006) EEG theta rhythm in infants and pre-school children. Clin Neurophysiol 117(5): 1047–1062. <https://doi.org/doi:10.1016/j.clinph.2005.12.027>
42. Переслени ЛИ, Рожкова ЛА (1996) Нейрофизиологические механизмы нарушений прогностической деятельности у детей с трудностями обучения. Дефектология 5: 15–22. [Peresleni LI, Rozhkova LA (1996) Neurophysiological Mechanisms of Prognostic Disturbances in Children with Learning Difficulties. Defektologiya 5: 15–22. (In Russ)].
43. Kim J, Woo J, Park YG, Chae S, Jo S, Choi JW, Jun HY, Yeom YI, Park SH, Kim KH, Shin HS, Kim D (2011) Thalamic T-type Ca(2)+ channels mediate frontal lobe dysfunctions caused by a hypoxia-like damage in the prefrontal cortex. J Neurosci 31(11): 4063–4073. <https://doi.org/doi:10.1523/JNEUROSCI.4493-10.2011>
44. Sarnthein J, Jeanmonod D (2007) High thalamocortical theta coherence in patients with Parkinson's disease. J Neurosci 27(1): 124–131. <https://doi.org/doi:10.1523/JNEUROSCI.4493-10.2011>
45. Мельников МЕ (2021) Один феномен с множеством интерпретаций: асимметрия лобного альфа-ритма ЭЭГ у здоровых людей. Часть I. Успехи физиол наук 52(3): 56–80. [Melnikov ME (2021) A single phenomenon with a multitude of interpretations: eeg frontal alpha asymmetry in healthy people. Part I. Uspekhi fiziol nauk 52(3): 56–80. (In Russ)]. <https://doi.org/doi:10.31857/S0301179821030036>
46. Threadgill AH, Gable PA (2018) Resting beta activation and trait motivation: Neurophysiological markers of motivated motor-action preparation. Int J Psychophysiol 127: 46–51. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ijpsycho.2018.03.002>
47. Kropotov JD (2016) Functional Neuromarkers for Psychiatry. Acad Press. <https://doi.org/doi:10.1016/C2012-0-07144-X>
48. Chiang CT, Ouyang CS, Yang RC, Wu RC, Lin LC (2020) Increased Temporal Lobe Beta Activity in Boys With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder by LORETA Analysis. Front Behav Neurosci 14: 85. <https://doi.org/doi:10.3389/fnbeh.2020.00085>
49. Rozhkova LA (2008) EEG spectral power of young schoolchildren with perinatal pathology of the CNS. Human Physiol 34(1): 22–32. <https://doi.org/doi:10.1007/s10747-008-1003-0>
50. Loo SK, Hale TS, Macdon J, Hanada G, McGough JJ, McCracken JT, Smalley SL (2009) Cortical activity patterns in ADHD during arousal, activation and sustained attention. Neuropsychologia 47(10): 2114–2119. <https://doi.org/doi:10.1016/j.neuropsychologia>

51. Ogawa T, Sonoda H, Ishiwa S, Goto K, Kojou M, Sawaguchi H, Wakayama K, Suzuki M (1989) Developmental characteristics of the beta waves of EEG in normal healthy children. *No To Hattatsu* 21(5): 424–429.
52. Biau E, Kotz SA (2018) Lower Beta: A Central Coordinator of Temporal Prediction in Multimodal Speech. *Front Hum Neurosci* 12: 434.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00434>
53. Weiss S, Mueller HM (2012) “Too Many betas do not Spoil the Broth”: The Role of Beta Brain Oscillations in Language Processing. *Front Psychol* 3: 201.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00201>
54. Williams D, Tijssen M, Van Bruggen G, Bosch A, Insola A, Di Lazzaro V, Mazzone P, Oliviero A, Quartarone A, Speelman H, Brown P (2002) Dopamine-dependent changes in the functional connectivity between basal ganglia and cerebral cortex in humans. *Brain* 125(Pt 7): 1558–1569.
<https://doi.org/10.1093/brain/awf156>
55. Lofredi R, Okudzhava L, Irmen F, Brücke C, Huebl J, Krauss JK, Schneider GH, Faust K, Neumann WJ, Kühn AA (2023) Subthalamic beta bursts correlate with dopamine-dependent motor symptoms in 106 Parkinson's patients. *NPJ Parkinsons Dis* 9(1): 2.
<https://doi.org/10.1038/s41531-022-00443-3>
56. Iskhakova L, Rappel P, Deffains M, Fonar G, Marmor O, Paz R, Israel Z, Eitan R, Bergman H (2021) Modulation of dopamine tone induces frequency shifts in cortico-basal ganglia beta oscillations. *Nat Commun* 12(1): 7026.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27375-5>
57. Sharott A, Magill PJ, Harnack D, Kupsch A, Meissner W, Brown P (2005) Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *Eur J Neurosci* 21(5): 1413–1422.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03973.x>

EEG Analysis of the Functional State of the Brain in 5- to 7-Year-Old Children

Yu. N. Komkova^{a, *}, G. A Sugrobova^b, and M. M. Bezrukikh^a

^a*Institute of Developmental Physiology RAE, Moscow, Russia*

^b*Penza State University, Penza, Russia*

*e-mail: julie.komkova@gmail.com

The study is aimed at assessing individual and age-related features of the functional state of various parts of the brain and the patterns of their ontogenetic changes based on the structural analysis of resting-state electroencephalogram (EEG) patterns in 5- to 7-year-old children. The study involved 266 children, who were divided into different age groups: Group 1–5 years old (mean age 4.98 ± 0.33), Group 2–6 years old (mean age 6.03 ± 0.35), and Group 3–7 years old (mean age 6.85 ± 0.22). Alpha-rhythm parameters recorded mainly in the occipital areas may serve as an indicator for the functional maturation of the brain. Significant age-related changes in the alpha-rhythm parameters have been revealed. The presence of a regular alpha-rhythm with a frequency of 8 to 10 Hz increases from 5 to 7 years of age. The occurrence of the alpha-rhythm of reduced frequency significantly decreases by the age of 7 years, and the occurrence of the poly-rhythmic alpha-rhythm – by the age of 6 years. These changes are caused both by complications of the structural and functional organization of the cerebral cortex at the cellular level, which occur throughout the studied age period, and the improvement of its relationships with subcortical structures. A decrease in the occurrence of high-amplitude alpha-range electrical activity (EA) with signs of hypersynchrony in the caudal regions may indicate the maturation of the system of nonspecific activation of the brainstem reticular formation from 5 to 7 years of age. Age dynamics is also manifested in a significant decrease in the EEG occurrence of theta-range EA, and its zonal distribution in 5- to 7-year-old children aged. Such changes specify the process of progressive formation of functional connections between individual areas of the cortex, as well as the cortex and subcortical structures, in particular thalamo-cortical ones. The occurrence of alpha-range EA (less than 5.0%) and beta-range EA (about 13.0%) arranged topographically in the anterior cortex did not differ significantly with age. However, generalized EEG activity in the form of different frequency range waves, which characterizes the functional

state of predominantly hypothalamic structures, occurs reliably more often in 7-year-old children rather than in 5-year-old children. Such dynamics is presumably associated with an increased reactivity of the hypothalamic-pituitary system in response to adaptive stresses caused by the transition to systematic learning and can be considered as a distinctive feature of this age period. Due to great restructuring of the brain functioning, all its structures become especially sensitive to high intellectual and emotional stress, which is characteristic of preschool children nowadays. The novelty of this study is highlighted by the identification of patterns, structure and nature of EA changes in 5- to 7-year-old normotypical children's brain to assess the functional state of the cortex and regulatory brain systems. The research results based on a large sample of children, growing up in modern social and cultural conditions, would provide guidance for the formation of age standards.

Keywords: electroencephalogram, children, rhythms, electrical/bioelectrical activity, cerebral cortex, subcortical structures, functional connections

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФИБРИНОВОЕ ПОКРЫТИЕ СПОСОБСТВУЕТ СОХРАНЕНИЮ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО СЛОЯ В УСЛОВИЯХ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ПОТОКА**

© 2023 г. В. Г. Матвеева¹, *, Е. А. Великанова¹, Л. В. Антонова¹, Л. С. Барбараш¹

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

*E-mail: matveeva_vg@mail.ru

Поступила в редакцию 13.04.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 18.06.2023 г.

Разработки протезов сосудов малого диаметра показали, что модифицирующее покрытие, сохраняющее эндотелиальный слой в условиях пульсирующего потока, препятствует тромбообразованию и определяет исход имплантации. Для улучшения адгезии эндотелиальных клеток в качестве покрытия используют различные белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, фибрин), которые требуют сравнения. Цель работы заключалась в поиске наиболее эффективного покрытия белками внеклеточного матрикса, поддерживающего биологическую функциональность и сохраняющего эндотелиальный слой в условиях пульсирующего потока. Методы исследования: матрицы и графты изготавливали из поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и поли(ε-капролактонона) методом электроспиннинга, модифицировали коллагеном 1-го типа, фибронектином и фибрином. Образцы заселяли культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК). Выполнено два блока исследований: в статике и в динамике. В статических условиях, после 3 дней инкубации КФЭК на поверхности образцов, изучали их биологические характеристики: жизнеспособность, метаболическую и пролиферативную активность клеток, адгезионные свойства по площади, занимаемой белком фокальной адгезии паксиллином. Удержание клеток оценивали сравнением плотности клеток на внутренней поверхности сосудистых графтов диаметром 4 мм в условиях пульсирующего потока и в статике через 7 суток инкубации. Было найдено, что в статических условиях метаболическая активность, жизнеспособность, количество и пролиферативная активность КФЭК, а также площадь, занимаемая белком фокальной адгезии паксиллином, на матрицах, покрытых фибрином, были выше, чем на коллагене и фибронектине. Плотность КФЭК (кл/мм²) на внутренней поверхности графтов с фибриновым покрытием не различалась в статических и динамических условиях. На образцах с коллагеном и фибронектином в условиях пульсирующего потока плотность клеток была в 2 раза меньше, чем при статической инкубации. Заключение. Фибрин продемонстрировал высокую биологическую активность, адгезионные свойства и сохранение эндотелиального слоя в статике и в условиях пульсирующего потока по сравнению с коллагеном и фибронектином. Покрытие фибрином является вариантом выбора при модифицировании внутренней поверхности сосудистых протезов.

Ключевые слова: фибрин, покрытие, сосудистые протезы, пульсирующий поток, удержание клеток

DOI: 10.31857/S0869813923070087, EDN: XIVIOIO

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на рынке отсутствуют эффективные протезы для замещения сосудов малого диаметра (<6 мм). Ученые всего мира ведут активный поиск улучшенных материалов и покрытий для создания протезов сосудов малого диаметра, удовлетворяющих требованиям кардиохирургов. Основными причинами несостоятельности имплантированных сосудистых протезов малого диаметра является их окклюзия как в раннем, так и отсроченном периоде вследствие тромбообразования или гиперплазии неоинтимы [1]. Наиболее перспективные варианты получения функционального и тромборезистентного протеза связаны с формированием эндотелиального слоя на внутренней поверхности перед имплантацией [2, 3]. Эндотелиальные клетки (ЭК) в условиях естественного кровотока подвергаются комплексному механическому воздействию. Исследователи отмечают, что ЭК, заселенные на синтетический каркас в статических условиях, после имплантации в кровоток более чем на 50–70% смываются током крови в течение первого часа, и этот процесс усиливается при повышении напряжения сдвига [4, 5]. В результате на оголенные участки протеза немедленно осаждаются белки плазмы, активируются тромбоциты, факторы свертывания, запускается каскад тромбообразования. Поэтому способность материала или модифицирующего покрытия удерживать ЭК в кровотоке и сохранять их функциональность, является важнейшим условием, определяющим успех будущей имплантации.

