



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

Журнал публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи по различным проблемам эволюционной, сравнительной и экологической физиологии, биохимии и морфологии



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 1, 2024

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

ОБЗОРЫ

Уникальные стратегии стрекоз в охоте и исключительно высокий уровень эйкозапентаеновой кислоты в липидах мозга: есть ли связь?

Р. Г. Парнова

3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Поиск метаболомных маркеров гипертензивных состояний разного генеза: экспериментальное исследование

*А. А. Серяпина, А. А. Сорокоумова, Ю. К. Политыко, Л. В. Яньшолё,
Ю. П. Центалович, М. А. Гилинский, А. Л. Маркель*

12

Серотонинергическая иннервация спинного мозга лягушки и участие 5-HT_{5A} рецепторов в модуляции миниатюрных глицинергических потенциалов поясничных мотонейронов

Н. М. Чмыхова, Д. С. Васильев, Н. П. Веселкин

24

Экспрессия генов-регуляторов миогенеза у сеголеток атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в условиях аквакультуры при влиянии разных режимов освещения и кормления

*М. В. Кузнецова, М. А. Родин, Н. С. Шульгина, М. Ю. Крупнова,
А. Е. Курицын, С. А. Мурзина, Н. Н. Немова*

46

Интраназальное введение инсулина крысам с ишемией и реперфузией переднего мозга уменьшает интенсивность аутофагии и апоптоза в гиппокампе и лобной коре мозга, возможный механизм действия

И. О. Захарова, Л. В. Баюнова, Д. К. Аврова, Н. Ф. Аврова

58

Эффективность применения липидного экстракта морской зеленой водоросли *Codium fragile* (Suringar) Hariot для репарации мембран эритроцитов мышей при стрессовом воздействии

С. Е. Фоменко, Н. Ф. Кушнерова, В. Г. Спрыгин

73

Управление иммунным ответом на повреждение спинного мозга *Danio rerio* посредством внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками

*Д. Б. Самбур, О. В. Калинина, А. Д. Акино, П. В. Тирикова, Е. Е. Королева,
А. С. Трулев, А. А. Рубинштейн, Л. А. Мурашова, И. В. Кудрявцев, А. С. Головкин*

85

Влияние условий сотрудничества на амплитуды вызванных потенциалов при творческой и нетворческой деятельности

Ж. В. Нагорнова, Н. В. Шемякина

105

Изменения в таксономическом составе микробиома кишечника и их связь с биосинтезом и метаболизмом витаминов группы В у детей с рассеянным склерозом

*И. Н. Абдурасулова, Е. А. Чернявская, В. А. Никитина, А. Б. Иванов, В. И. Людыно, А. А. Нартова,
А. В. Мацулевич, Е. Ю. Скрипченко, Г. Н. Бисага, В. И. Ульянов, А. В. Дмитриев*

114

Влияние гипоксии на содержание аминокислот в гемолимфе и белковом гидролизате двусторчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906)

Н. А. Голубь, А. А. Солдатов, В. И. Рябушко, А. В. Кузнецов, В. П. Курченко, Е. В. Будкевич

135

Роль опорной афферентации в формировании мышечных синергий при локомоциях

С. А. Мусеев

145

Contents

Vol. 60, No. 1, 2024

REVIEWS

- Unique Hunting Strategies of the Dragonflies and Exceptionally High Level of Eicosapentaenoic Acid in Brain Lipids: Is There a Connection?
R. G. Parnova 3

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Search For Metabolomic Markers of Hypertensive Conditions of Different Genesis: Experimental Study
A. A. Seryapina, A. A. Sorokoumova, Yu. K. Polityko, L. V. Yanshole, Yu. P. Tsentalovich, M. A. Gilinsky, and A. L. Markel 12
- Serotonergic Innervation of the Frog Spinal Cord and Involvement of 5-HT_{5A} Receptors in the Modulation of Miniature Glycinergic Postsynaptic Potentials of Lumbar Motoneurons
N. M. Chmykhova, D. S. Vasilev, and N. P. Veselkin 24
- Expression of Muscle-Specific Genes in Atlantic Salmon Fingerlings (*Salmo salar* L.) in the Conditions of Aquaculture under the Influence of Different Lighting and Feeding Regimes
M. V. Kuznetsova, M. A. Rodin, N. S. Shulgina, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsyn, S. A. Murzina, and N. N. Nemova 46
- Intranasal Administration of Insulin to Rats with Forebrain Ischemia and Reperfusion Decreases the Intensity of Autophagy and Apoptosis in Hippocampus and Frontal Brain Cortex, Possible Mechanism of Unsulin Action
I. O. Zakharova, L. V. Bayunova, D. K. Avrova, and N. F. Avrova 58
- Efficacy of Lipid Extract of Marine Green Alga *Codium Fragile* (Suringar) Hariot for Repair of Mouse Red Cells Membranes under Stress Exposure
S. E. Fomenko, N. F. Kushnerova, and V. G. Sprygin 73
- Administration of the Immune Response to Spinal Cord Injury in Zebrafish by Extracellular Vesicles Secreted by Activated Monocyte-Like Cells
D. B. Sambur, O. V. Kalinina, A. D. Aquino, P. V. Tirikova, E. E. Koroleva, A. S. Trulioff, A. A. Rubinshtein, L. A. Murashova, I. V. Kudryavtsev, and A. S. Golovkin 85
- Influence of Cooperation on the Event-Related Potentials in Verbal Creative and Noncreative Tasks Performance
Zh. V. Nagornova and N. V. Shemyakina 105
- Changes in Gut Microbiome Taxonomic Composition and Their Relationship to Biosynthetic and Metabolic Pathways of B Vitamins in Children with Multiple Sclerosis
I. N. Abdurasulova, E. A. Chernyavskaya, A. B. Ivanov, V. A. Nikitina, V. I. Liudyno, A. A. Nartova, A. V. Matsulevich, E. Yu. Skripchenko, G. N. Bisaga, V. I. Ulyantsev, and A. V. Dmitriev 114
- Effect of Hypoxia on Amino Acid Content in Haemolymph and Protein Hydrolysate of the Bivalve Mollusk *Anadara Kagoshimensis* (Tokunaga, 1906)
N. A. Golub, A