Для повышения биомиметических свойств сосудистых протезов используют покрытия на основе адгезионных белков внеклеточного матрикса (БВМ), среди них наиболее популярны коллаген [6], фибронектин [7, 8] и фибрин [9, 10]. В адгезии эндотелиоцитов к БВМ участвуют различные рецепторы, которые отличаются сродством и силой сцепления с поверхностью, что отражается на жизнедеятельности и эффективности удержания клеток в кровотоке. Сравнительная оценка биологических и адгезионных свойств различных БВМ для ЭК поможет выбрать наиболее перспективный вариант для модифицирования поверхности каркасных материалов, подверженных пульсирующему току крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено два блока экспериментов. Первый блок выполняли в статических условиях на плоской поверхности с целью предварительной оценки жизнедеятельности ЭК и адгезионных свойств различных покрытий (коллаген, фибронектин и фибрин). Второй блок — в динамических условиях на заселенной клетками внутренней поверхности модифицированных сосудистых протезов, встроенных в пульсирующий поток. Сравнивали с аналогичными заселенными протезами при статическом культивировании.

Изготовление каркасных матриц и протезов сосудов методом электроспиннинга

Для формирования полимерного матрикса использовали штифт Ø8 мм, для каркаса сосудистого протеза Ø4 мм. Композицию полимеров 5% поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (ПГБВ, Sigma-Aldrich, США) и 10% поли(ε-капролактона) (ПКЛ, Sigma-Aldrich, США) растворяли в хлороформе (Вектон, Россия). Электроспиннинг выполняли на аппарате Nanon-01A (МЕСС, Япония) при следующих параметрах: напряжение на конце иглы — 23 кВ, скорость подачи рас-

Список сокращений: КФЭК — колониеформирующие эндотелиальные клетки; ЭК — эндотелиальные клетки; БВМ — белки внеклеточного матрикса; ПГБВ — поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата); ПКЛ — поли(ε-капролактона); ФСБ — фосфатно-солевой буфер; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

твора — 0.5 мл/ч, скорость вращения намоточного коллектора — 200 об./мин, расстояние до намоточного коллектора — 15 см. Готовые образцы снимали со штифтов и подготавливали к экспериментам.

В первом блоке экспериментов использовали плоские полимерные матрицы. Для этого трубку диаметром 8 мм разрезали вдоль, раскрывали, вырезали по размеру дна лунки 24-луночного планшета и помещали в лунки внутренней поверхностью вверх.

Второй блок исследований выполняли на трубчатых полимерных каркасах, которые были сформированы на штифте 4 мм, после извлечения штифта и обрезки краев образцы имели внутренний диаметр 4 мм и длину 70 мм.

Получение фибриновой матрицы

Фибриноген выделяли методом этаноловой криопреципитации. Для этого в пробирки с цитратной плазмой донора медленно при постоянном перемешивании добавляли раствор 16%-ного этанола на Нерес-буфере (pH 7.4) (Gibco, США) и помещали в шейкер на 1 ч при температуре 0–4°C. Пробирки центрифугировали 25 мин при 1000 g в условиях охлаждения до 4°C. Супернатант удаляли и преципитат растворяли в Нерес-буфере. Концентрацию фибриногена в преципитате доводили Нерес-буфером до 60 мг/мл. Полимеризацию фибриногена проводили с помощью 0.2%-ного CaCl_2 , смешивая преципитат и раствор CaCl_2 в соотношении 1 : 1.

Модифицирование образцов

Образцы матриц ПГБВ/ПКЛ покрывали коллагеном, фибронектином и фибрином.

Для коллагенизации использовали бычий коллаген I типа 50 мкг/мл (Gibco, США) в растворе 0.02 М уксусной кислоты, который вносили по 2 мл на лунку с образцом, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации содержимое лунки удаляли и промывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (Gibco, США).

Образцы покрывали фибронектином плазмы человека 50 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в ФСБ, который вносили по 1 мл в лунки с образцами, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, далее удаляли содержимое лунок. Покрытие образцов фибрином выполняли по описанному ранее протоколу, для этого в каждую лунку с образцом вносили по 0.5 мл смеси преципитата и CaCl_2 и оставляли для полимеризации на 1 ч. В качестве группы сравнения использовали немодифицированные образцы ПГБВ/ПКЛ. Положительным контролем служили лунки 6-луночного планшета без матриксов, которые заселяли и культивировали аналогично экспериментальным образцам.

Культура эндотелиальных клеток

Для выполнения исследования была выбрана культура колониеформирующих эндотелиальных клеток человека (КФЭК) 5-го пассажа, выделенная и протестированная в собственной лаборатории Научно-исследовательского института Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний [11]. Клетки заселяли на матрицы и культивировали в полной питательной среде EGM-2 (Lonza, Швейцария), содержащей комплекс ростовых факторов, биологически активных веществ и 5%-ную фетальную бычью сыворотку (ФБС) (Thermo Fisher Scientific, США) в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C и 5% CO_2 .

Исследования в статике

На дно лунки 12-луночного планшета с помощью агарозы фиксировали образцы матриц, заселяли КФЭК по 4×10^4 клеток на лунку и культивировали 72 ч в полной питательной среде EGM-2 с добавлением 5% ФБС. В качестве контроля использовали заселенные лунки 12-луночного планшета без матриц, которые культивировали в аналогичных условиях.

Оценка биологических свойств матриц

По окончании инкубации оценивали жизнеспособность клеток с помощью флуоресцентной микроскопии ($n = 3$ для каждого типа матриц), пролиферативную активность методом конфокальной флуоресцентной микроскопии ($n = 3$), метаболическую активность колориметрическим методом ($n = 6$).

Метаболическая активность эндотелиальных клеток на поверхности матриц

Метаболическую активность оценивали колориметрическим методом с использованием набора Cell Cytotoxicity Assay Kit – Colorimetric (Abcam, Англия). В лунки с образцами вносили реактив в рабочей концентрации 1 : 5 с культуральной средой, инкубировали 3 ч при 37°C. После этого по 200 мкл реактива из лунок с образцами переносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность на двух длинах волн 570 и 605 нм с помощью спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США). Метаболическую активность клеток в условных единицах (УЕ) рассчитывали по формуле:

$$\text{Метаб. активность (УЕ)} = R_{\text{оп}} - R_0,$$

R – отношение оптической плотности (ОП) при длине волны 570 нм к ОП при длине волны 605 нм (ОП570/ОП605), оп – опытный образец, 0 – “нулевая” проба без клеток, содержащая реактив в рабочей концентрации, предназначена для вычета фонового окрашивания.

Жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности фибриновых матриц

Клетки окрашивали ядерным флуоресцентным красителем Hoechst 33342 в концентрации 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 10 мин, далее, для детекции ядер мертвых клеток проводили дополнительное окрашивание бромистым этидием в концентрации 30 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 1 мин. Подсчет клеток на образцах и культуральном пластике производили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с 10 случайных полей зрения с каждого образца клеток с поля зрения на $S = 1 \text{ мм}^2$. Количество живых клеток определяли вычитанием количества мертвых клеток из общего количества клеток.

$$\text{ЖК (\%)} = \text{АЖ}/\text{АВ} \times 100\%,$$

где ЖК – жизнеспособность клеток %, АЖ – абсолютное количество живых клеток, АВ – абсолютное количество всех клеток.

Пролиферативная активность эндотелиальных клеток

Пролиферативную активность клеток оценивали с использованием набора Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки инкубировали с EdU-реагентом в течение 16 ч, далее окрашивали в соответствии с инструкцией производителя. После окончания процедуры ядра клеток

контрастировали красителем DAPI 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 30 мин. Препараты анализировали с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM700 (Carl Zeiss, Германия). Оценивали 10 случайно выбранных полей зрения с каждого образца при увеличении $\times 20$, по 2 образца для каждого типа полимера. Количественный анализ изображений осуществляли в программе ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, США), подсчитывали общее количество и количество пролиферирующих клеток в поле зрения.

$$\text{ОП \%} = \text{ПК/ОК} \times 100\%,$$

ОП — относительное количество пролиферирующих клеток, ПК — количество пролиферирующих клеток в поле зрения, ОК — общее количество клеток в поле зрения.

Исследование адгезионных свойств образцов

Адгезионные свойства оценивали по площади, занимаемой белком фокальной адгезии паксиллином. Для этого подготовленные образцы фиксировали 10 мин 4%-ным параформальдегидом, пермеабелизировали в растворе 0.1%-ного Triton X-100 в течение 15 мин, неспецифическое связывание блокировали внесением 1%-ного бычьего сывороточного альбумина на ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее образцы инкубировали с первичными антителами Recombinant Anti-Paxillin 1 : 200 (Abcam, Англия) при 4°C в течение ночи, отмывали и инкубировали 1.5 ч со вторичными антителами Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США) 1 : 600 и Phalloidin Alexa Fluor 568 (Invitrogen, США) 1 : 40. После повторного отмывания от несвязавшихся вторичных антител выполняли контрастирование ядер 10 мкг/мл DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochlorid) (Sigma Aldrich, США) в течение 40 мин. Готовые образцы монтировали под покровные стекла в ProLong medium (Life Technologies, США) и исследовали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Zeiss, Германия).

Исследование в пульсирующем потоке

Подготовка сосудистых протезов и заселение в биореакторе:

Полимерные сосудистые каркасы стерилизовали в этиленоксиде, затем проводили модификацию внутренней поверхности в подготовленном растворе коллагена, фибронектина и фибрина аналогично описанному выше протоколу ($n = 3$). Каркасы помещали на 6 ч в раствор фибронектина или коллагена, далее аккуратно промывали ФСБ три раза с экспозицией 5 мин. Полимеризацию фибрином выполняли путем пропитывания графта раствором преципитата с последующим коротким погружением в 0.2%-ный раствор CaCl_2 . Ожидали окончательную полимеризацию в течение 2 ч с последующей промывкой ФСБ.

Заселение конструкции эндотелиальными клетками и подключение к биореактору:

В подготовленные таким образом протезы вводили суспензию КФЭК в концентрации 5×10^5 клеток/мл, концы лигировали и далее помещали в полную питательную среду EGM-2 с 5% ФБС при 37°C и 5% CO_2 . Для равномерного расселения клеток по поверхности выполняли медленную радиальную ротацию конструкции в течение 18 ч, после чего проводили замену культуральной среды. Для создания пульсирующего потока использовали насос Harvard Rodent Blood Pump model 1407 (Harvard Apparatus, США) с шаровыми клапанами, который имитирует работу желудочков сердца.

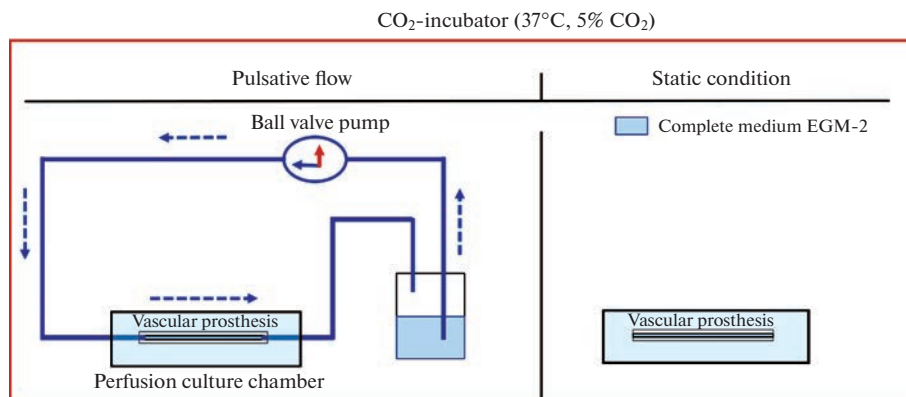


Рис. 1. Схема эксперимента на удержание эндотелиальных клеток на внутренней поверхности протезов в динамических (пульсирующий биореактор) и статических условиях. В CO₂-инкубатор помещали контур биореактора, содержащий перфузионную камеру с заселенным клетками протезом, насос с шаровыми клапанами, резервуар для культуральной среды. В системе создавалось конечное напряжение сдвига 2.46 дин/см². Одновременно в статических условиях культивировали заселенный клетками протез.

Интенсивность напряжения сдвига (τ) рассчитывали по формуле [12]

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi r^3},$$

где μ – вязкость среды (Р) (приравнивали к вязкости полной среды DMEM с высоким содержанием глюкозы и 5% ФБС при 37°C, поскольку среды имели одинаковый состав критически важных компонентов, значимо влияющих на вязкость раствора [13]), Q – скорость потока жидкости (мл/с), π – отношение длины окружности к ее диаметру, r – радиус протеза (см).

Для динамического культивирования заселенные сосудистые протезы подключали к системе (рис. 1) и в течение суток создавали напряжение сдвига 1.1 дин/см²: объем выброса 0.3 мл, частота выброса – 20 уд/мин, скорость потока 0.8 мл/с, температура 37°C.

Затем постепенно увеличивали напряжение сдвига до 2.46 дин/см²: объем выброса 0.7 мл, частота выброса – 20 уд/мин, скорость потока – 1.79 мл/с. В таком режиме культивировали еще 5 сут. Другую часть заселенных клетками протезов оставляли в статических условиях на аналогичный промежуток времени с заменой культуральной среды дважды в сутки. Общее время культивирования с ЭК составило 7 сут.

Детекция клеток на внутренней поверхности графтов

По окончании эксперимента проводили иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности протезов. Внутреннюю поверхность фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин, разрезали вдоль и фиксировали на предметных стеклах внутренней поверхностью вверх. Клетки окрашивали на CD144, фактор фон Виллебранда (vWF). Перед окрашиванием образцы пермеабilizировали 0.01%-ным раствором Triton X-100. Соответствующие антигены метили первичными антителами: Rabbit anti-CD144 (Abcam, Англия), Sheep anti-vWF – FITC (Abcam, Англия), далее использовали вторичные антитела Donkey anti-Rabbit

IgG Highly Cross-Adsorbed – AF488 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение 16 ч, со вторичными – при комнатной температуре в течение часа. Образцы отмывали и докрашивали DAPI (Sigma, США). Готовые препараты заключали под стекло в ProLong (Life Technologies, США) и анализировали на конфокальном микроскопе LSM 700.

Дополнительно определяли плотность заселения поверхности протеза клетками. На окрашенных DAPI препаратах подсчитывали количество ядер в поле зрения, анализировали не менее 20 случайно выбранных полей зрения при увеличении $\times 20$, проводили пересчет на мм^2 и результаты представляли $\text{кл}/\text{мм}^2$.

Статистическая обработка данных

Статистическую и графическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Характер распределения данных в выборках оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение отличалось от нормального, количественные данные представлены в виде медианы и квартилей (Q1, Me, Q3). Достоверность различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Сравнение между несколькими группами проводили по критерию Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимым при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболическая активность клеток

Немодифицированный матрикс ПГБВ/ПКЛ обеспечивал самую низкую метаболическую активность клеток (0.200, 0.213, 0.242 УЕ), которая значимо не различалась с модификацией коллагеном (0.360, 0.409, 0.437 УЕ) (рис. 2а).

Покрытие фибронектином повышало метаболическую активность ЭК (0.843, 0.917, 1.079 УЕ), при этом фибриновое покрытие позволяло достигнуть наиболее высокие показатели (2.006, 2.076, 2.133 УЕ), сопоставимые с положительным контролем на пластике (1.563, 1.665, 1.699 УЕ).

Жизнеспособность клеток

Покрытие матриц фибронектином и фибрином увеличивало жизнеспособность и количество ЭК по сравнению с ПГБВ/ПКЛ (рис. 2б, 2с). Количество клеток на поверхности фибрина в 9.9 раз (131.0, 141.5, 161.9 $\text{кл}/\text{мм}^2$), а фибронектина в 3.3 раза (38.10, 47.62, 69.05 $\text{кл}/\text{мм}^2$) превышало показатели немодифицированного ПГБВ/ПКЛ (0, 14.28, 28.82 $\text{кл}/\text{мм}^2$). Обработка коллагеном не дала ожидаемого улучшения показателей жизнеспособности (31.28, 50.0, 50.05%) и количества ЭК (18.92, 28.57, 38.10 $\text{кл}/\text{мм}^2$) по сравнению с ПГБВ/ПКЛ (жизнеспособность 9.38, 41.67, 54.17%). Максимальная жизнеспособность (88.71, 94.84, 98.16%) и количество КФЭК обнаружено на матрицах, модифицированных фибрином и на культуральном пластике (жизнеспособность 96.18, 100, 100%; количество клеток 76.19, 85.71, 115.20 $\text{кл}/\text{мм}^2$).

Пролиферативная активность

Пролиферативная активность КФЭК, аналогично предыдущим результатам, была максимальной на фибрине (14.26, 26.67, 33.33%) и значимо превышала показатели не только на ПГБВ/ПКЛ (0, 0, 0%), но и на коллагене (0, 0, 9.38%) и фибронектине (0, 0, 25.0%) (рис. 2д, 2е). Пролиферативная активность клеток на стекле

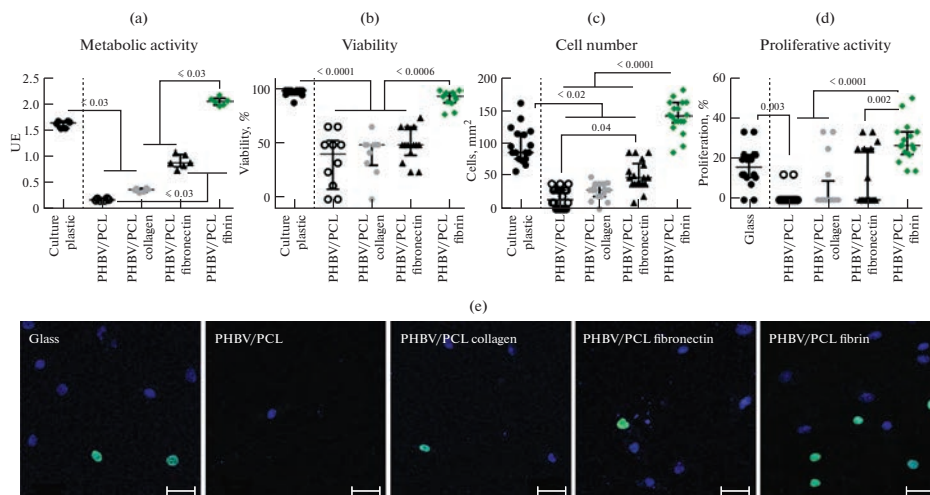


Рис. 2. Биологические свойства матриц в статических условиях (a–d). Графическое выражение количественных данных метаболической активности, жизнеспособности, количества клеток на поверхности, пролиферативной активности. (e) – Типичные фотографии заселенных матриц, демонстрирующие пролиферирующие (зеленое окрашивание) и непролиферирующие клетки (синее окрашивание) (шкала 50 мкм).

(11.11, 13.25, 22.22%) была выше, чем на ПГБВ/ПКЛ и не отличалась от других модифицирующих покрытий.

Адгезионные свойства

На фотографиях визуализируется белок фокальной адгезии паксиллин (зеленый цвет) и связанный с ним белок микрофиламентов F-актин (красный цвет) (рис. 3a). Поверхность фибрина покрывает монослой ЭК, тогда как на коллагене и фибронектине имеются незаселенные участки. Количественная обработка визуальных данных подтверждает, что на поверхности фибрина паксиллин занимает максимальную площадь (24.48, 27.25, 29.6%), которая превышает коллаген (14.46, 17.01, 19.08%), фибронектин (17.94, 19.81, 20.92%) и пластик (16.02, 20.35, 22.15%) (рис. 3b).

Сохранение эндотелиального слоя в условиях пульсирующего потока

Количество КФЭК на внутренней поверхности протезов через 7 суток культивирования в условиях статики подтверждают преимущество покрытия коллагеном, фибронектином и фибрином. Так, количество клеток на немодифицированных протезах из ПГБВ/ПКЛ значительно ниже (9.45, 23.63, 40.17 кл/мм²), чем на таких же протезах с коллагеном (139.4, 170.1, 250.4 кл/мм²), фибронектином (155.3, 204.1, 231.0 кл/мм²) и фибрином (241.0, 264.6, 304.8 кл/мм²) (рис. 4).

Аналогичную картину наблюдали в условиях пульсирующего потока. Однако количество клеток на фибрине (259.9, 311.9, 342.6 кл/мм²) было значительно выше, чем на коллагене (44.9, 70.9, 113.5 кл/мм²) и фибронектине (64.4, 93.6, 93.6 кл/мм²). Сравнение результатов на аналогичных заселенных протезах при динамическом и статическом культивировании характеризует способность поверхности к удержа-

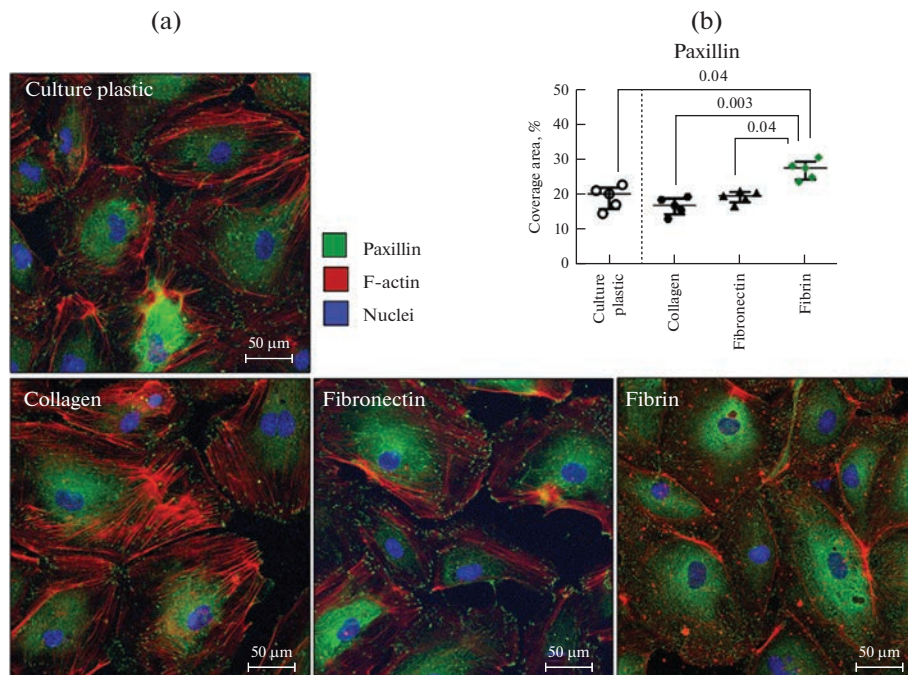


Рис. 3. Формирование очагов фокальной адгезии в эндотелиальных клетках на различных поверхностях в статических условиях. (а) — Типичные фотографии клеток, окрашенных на паксиллин (зеленая) и белок микрофиламентов F-актин (красная) (шкала 50 мкм). (б) — Площадь поверхности образцов, занимаемая паксиллином.

нию клеток в кровотоке. В условиях пульсирующего потока количество клеток на поверхности протезов, покрытых коллагеном и фибронектином, было более чем в 2 раза меньше по сравнению со статическими условиями. На фибриновом покрытии этот показатель в статике и в динамике не различался.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К идеальному сосудистому протезу предъявляется комплекс требований, которому лучше всего соответствуют гибридные материалы. Каркасную функцию, физико-механические свойства, соответствующие сосудам малого диаметра, может создавать основа из биосовместимых синтетических полимеров [14]. Матрицы на основе этих полимеров, полученные методом электроспиннинга, имитируют структуру внеклеточного матрикса, поэтому легче заселяются клетками и интегрируются с прилегающими тканями по сравнению с пленочными образцами. В качестве каркаса протезов сосудов малого диаметра, выполненного методом электроспиннинга, предлагают к разработке различные синтетические полимеры: полиуретаны [15], поли(L-лактид) [16], ароматический полиимид [17], поликапролактон, полиэтилентерефталат (ПЕТ), политетрафторэтилен [4], а также их различные комбинации [18, 19]. Однако отсутствие сайтов клеточной адгезии существенно снижает их биосовместимость и приводит к слабому удержанию клеток в условиях напряжения сдвига. Пропитывание или покрытие полимерных каркасов белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген, фибронектин, фибрин, сформирует недостающие

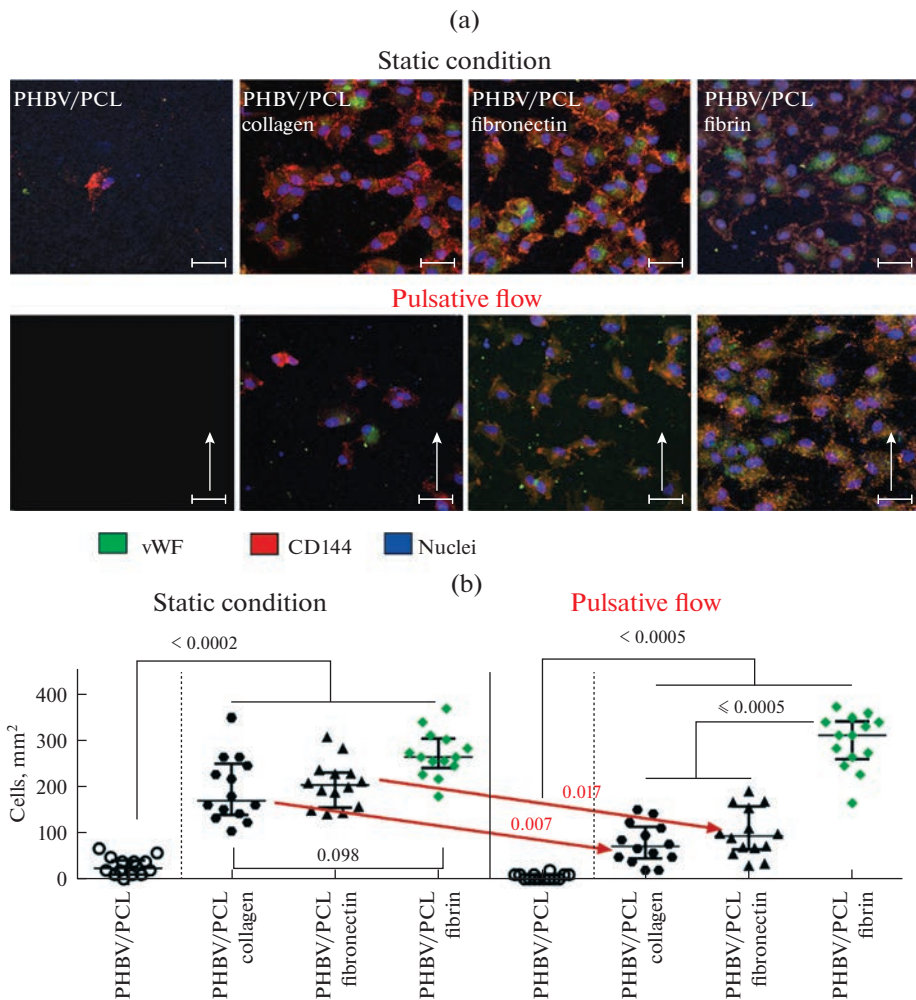


Рис. 4. Результаты эксперимента по удержанию эндотелия в условиях пульсирующего потока. (а) — Типичные фотографии КФЭК на внутренней поверхности протезов из ПГБВ/ПКЛ с покрытием и без через 7 сут культивирования в статических и динамических условиях (биореактор, напряжение сдвига 2.46 дин/см², стрелка показывает направление потока жидкости). Окраска: vWF (зеленая), CD144 (красная), ядра клеток (синяя) (шкала 50 мкм). (б) — Плотность клеток на поверхности протезов в зависимости от условий культивирования.

сайты клеточной адгезии, улучшит биологические функции конструкции, удержит клетки от смывания пульсирующим током крови.

К сожалению, в настоящее время мало публикаций посвящено вопросу удержания клеток в условиях пульсирующего потока. Нам встретилась единственная работа Chlupáč и соавт. [20], в которой представлена сравнительная характеристика различных белков внеклеточного матрикса в отношении эффективности удержания ЭК на поверхности сосудистого протеза в условиях пульсирующего биореактора. Исследователи тестировали коммерческие протезы на основе PET с коллагеном I типа и таких же протезах, дополнительно покрытых ламинином, фибрином и

фибрином/фибронектином. На коммерческом и покрытом ламинином протезах наблюдалась значительная и прогрессирующая потеря клеток. При тех же условиях на поверхности протезов, дополнительно обработанных фибрином и фибрином/фибронектином, количество клеток не только не снижалось, но даже увеличивалось, что исследователи связывают с хорошим удержанием клеток и началом их пролиферации.

Опираясь на эти данные, для сравнения нами были выбрали три варианта БВМ: коллаген I типа, фибронектин и фибрин. Результаты показали, что максимальной биологической активностью и адгезионными свойствами обладало фибриновое покрытие, а наиболее низкие показатели соответствовали коллагену. Об адгезионных свойствах материала может свидетельствовать количество клеток на поверхности, а также площадь, занимаемая фокальными контактами. Контакт клетки с внеклеточным матриксом формируется скоплением интегриновых рецепторов на клеточной мембране, которые взаимодействуют с актиновым цитоскелетом через белки фокальной адгезии [21]. Фокальные контакты, обеспечивающие прикрепление клеток к внеклеточному матриксу, вовлечены во многие сигнальные пути, в том числе в клеточный ответ и адаптацию к механическому стрессу [21]. Белок паксиллин не только формирует связь интегринов с цитоскелетом и служит сигнальным белком, но также является ключевым компонентом механизма механотрансдукции, основанного на взаимодействии клеток с субстратами [22].

Известно, что адгезия ЭК к фибрину и фибронектину проходит с участием интегриновых рецепторов $\alpha v \beta 3$ и $\alpha 5 \beta 1$ [23], включенных в механизмы адаптации к гемодинамическим влияниям и регуляции экспрессии генов, активирующих ангиогенез и пролиферацию клеток [24]. Примечательно, что данные интегрины не задействованы в адгезии ЭК к коллагену [23, 25], что также свидетельствует о преимуществе клеточного взаимодействия с фибрином и фибронектином при формировании биомиметической ниши.

Отличительной особенностью фибрина перед другими БВМ является его высокая биодоступность, поскольку он в достаточном количестве и простыми методами может быть получен из периферической крови человека [26]. Совокупность биодоступности и уникальных биологических свойств, способствующих удержанию эндотелиального слоя, делает аутологичный фибрин предпочтительным покрытием для тканеинженерных конструкций, подверженных воздействию пульсирующего потока жидкости, в том числе сосудистых протезов.

В работе использовались более низкие показатели напряжения сдвига (2.46 дин/см^2) по сравнению с физиологическим диапазоном в артериях различной локализации ($5\text{--}12 \text{ дин/см}^2$), но в пределах значений, характерных для венозных сосудов ($1\text{--}6 \text{ дин/см}^2$) [27–29]. Выбор связан с моделированием элементов preconditionирования ЭК в условиях постепенного увеличения напряжения сдвига до значений, соответствующих венозным сосудам, с дальнейшей перспективой имплантации заселенного сосудистого протеза с подготовленными ЭК в артериальное сосудистое русло.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение покрытий на основе коллагена, фибронектина и фибрина показало преимущества фибрина в отношении биологической привлекательности, адгезионных свойств и сохранения эндотелиального слоя на поверхности в условиях пульсирующего потока.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (номер протокола №4/1 от 18 апреля 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 “Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fang S, Ellman DG, Andersen DC (2021) Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large Animals and Humans. *Cells* 10(3): 713. <https://doi.org/10.3390/cells10030713>
2. Táborská J, Riedelová Z, Brynda E, Májek P, Riedel T (2021) Endothelialization of an ePTFE vessel prosthesis modified with an antithrombogenic fibrin/heparin coating enriched with bound growth factors. *RSC Adv* 11: 5903. <https://doi.org/10.1039/D1RA00053E>
3. Bian Q, Chen J, Weng Y, Li S (2022) Endothelialization strategy of implant materials surface: The newest research in recent 5 years. *J Appl Biomater Funct Mater* 20: 22808000221105332. <https://doi.org/10.1177/22808000221105332>
4. Wong CS, Sgarioto M, Owida AA, Yang W, Rosenfeldt FL, Morsi YS (2006) Polyethyleneterephthalate provides superior retention of endothelial cells during shear stress compared to polytetrafluoroethylene and pericardium. *Heart Lung Circ* 15: 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2006.08.002>
5. Schneider PA, Hanson SR, Price TM (1988) Durability of confluent endothelial cell monolayers on small-caliber vascular prostheses in vitro. *Surgery* 103: 456–462.
6. Sgarioto M, Vigneron P, Patterson J, Malherbe F, Nagel MD, Egles C (2012) Collagen type I together with fibronectin provide a better support for endothelialization. *C R Biol* 335(8): 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.07.003>
7. Asadishekari M, Mpoyi EN, Li Y, Eslami J, Walker M, Cantini M, Gourdon D (2022) Three-Dimensional Tunable Fibronectin-Collagen Platforms for Control of Cell Adhesion and Matrix Deposition. *Front Phys* 10: 806554. <https://doi.org/10.3389/fphy.2022.806554>
8. Wacker M, Riedel J, Walles H, Scherner M, Awad G, Varghese S, Schürlein S, Garke B, Veluswamy P, Wipermann J, Hülsmann J (2021) Comparative Evaluation on Impacts of Fibronectin, Heparin-Chitosan, and Albumin Coating of Bacterial Nanocellulose Small-Diameter Vascular Grafts on Endothelialization *In Vitro*. *Nanomaterials* 11: 1952. <https://doi.org/10.3390/nano11081952>

9. *Gui L, Boyle MJ, Kamin YM, Niklason LE* (2014) Construction of tissue-engineered small-diameter vascular grafts in fibrin scaffolds in 30 days. *Tissue Eng Part A* 20(9–10): 1499–1507. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0263>
10. *Yang L, Li X, Wu Y, Du P, Sun L, Yu Z, Song S, Yin J, Ma X, Jing C, Zhao J, Chen H, Dong Y, Zhang Q, Zhao L* (2020) Preparation of PU/Fibrin Vascular Scaffold with Good Biomechanical Properties and Evaluation of Its Performance in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* 15: 8697–8715. <https://doi.org/10.2147/IJN.S274459>
11. *Kutikhin AG, Tupikin AE, Matveeva VG, Shishkova DK, Antonova LV, Kabilov MR, Velikanova E* (2020) Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells Yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells* 9(4): 876. <https://doi.org/10.3390/cells9040876>
12. *Dong JD, Gu YQ, Li CM, Wang CR, Feng ZG, Qiu RX, Chen B, Li JX, Zhang SW, Wang ZG, Zhang J* (2009) Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacol Sin* 30(5): 530–536. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.40>
13. *Poon C* (2022) Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices. *J Mech Behav Biomed Mater* 126: 105024. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.105024>
14. *Wang D, Xu Y, Li Q, Turng LS* (2020) Artificial small-diameter blood vessels: materials, fabrication, surface modification, mechanical properties, and bioactive functionalities. *J Mater Chem B* 8(9): 1801–1822. <https://doi.org/10.1039/c9tb01849b>
15. *Chernonosova V, Gostev A, Murashov I, Chelobanov B, Karpenko A, Laktionov P* (2021) Assessment of electrospun pellethane-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Materials (Basel)*. 14(13): 3678. <https://doi.org/10.3390/ma14133678>
16. *Попов ГИ, Попрядухин ПВ, Юкина ГЮ, Сухорукова ЕГ, Иванькова ЕМ, Вавилов ВН, Юдин ВЕ* (2020) Морфологическое исследование биорезорбируемой трубчатой матрицы малого диаметра из поли(L-лактида) для тканеинженерного сосудистого имплантата. *Цитология* 62 (1): 38–46. [*Popov GI, Popryadukhin PV, Yukinac GY, Sukhorukova EG, Ivankova E.M, Vavilova VN, Yudin VE* (2020) Morphological study of a bioresorbable tubular matrix of a small diameter from a poly(l-lactide) for a tissue-engineered vascular implant. *Cytology* 62(1): 38–46. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S004137712001006X>
17. *Чирятева АЕ, Завражных НА, Попрядухин ПВ, Юкина ГЮ, Кривенцов АВ, Иванькова ЕМ, Юдин ВЕ* (2022) Нетканые сосудистые протезы малого диаметра на основе нановолокон из ароматического полиимиды. *Биофизика* 67(4): 827–832. [*Chiriateva AE, Zavrazhnykh NA, Popryadukhin PV, Yukina GYu, Kriventsov AV, Ivankova EM, Yudin VE* (2022) Small diameter non-woven vascular prostheses based on aromatic polyimide nanofibers. *Biophysics* 67(4): 827–832. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302922040226>
18. *Jirofti N, Mohebbi-Kalhari D, Samimi A, Hadjizadeh A, Kazemzadeh GH* (2020) Fabrication and characterization of a novel compliant small-diameter PET/PU/PCL triad-hybrid vascular graft. *Biomed Mater* 15(5): 055004. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab8743>
19. *Khanova MYu, Velikanova EA, Matveeva VG, Krivkina EO, Glushkova TV, Sevostianova VV, Kutikhin AG, Antonova LV* (2021) Endothelial cell monolayer formation on a small-diameter vascular graft surface under pulsatile flow conditions. *Rus J Transplantol Artif Organs* 23(3): 101–114. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-3-101-114>
20. *Chlupáč J, Filová E, Riedel T, Houska M, Brynda E, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Fernandez P, Daculsi R, Bourget C, Bordenave L, Bačáková L* (2014) Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res* 63(2): 167–177. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932577>
21. *Burridge K* (2017) Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J* 284(20): 3355–3361. <https://doi.org/10.1111/febs.14195>
22. *Ripamonti M, Wehrle-Haller B, de Curtis I* (2022) Paxillin: A Hub for Mechano-Transduction from the $\beta 3$ Integrin-Talin-Kindlin Axis. *Front Cell Dev Biol* 10: 852016. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852016>

23. Post A, Wang E, Cosgriff-Hernandez E (2019) A Review of Integrin-Mediated Endothelial Cell Phenotype in the Design of Cardiovascular Devices. *Ann Biomed Eng* 47: 366.
<https://doi.org/10.1007/s10439-018-02171-3>
24. Schaufler V, Czichos-Medda H, Hirschfeld-Warnecken V, Neubauer S, Rechenmacher F, Medda R, Kessler H, Geiger B, Spatz JP, Cavalcanti-Adam EA (2016) Selective binding and lateral clustering of $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins: Unraveling the spatial requirements for cell spreading and focal adhesion assembly. *Cell Adhesion & Migration* 10(5): 505–515.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1163453>
25. Hunter EJ, Hamaia SW, Kim PSK, Malcor JD, Farndale RW (2022) The effects of inhibition and siRNA knockdown of collagen-binding integrins on human umbilical vein endothelial cell migration and tube formation. *Sci Rep* 12: 21601.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-25937-1>
26. Матвеева ВГ, Ханова МЮ, Антонова ЛВ, Барбараш ЛС (2020) Фибрин — перспективный материал для тканевой сосудистой инженерии. *Вестн трансплантол и искусств органов* 22(1): 196–208. [Matveeva VG, Khanova MU, Antonova LV, Barbarash LS (2020) Fibrin — a promising material for vascular tissue engineering. *Rus J Transplantol and Artif Organs* 22(1): 196–208. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-196-208>
27. Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffignal T (2020) Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol* 11: 861.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00861>
28. Chandran Latha K, Sreekumar A, Beena V, Lakkappa RB, Kalyani R, Nair R, Kalpana SR, Kartha CC, Surendran S (2021) Shear stress alterations activate BMP4/pSMAD5 signaling and induce endothelial mesenchymal transition in varicose veins. *Cells* 10: 3563.
<https://doi.org/10.3390/cells10123563>
29. Papaioannou TG, Stefanadis C (2005) Vascular wall shear stress: Basic principles and methods. *Hell J Cardiol* 46: 9–15.

Fibrin Coating Contributes to the Retention of the Endothelial Layer in Pulsating Flow

V. G. Matveeva^{a, *}, E. A. Velikanova^a, L. V. Antonova^a, and L. S. Barbarash^a

^aResearch Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

*e-mail: matveeva_vg@mail.ru

The presence of a modifying coating based on extracellular matrix proteins on the inner surface of vascular prostheses is known to enhance endothelial cell adhesion and prevent detachment under pulsating flow conditions. This coating effectively reduces the risk of thrombosis and plays a critical role in determining implantation outcomes. Although proteins like collagen, fibrin, and fibrinogen are commonly used as coatings to improve cell adhesion, their relative effectiveness remains uncertain. Objective: This study aims to identify the optimal coating, based on extracellular matrix proteins, that preserves prosthesis functionality and maintains endothelial layer integrity under pulsating flow conditions. Methods: Scaffolds and vascular prostheses were fabricated using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) through an electrospinning process. These structures were then modified with collagen I, fibronectin, or fibrin. Endothelial colony-forming cells (ECFCs) were seeded onto the protein-modified electrospun samples and cultured under both static and dynamic conditions. After a 3-day incubation period under static conditions, cell viability, metabolic and proliferative activity, as well as adhesive properties, were evaluated. Adhesive properties were assessed by analyzing the area occupied by the focal adhesion protein paxillin. Cell retention was determined by comparing cell density on the inner surface of 4 mm diameter vascular prostheses after a 7-day incubation period, both under pulsating flow conditions and static conditions. Results: Cell metabolic activity, viability, number, proliferation, and the area occupied by the focal adhesion protein paxillin were found to be significantly higher in samples coated with fibrin compared to those coated with collagen I

and fibrinogen. The cell density (cells/cm²) of ECFCs on the inner surface of fibrin-coated prostheses showed no significant difference between dynamic and static conditions. In contrast, collagen and fibronectin coatings resulted in approximately half the cell density under pulsating flow conditions compared to static conditions. Conclusion: The fibrin coating demonstrated superior biological activity, adhesive properties, and preservation of the endothelial layer under both static and pulsating flow conditions, as compared to collagen I and fibronectin coatings. Consequently, the utilization of fibrin coating emerges as a promising option for modifying the inner surface of vascular prostheses.

Keywords: fibrin, coating, vascular prostheses, pulsating flow, cell retention

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ЭРИТРОИДНЫХ ФОРМ В КРОВИ И ГОЛОВНОЙ
ПОЧКЕ КЕФАЛИ-СИНГИЛЯ (*CHELON AURATUS* RISSO, 1810)
НА ПРОТЯЖЕНИИ ГОДОВОГО ЦИКЛА**

© 2023 г. А. А. Солдатов¹, *, В. Н. Рычкова¹, Т. А. Кухарева¹, А. Г. Рокотова¹

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

*E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.04.2023 г.

После доработки 14.06.2023 г.

Принята к публикации 16.06.2023 г.

Исследовали изменение числа эритроцитов и содержание незрелых эритроидных форм в крови и гемопоэтической ткани кефали-сингиля (*Chelon auratus* Risso, 1810) на протяжении годового цикла. Отлов и доставку рыбы в аквариальную проводили ежемесячно. Определяли содержание эритробластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов в головной почке (пронефрос) и циркулирующей крови. Установлено, что процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани кефали-сингиля протекают нерегулярно. Активная продукция эритроидной массы приурочена в основном к постнерестовому периоду. Об этом свидетельствует увеличение содержания незрелых эритроидных форм в головной почке и крови. Это совпадает с общим увеличением числа клеток красной крови в системе циркуляции и свидетельствует о смещении эритроцитарного баланса в пользу продукционных процессов. В остальной период времени процессы противоположны. Допускается, что это связано с особенностями организации системы красной крови, которая исключает регулярную продукцию эритропоэтина в почках.

Ключевые слова: эритроциты, эритропоэз, головная почка, *Chelon auratus* Risso, 1810, годовой цикл

DOI: 10.31857/S0869813923070130, **EDN:** XNURLU

ВВЕДЕНИЕ

Кровь и кроветворная ткань морских и пресноводных рыб являются объектом исследования на протяжении многих лет. Работы, проведенные за последние годы, существенно расширили имеющиеся представления. Они нашли отражение в ряде обзоров [1–3]. Получены сведения об особенностях гуморальной регуляции эритропоэтических процессов [4–7], о гемопоэтических клетках [8–10], деструкции старых эритроидных форм и резервах депо крови [3, 11], продолжительности жизни, циркулирующей эритроцитарной массы [1, 3] и др. Все это позволяет рассматривать красную кровь рыб как физиологическую систему.

Анализ состояния данной системы на протяжении годового цикла позволил выявить в ней определенные периодические изменения. Это выражалось в моноцикличности динамики концентрации гемоглобина и числа эритроцитов крови [12–15], что косвенно отражало изменение баланса между продукционными и деструктивными процессами. Результаты исследований ряда авторов показали, что данная динамика определяется характером изменения температуры воды. Наиболее наглядно эта зависимость представлена в исследованиях, выполненных на тилипиях

(*Tilapia zilli*) [16]. Авторы определяли среднемесячную температуру воды на протяжении года и показали, что в условиях субтропиков температурный минимум (14°C) приходится на январь, а максимум (27°C) — на август. В соответствии с этим происходило и изменение числа циркулирующих эритроцитов. Положительная корреляция между температурой среды и кислородной емкостью крови отмечена и для других видов рыб [14, 17].

Однако в ряде работ показано отсутствие прямой связи между температурой воды и гематологическими характеристиками. У некоторых видов рыб максимальная концентрация гемоглобина и число эритроцитов отмечались в более холодные периоды годового цикла (осень, весна) [15]. Особый интерес представляют работы, в которых констатируется факт значительного увеличения кислородной емкости крови в зимний период [12, 18, 19]. Показано также, что гемопоэтическая ткань рыб сохраняет чувствительность к управляющим сигналам (гипоксия) даже в условиях гипотермии (1–2°C) [20]. Это означает, что в основе динамики гематологических характеристик рыб на протяжении годового цикла могут лежать какие-то иные процессы.

Известно, что в период нереста состояние многих физиологических систем претерпевает наиболее радикальные изменения [21]. Система красной крови в этом отношении не является исключением. Отмечено, что у мригала (*Cirrhinus mrigala*) концентрация гемоглобина и число эритроцитов в крови в преднерестовый период существенно понижается [22], что может быть связано с перераспределением пластических ресурсов организма в пользу генеративной ткани. Аналогичные изменения происходят у рыб и при искусственной стимуляции нереста (инъекции вытяжек гипофиза карпа, гонадотропина, эстрогена, рилизинг-факторов) [23, 24]. К концу нереста и в постнерестовый период (2–3 мес.) развиваются противоположные изменения: усиливаются процессы эритропоэза в гемопоэтической ткани [25], повышается кислородная емкость крови [22, 26]. Насколько нерест определяет сезонную динамику гематологических характеристик крови у рыб до конца неясно.

О нерегулярности эритропоэтических процессов в гемопоэтической ткани свидетельствует и значительная продолжительность жизни клеток красной крови у костистых рыб, определенная при помощи ³H-тимидина и флуоресцентных зондов [27, 28]. Она составила 270–310 дней. Это означает, что генерация клеток красной крови в кроветворной ткани у рыб происходит либо с крайне низкой скоростью, либо разово в течение ограниченного промежутка времени. Можно допустить, что она приурочена к нерестовому периоду, когда происходит значительное перераспределение пластических ресурсов в организме, о чем говорилось выше.

Из представленной информации следует, что численность эритроцитов в крови рыб на протяжении годового цикла не является постоянной величиной. Прямой связи с температурой среды не обнаружено. Наиболее радикальные изменения числа клеток красной крови в кровяном русле у многих видов приурочены к нерестовому периоду. Продолжительность жизни эритроцитов в 270–310 дней позволяет предположить, что генерация клеточной массы должна происходить разово. Проверить эти предположения возможно только путем исследования функциональной активности гемопоэтической ткани на протяжении полного годового цикла, что и входило в задачу настоящего исследования.

Цель работы — исследовать клеточный состав эритроидных элементов крови и гемопоэтической ткани у кефали-сингиля (*Chelon auratus* Risso, 1810) и соотнести его с изменением числа эритроцитов в крови на протяжении годового цикла.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

Объектом исследования являлась теплолюбивая кефаль-сингиль, нерест которой происходит в августе–сентябре. Рыбу отлавливали при помощи ставного нево-

да на протяжении года в районе Керченского пролива и юго-западе Крымского полуострова. Использовали взрослых особей обоих полов в возрасте 4–6 лет: масса тела – 183–275 г, длина – 21–28 см.

Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 100 л с воздушной аэрацией. При транспортировке материала на значительные расстояния использовали полиэтиленовые мешки, атмосферу в которых заполняли кислородом. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы и бассейны объемом 200–1500 л, имеющих естественный проток и освещение, и выдерживали в данных условиях в течение 5–7 суток. В течение этого времени особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6–7% от массы тела. В работе использовали активно питающихся, подвижных особей.

Отбор проб

Для предотвращения развития состояния манипуляционного стресса за 60–70 мин до отбора проб рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи. Величины эффективных доз препарата были определены ранее [29]. Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Образцы передней почки (пронефроса) получали путем вскрытия брюшной полости.

Лабораторные исследования

Число эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [30]. Одновременно изготавливали мазки крови и отпечатки передней почки, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд + Романовский–Гимза) [30]. На препаратах определяли относительное содержание незрелых эритроидных форм, находящихся на разных стадиях созревания: пронормобластов, базофильных и полихроматофильных нормобластов. Расчет для цельной крови проводили с учетом числа зрелых эритроцитов, для головной почки – с учетом клеточных форм всех ростков гемопоэза. Объем выборочных совокупностей составлял 5000 клеток. В работе применяли светооптический микроскоп Biomed PR-2 Lum (Россия), обору́дованный камерой Levenhuk C NG Series (Китай).

Статистический анализ

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09 [31]. Нормальность распределения выборочных совокупностей проверяли по Shapiro–Wilk (W -test). Статистические сравнения выполнены на основе параметрического F -критерия и непараметрического Welch F -критерия соответственно для выборок соответствующих и несоответствующих закону нормального распределения. Минимальный уровень значимости составлял $p < 0.05$. В работе использовали 31 особь кефали-сингиля. Объем выборочных совокупностей показан на графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Циркулирующая кровь

На рис. 1а представлен полигон распределения значений числа эритроцитов в крови кефалей на протяжении годового цикла. Зависимость хорошо описывается уравнением параболической функции.

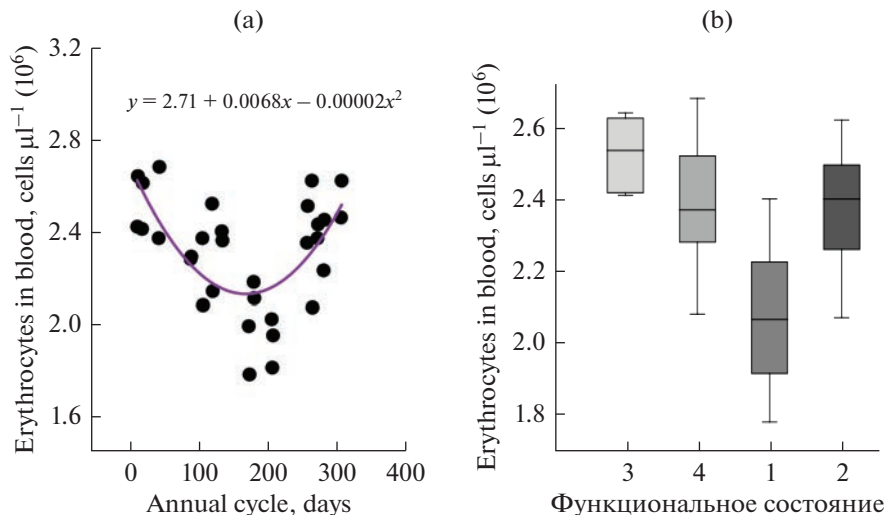


Рис. 1. Изменение числа эритроцитов в крови кефали-сингиля на протяжении годового цикла. (а) – Полигон распределения; (б) – после ранжирования; по оси абсцисс – нулевая точка соответствует началу календарного года; 1 – преднерестовый период, май–июль; 2 – нерестовый период, август–октябрь; 3 – постнерестовый период, ноябрь–январь; 4 – период относительного функционального покоя, февраль–апрель; $n = 31$; различия достоверны при $p < 0.001$.

Максимальные величины были отмечены в зимний период времени, а минимальные – в летние месяцы, то есть зависимость от температурного фактора фактически не была выражена. Для оценки статистической значимости выявленных различий выборочные совокупности ранжировали с шагом в три месяца: май–июль (преднерестовый период), август–октябрь (нерестовый период), ноябрь–январь (постнерестовый период), февраль–апрель (относительный функциональный покой). Результаты представлены на рис. 1б. Как видно из рисунка, различия между максимальными и минимальными величинами были статистически выражены и составляли 19–20% ($p < 0.001$). Из графика видно, что рост числа клеток красной крови приходился на нерестовый и постнерестовый период.

В массе циркулирующая кровь была представлена зрелыми оксифильными эритроцитами, имеющими эллипсоидную форму. Продольная ось клетки составляла 14.0 мкм. Ядро компактное, с высокой долей гетерохроматина расположено в центре клетки (рис. 2а). Незрелые эритроидные формы встречались редко и были представлены в основном полихроматофильными нормобластами (ПН), реже базофильными нормобластами (БН). БН имели округлую форму, базофильную цитоплазму и относительно крупное ядро с высокой долей эухроматина (рис. 2с). ПН представляют собой более дифференцированные клеточные системы. Они приобретали эллипсоидную форму, цитоплазма сочетала базофильные и ацидофильные свойства (цвет серый), ядро крупное с хорошо выраженной перинуклеарной зоной (рис. 2д).

Анализ присутствия незрелых эритроидных форм в крови кефалей на протяжении годового цикла показал нерегулярность их появления и относительного содержания в кровяном русле (рис. 3а, 3б). Их минимальный уровень (не более 2% клеточной массы) отмечали в начале весны (март, 100 сут), а максимальных значений (6–7% клеточной массы) этот показатель достигал в начале осени (250–300 сут), что совпадало с нерестовым и постнерестовым периодом. При этом клетки более ранних генераций (БН) наблюдались в крови только в постнерестовый период (сентябрь–октябрь, 250–300 сут) (рис. 4а). ПН же встречались на протяжении все-

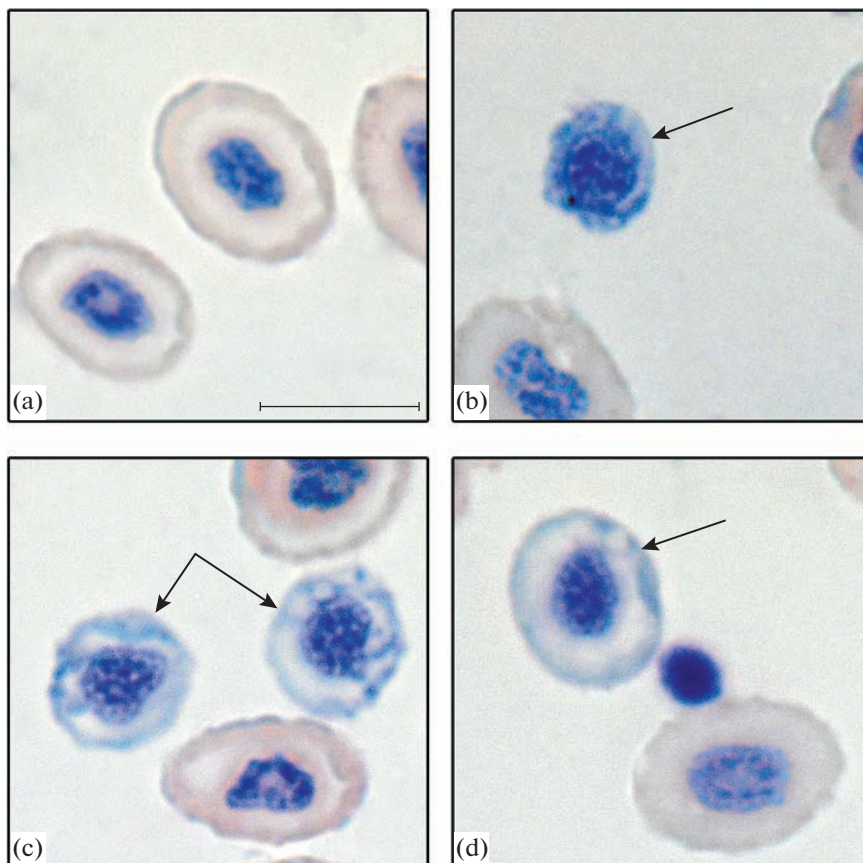


Рис. 2. Эритроидные элементы крови и головной почки кефали. (а) — Зрелые эритроциты; (б) — стрелкой показан эритробласт; (с) — стрелками показаны базофильные нормобласты; (d) — стрелкой показан полихроматофильный нормобласт; масштабная линейка — 10 мкм.

го года с явным максимумом в начале осени. Наблюдаемые изменения были статистически значимы ($p < 0.001$).

Головная почка (пронефрос)

В головной почке популяция эритроидного ростка гемопоэза была представлена тремя видами клеток: эритробласти (ЭБ), БН и ПН. Особенности морфологии двух последних форм были рассмотрены выше (рис. 2с, 2d). ЭБ — наименее дифференцированная группа эритроидных элементов (рис. 2б). Это небольшие округлые клетки. Крупное ядро с высокой долей эухроматина занимает почти весь их объем. Резко базофильная цитоплазма представлена в виде узкой полосы.

Размеры популяции эритроидных элементов в головной почке были непостоянны и имели выраженную динамику на протяжении годового цикла. Она полностью совпадала с изменением числа эритроцитов и незрелых эритроидных форм в крови кефали. Максимальные размеры очага эритропоэза в головной почке отмечали в постнерестовый период (сентябрь—октябрь, 250–300 сут) (рис. 3а, 3с). На эритроидные формы приходилось до 14% от остальной клеточной массы отпечатков про-

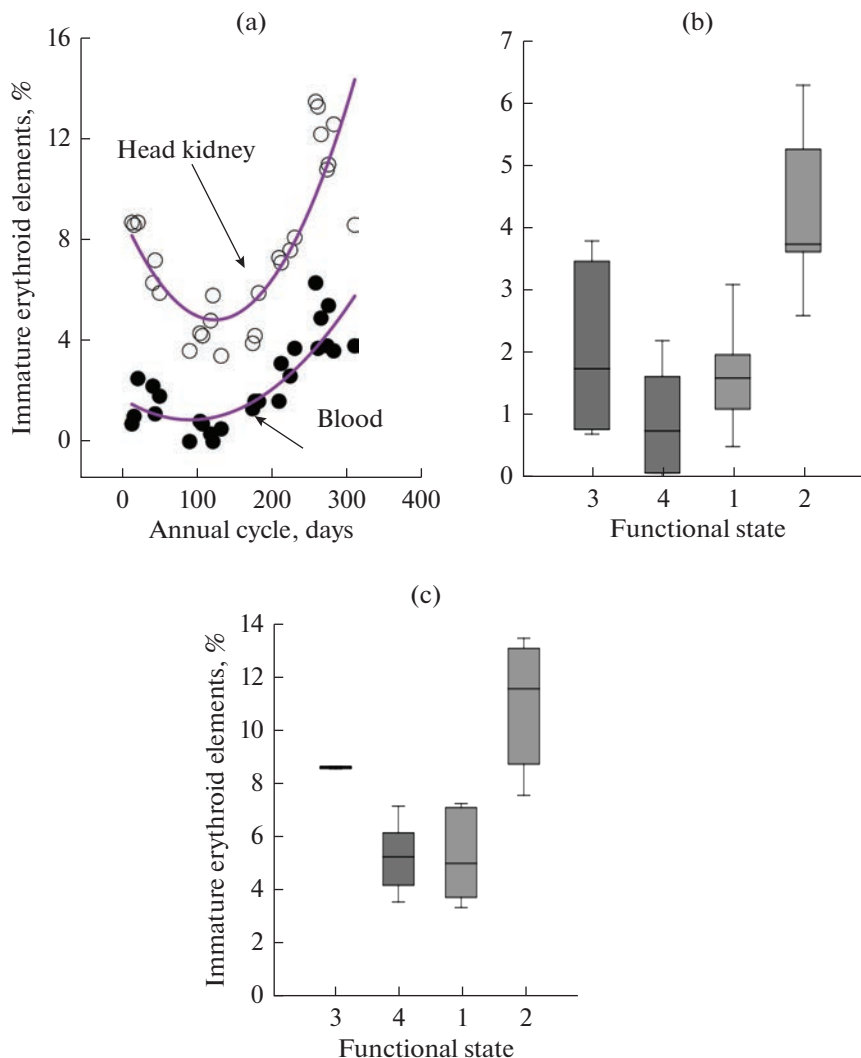


Рис. 3. Общее содержание незрелых эритроидных элементов в крови и головной почке кефали-сингиля на протяжении годового цикла. (а) — Полигоны распределения; (б) — циркулирующая кровь; (с) — головная почка (пронефрос); по оси абсцисс — нулевая точка соответствует началу календарного года; 1 — преднерестовый период, май—июль; 2 — нерестовый период, август—октябрь; 3 — постнерестовый период, ноябрь—январь; 4 — период относительного функционального покоя, февраль—апрель; $n = 24$; различия достоверны при $p < 0.001$).

нефроса. Минимальные значения были зарегистрированы на начало весны (март, 100 сут) — 3–6%. Различия были статистически выражены ($p < 0.001$). Аналогичную динамику отмечали со стороны ЭБ и БН ($p < 0.01$) (рис. 4б). Их присутствие в головной почке кефали отмечали на протяжении всего годового цикла. При этом изменений со стороны ПН не наблюдали. Число данных клеточных форм в гемопоэтической ткани сохранялось на уровне не более 1% в течение всего периода наблюдений.

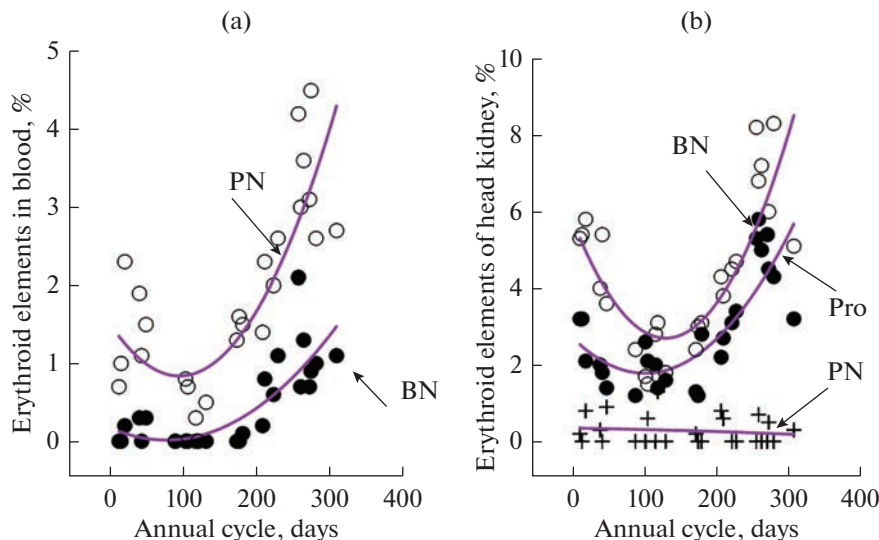


Рис. 4. Содержание отдельных эритроидных элементов в крови и головной почке кефали-сингиля на протяжении годового цикла. (а) — Циркулирующая кровь; (б) — головная почка (пронефрос); Pro — про-нормобласты; BN — базофильные нормобласты; PN — полихроматофильные нормобласты; $n = 24$; различия достоверны при $p < 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процессы, ответственные за изменение числа эритроцитов в крови

Из представленной информации видно, что число эритроцитов в крови кефали на протяжении годового цикла претерпевало существенные изменения. Различия между минимальными и максимальными значениями составляли 22–23%, что соответствует $0.46 - 0.47 (10^6)$ клеток мкл^{-1} . При этом отсутствовала какая-либо связь с температурой среды и числом эритроцитов в крови, которая ранее была показана в отношении *Tilapia zilli* [16] и ряда других видов костистых рыб [14, 17]. Максимальные значения приходились на конец осени—начало зимы: $2.35 - 2.55 (10^6)$ клеток мкл^{-1} .

В основе данных изменений может лежать несколько процессов [1]:

- изменение баланса между продукционными и деструктивными процессами в системе красной крови;
- опорожнение кровяных депо;
- гидратация и дегидратация плазмы крови.

Первый механизм наиболее вероятен. Прирост числа эритроцитов в крови кефалей совпадал с активной продукцией клеток красной крови гемопоэтической тканью (головная почка), снижение — с подавлением данных процессов. Значения коэффициентов детерминации превышали 0.78. Головная почка (пронефрос) является основным органом эритропоэза у костистых рыб [32]. Участие в этом процессе других органов и тканей менее значимо [1]. Поэтому активная генерация эритроидных элементов данным органом способна сместить баланс в системе красной крови в пользу продукционных процессов. Описанная в статье моноцикличность функционирования гемопоэтической ткани (эритроидный росток) у кефали также хорошо совпадает с известной продолжительностью жизни для клеток красной крови у костистых рыб — 270–310 дней [27, 28].

Участие селезенки в коррекции числа эритроцитов крови также следует исключить из рассмотрения. Селезенку большинство авторов рассматривают как орган вторичного эритропоэза [1, 3]. Появление малодифференцированных эритроидных форм здесь наблюдается в момент, когда размеры очагов эритропоэза в почках достигают критических значений. Считается, что здесь сосредоточены преимущественно очаги лимфо-, тромбо- и гранулопоэза [1, 3, 33]. Основная же функция селезенки, как и у высших позвоночных, связана с резервированием старой эритроцитарной массы, которая затем подвергается деградации [34]. В разрушении принимают активное участие мелано-макрофагальные элементы [35, 36]. Селезенка также обладает развитой ретикулярной тканью, которая обеспечивает ее сокращение [37, 38]. В критических состояниях (стресс, острые формы гипоксии) эти эритроциты могут возвращаться в кровоток, повышая кислородную емкость крови [1, 3]. Рост их числа в крови при этом может достигать 30%. Считается, что у пелагических рыб, к которым относится и кефаль, эта функция развита лучше, чем у донных [39]. Вместе с тем данный процесс не может быть положен в основу наблюдаемых в крови кефали изменений. Это связано с тем, что селезенка содержит старые эритроидные формы, которые не могут длительно (на протяжении года) находиться в системе циркуляции. С другой стороны, в настоящей работе была использована уретановая анестезия, которая препятствовала развитию состояния манипуляционного стресса у кефалей в момент отбора проб крови и тканей.

Относительное изменение числа эритроцитов в крови может наблюдаться при частичной гидратации и дегидратации плазмы крови. Однако эти процессы чаще всего отмечаются в условиях изменения солёности среды, при адаптации к условиям гипоксии и ряду других фактов [40, 41]. Участие их в изменении числа эритроцитов в крови рыб на протяжении годового цикла маловероятно.

Нерест и состояние гемопоэтической ткани

Размножение (нерест) является важным этапом жизненного цикла любого организма. Это особое состояние, для которого характерно значительное перераспределение пластических ресурсов в пользу генеративной ткани [21]. Оно сказывается на состоянии многих физиологических систем, и красная кровь не является исключением. У ряда видов костистых рыб в этот период отмечается развитие анемии [42]. Концентрация гемоглобина и число эритроцитов существенно понижаются. Это происходит на фоне ограничения двигательной и пищевой активности [21]. Следует отметить, что дефицит пищевого субстрата не возникает при искусственном выращивании рыбы, и анемичные состояния здесь обычно не наблюдаются.

Развитие преднерестовой анемии может являться следствием разрушения части эритроцитарной массы ввиду ее старения. Как отмечали в настоящей работе, активная продукция эритроцитов происходила в постнерестовый период. Об этом свидетельствовало повышение содержания в крови и головной почке малодифференцированных эритроидных форм. Процесс наблюдался на протяжении 2–3 месяцев. Продолжительность жизни эритроцитов у костистых рыб составляет 270–310 дней [27, 28]. Это означает, что в преднерестовый и нерестовый период в крови должны преобладать старые клетки, которые в норме утрачивают эластичность и отфильтровываются селезенкой, где происходит их последующая деградация [1–3].

Для старых эритроцитов рыб характерно снижение активности антиоксидантных ферментных систем, что приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [43]. Не исключено, что этот процесс может усугубляться изменением гормонального статуса организма. Показано, что инъекции вытяжек гипофиза карпа, гонадотропина, эстрогена, рилизинг-факторов часто сопровождаются понижением числа эритроцитов в крови рыб [23, 24].

Старение эритроцитов может приводить и к развитию метгемоглобинемии. Известно, что респираторные пигменты рыб отличаются низкой устойчивостью к окислению в сравнении с высшими позвоночными [44, 45]. В них выявлена NADH-дифораза, которая вместе с цитохромом b способствует поддержанию гемоглобина в ферро-форме [46, 47]. В этом также принимают участие и ряд восстановителей: глутатион (GSH), аскорбиновая кислота, токоферол [48]. В старых клетках красной крови этот комплекс может оказаться малоэффективным, что должно повышать долю ферри-формы и снижать кислородную емкость крови в целом. Описаны случаи повышения уровня метгемоглобина в крови до 27% (*Gadus morhua*) без видимых признаков токсической нагрузки [49].

Из представленной информации следует, что в циркулирующей крови кефалей в преднерестовый период должна находиться старая эритроцитарная масса, которая подвергается деградации, скорее всего, в селезенке. Это приводит к развитию анемии и метгемоглобинемии. Последнее должно индуцировать выработку эритропоэтинов и сопровождаться продукцией эритроцитов в гемопоэтической ткани [50, 51]. Данные соединения были идентифицированы в крови рыб при помощи методов иммунохимического анализа [52]. Наиболее высокая их концентрация обнаружена в почках [5, 53]. Полная структура гена эритропоэтина в настоящее время аннотирована для бурого фугу (*Takifugu rubripes*) [4]. Установлено, что выработка эритропоэтина в почках рыб коррелирует с уровнем тестостерона в крови [54], что позволяет говорить о реальности происходящих событий в организме кефали на протяжении годового цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, численность эритроцитов в крови кефали-сингиля на протяжении годового цикла претерпевает моноциклические изменения, которые хорошо описываются уравнением параболической регрессии. Прямой связи с температурой морской среды не установлено. Продукция эритроцитов гемопоэтической тканью совпадает с постнерестовым периодом и наблюдается на протяжении 2–3 мес. Об этом свидетельствует рост содержания в крови и головной почке популяции малодифференцированных эритроидных элементов. Это совпадает с увеличением числа эритроцитов в системе циркуляции и свидетельствует о смещении эритроцитарного баланса в пользу продукционных процессов. В остальной период времени процессы противоположны. Полученная информация может быть также интересна для хозяйств, занимающихся садковым выращиванием кефалей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием рыбы были выполнены в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (2010/63/ЕС) и одобрены местным институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (протокол № 750д от 06.06.2023).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта РНФ “Определение причин спонтанного роста концентрации метгемоглобина в крови морских рыб на протяжении годового цикла” (номер проекта 23-24-00061).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента — А.А.С.; сбор данных — А.А.С., Р.В.Н., К.Т.А., Р.А.Г.; обработка данных — А.А.С., Р.В.Н., К.Т.А., Р.А.Г.; написание и редактирование манускрипта — А.А.С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soldatov AA (2005) Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system (review). *J Evol Biochem Physiol* 41(3): 272–281.
<https://doi.org/10.1007/s10893-005-0060-0>
2. Chu CY, Cheng CH, Yang CH, Huang CJ (2008) Erythropoietins from teleosts. *Cell Mol Life Sci* 65: 3545–3552.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8231-y>
3. Witeska M (2013) Erythrocytes in teleost fishes: a review. *Zool and Ecol* 23(4): 275–281.
<https://doi.org/10.1080/21658005.2013.846963>
4. Chou C-F, Tohari S, Brenner S, Venkatesh B (2004) Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood* 104: 1498–1503.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3404>
5. Lai JCC, Kakuta I, Mok HOL, Rummer JL, Randall D (2006) Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *J Exp Biol* 209: 2734–2738.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02279>
6. Paffett-Lugassy N, Hsia N, Fraenkel PG, Paw B, Leshinsky I, Barut B, Bahary N, Caro J, Handin R, Zon LI (2007) Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood* 110: 2718–2726.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016535>
7. Kulkeaw K, Sugiyama D (2012) Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. *Stem Cell Res Ther* 3(6): 55–64.
<https://doi.org/10.1186/scrt146>
8. Gering M, Patient R (2005) Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev Cell* 8: 389–400.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.010>
9. Jin H, Xu J, Wen Z (2007) Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood* 109: 5208–5214.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069005>
10. Zhang Y, Jin H, Li L, Qin FX, Wen Z (2011) cMyb regulates hematopoietic stem/progenitor cell mobilization during zebrafish hematopoiesis. *Blood* 118: 4093–4101.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-342501>
11. Sales CF, Silva RF, Amaral MGC, Domingos FFT, Ribeiro AIMA, Thomé RG, Santos HB (2017) Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotrop Ichthyol* 15(1): e160041.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160041>
12. Bhagat RP, Banerjee V (1986) Haematology of an Indian fresh water eel *Amphipnous cuchia*: erythrocyte count and related parameters with special reference to body length, sex and season. *Comp Physiol Ecol* 11(1): 21–27.
13. Maslova MN, Soldatov AA, Tavrovskaya TV (1988) Seasonal dynamics in the state of the red blood system of several Black sea fish. *J Evol Biochem Physiol* 24(4): 398–402.
14. Joshi PC (1989) Seasonal changes in the blood parameters of a hill-stream teleost, *Channa gachua*. *Comp Physiol Ecol* 14(2): 71–73.
15. Al-Hassan LAJ, Al-Abood AY, Al-Seyab AA (1990) Seasonal variations in the haemoglobin concentration and haematocrit values of *Silurus triostegus*. *Acta Ichthyol et Piscatoria* 20(1): 99–103.
16. Ezzat AA, Shabana MB, Farghaly AM (1974) Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli*. I. Blood cells. *J Fish Biol* 6(1): 1–12.
17. Sharma T, Joshi BD (1985) Effect of seasonal variation on some haematologic values of hill stream fish *Torputitora*. *J Adv Zool* 6(1): 39–45.
18. Lochmiller RL, Weichman JD, Zale AV (1989) Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass. *Comp Biochem Physiol* 93A(3): 535–541.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90007-8)
19. Mahoney JB, McNulty JK (1992) Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary. *Trans Am Fish Soc* 121(2): 261–268.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1992\)121<0261:NDBCAN>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1992)121<0261:NDBCAN>2.3.CO;2)

20. Soldatov AA, Kladchenko ES, Kukhareva TA, Andreyeva AY (2020) Erythrocyte profile of circulating blood of *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) under conditions of experimental hypothermia. J Ther Biol 2020 89: 102549.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102549>
21. Shulman GE, Love RM (1999) The Biochemical Ecology and Marine Fishes. Adv. Mar. Biol. 36. London. Acad Press.
<https://doi.org/10.1023/A:1012639928289>
22. Raizada MN, Singh CP (1981) Seasonal variations in the erythrocyte counts and haemoglobin content of *Cirrhinus mrigala* (Ham.). Proc Indian Nat Sci Acad 47(5): 656–658.
23. Ochiai A, Ogawa M, Umeda S, Taniguchi N (1975) Change of blood properties of maturing japan eel at hormonal influences. Bull Jap Soc Sci Fish 41(6): 609–614.
24. Hilge V, Klinger H (1978) Changes in the hemogram of the male European eel (*Anguilla anguilla*) during induced maturation. ICES CM.
25. Andreyeva AY, Soldatov AA, Kukhareva TA (2017) Black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) hemopoiesis: Analysis by flow cytometry and light microscopy. The Anatom Rec 300(11): 1993–1999.
<https://doi.org/10.1002/ar.23631>
26. Ranzani-Paiva MJT (1995) Hematological characteristics of the mullet, *Mugil platanus* G. from Cananea lagoon-estuarine region. Bol Inst Pesca-Sao-Paulo 22(1): 1–22.
27. Khrushchov NG, Lange MA, Zolotova TE, Bessonov AV (1993) Characteristics of erythroid sprout cells in mirror carp (perspectives of use in estimating the fish physiological-state). Izvest akad nauk ser biol (1): 83–87.
28. Fischer U, Ototake M, Nakanishi T (1998) Life span of circulating blood cells in *Ginbuna crucian* carp (*Carassius auratus langsdorffii*). Fish Shellfish Immunol 8: 339–349.
<https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0144>
29. Soldatov AA (2005) Physiological aspects of effects of urethane anesthesia on the organism of marine fishes. Hydrobiol J 41(1): 113–126.
<https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v41.i1.130>
30. Houston AH (1990) Blood and circulation. In: Schreck CB, Moyle PH (ed) Methods for fish biology. Bethesda. Am Fish Soc. 273–322.
31. Hammer Ø, Harper DAT (2006) Paleontological data analysis. Blackwell. Oxford.
<https://doi.org/10.1002/jqs.1107>
32. Verde C, Giordano D, Russo R, Di Prisco G (2011) Blood. Erythropoiesis in Fishes. In: Farrell AP (ed) Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Acad Press. 992–997.
33. Mahabady MK, Morovvati H, Arefi A, Karamifar M (2012) Anatomical and Histomorphological Study of Spleen and Pancreas in Berzem (*Barbus pectoralis*). World J Fish and Marine Sci 4(3): 263–267.
<https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2012.04.03.61283>
34. Borgioli G, Frangioni G (1997) Blood and splenic respiratory compensation in larval newts. Ital J Zool 64: 221–226.
<https://doi.org/10.1080/11250009709356200>
35. Galindez EJ, Aggio (1998) MC The spleen of *Mustelus schmitti* (*Chondrichthyes*, *Triakidae*): a light and electron microscopic study. Ichthyol Res 45: 179–186.
<https://doi.org/10.1007/BF02678560>
36. Kurtović B, Teskeredžić E, Teskeredžić Z (2008) Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Acta Adriat 49(2): 147–154.
37. Muiswinkel WB, Lamers CHJ, Rombait JHWM (1991) Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. Res Immunol 142: 962–966.
[https://doi.org/10.1016/0923-2494\(91\)90093-X](https://doi.org/10.1016/0923-2494(91)90093-X)
38. Sundaresan M (2014) Ultrastructure of Spleen in the Freshwater Fish, *Tilapia mossambica* (Peters). Eur Acad Res 2(2): 2894–2908.
39. Soldatov AA (1992) Развитие депо крови в онтогенезе морских рыб. Экология моря 42: 46–55. [Development of the blood depot stores in the ontogenesis of the marine fishes. Ekologiya morya 42: 46–55. (In Russ)].
40. Freire CA, Prodocimo V (2007) Special Challenges to Teleost Fish Osmoregulation in Environmentally Extreme or Unstable Habitats. In: Baldisserotto B (ed) Fish Osmoregulation. Sci Publ. 249–276.
41. Sudesh R, Sabhlok VP (2014) Effect of pinealectomy on plasma Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in catfish *Clarias batrachus* under different salinity levels. Ind J Fundament Appl Life Sci 4(2): 67–69.
42. Jawad LA, Al-Mukhtar MA, Ahmed HK (2004) The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenualosa ilisha* (Family Clupeidae). Anim Biodiver and Conservat 27 (2): 47–52.
43. Phillips MCL, Moyes CD, Tufts BL (2000) The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. J Exp Biol 203(6): 1039–1045.
<https://doi.org/10.1242/jeb.203.6.1039>

44. *Maestre R, Pazos M, Medina I* (2009) Involvement of methemoglobin (MetHb) formation and hemin loss in the pro-oxidant activity of fish hemoglobins. *J Agric Food Chem* 57(15): 7013–7021.
<https://doi.org/10.1021/jf9006664>
45. *Blair B, Barlow C, Martin E, Schumaker R, McIntyre J* (2020) Methemoglobin determination by multi-component analysis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) possessing unstable hemoglobin. *Methods* 7: 100836.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100836>
46. *Schoore EJ, Simco BA, Davis KB* (1995) Responses of blue catfish and channel catfish to environmental nitrite. *J Aquat Anim Health* 7: 304–311.
[https://doi.org/10.1577/15488667\(1995\)007<0304:ROBCAC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/15488667(1995)007<0304:ROBCAC>2.3.CO;2)
47. *Saleh MC, McConkey S* (2012) NADH-dependent cytochrome b5 reductase and NADPH methemoglobin reductase activity in the erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 38: 1807–1813.
<https://doi.org/10.1007/s10695-012-9677-2>
48. *Krishna MS, Venkataramana G* (2007) Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy-induced hypertension. *Ind J Physiol Pharmacol* 51: 284–288.
49. *Graham MS, Fletcher GL* (1986) High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts. *J Exp Zool* 239: 139–142.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402390117>
50. *Houston AH, Roberts WC, Kennington JA* (1996) Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 15(6): 481–489.
<https://doi.org/10.1007/BF01874922>
51. *Rothmann C, Levinshal T, Timan B, Avtalion RR, Malik Z* (2000) Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol* 125: 75–83.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00157-9](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00157-9)
52. *Wickramasinghe SN* (1993) Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol* 104A: 63–65.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90009-s](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90009-s)
53. *Moritz KM, Lim GB, Wintour EM* (1997) Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 273: R1829–R1844.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1829>
54. *Pottinger TG, Pickering AD* (1987) Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. *Fish Physiol Biochem* 3(3): 121–126.
<https://doi.org/10.1007/BF02180413>

Cellular Composition of Erythroid Forms in the Blood and Head Kidney of the Golden Grey Mullet (*Chelon auratus* Risso, 1810) during the Annual Cycle

A. A. Soldatov^a, *, V. N. Rychkova^a, T. A. Kukhareva^a, and A. G. Rokotova^a

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

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

The changes in the number of erythrocytes in the blood and the production of erythrocytes by the hematopoietic tissue of the golden grey mullet (*Chelon auratus* Risso, 1810) during the annual cycle were studied. Catching and delivery of fish to the aquarium was carried out monthly. The content of immature erythroid forms was determined: erythroblasts, basophilic and polychromatophilic normoblasts, in the head kidney (pronephros) and circulating blood. It has been established that the processes of erythropoiesis in the hematopoietic tissue of the golden grey mullet proceed irregularly. The active production of erythroid mass is mainly confined to the post-spawning period. This is evidenced by an increase in the content of immature erythroid forms in the head kidney and blood. This coincides with a general increase in the number of red blood cells in the circulation system and indicates a shift in the erythrocyte balance in favor of production processes. In the rest of the time, the processes are opposite. It is assumed that this is due to the peculiarities of the organization of the red blood system, which excludes the regular production of erythropoietin in the kidneys.

Keywords: erythrocytes, erythropoiesis, head kidney, *Chelon auratus* Risso, 1810, annual cycle

ПОПРАВКА

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0869813923970010, EDN: FRPUUE

К статье *П.Ю. Шкорбатова, В.А. Ляховецкий, О.В. Горский, Н.В. Павлова, Е.Ю. Баженова, Д.С. Калинина, П.Е. Мусиенко, Н.С. Меркулева* “Электрическая эпидуральная стимуляция спинного мозга децеребрированной крысы”, опубликованной в Российском физиологическом журнале им. И.М. Сеченова 2023, том 109, № 6, с. 798–816. DOI: 10.31857/S0869813923060092, EDN: WHJWUM

После публикации статьи мы заметили, что статья [37] отозвана по причине формальной неточности: указания авторами неверной аффилиации. Однако упомянутый факт, на который мы сослались, остается справедливым и подтверждается статьей [36], общий ход размышлений не меняется и выводы нашей статьи остаются верными.

Коллектив авторов.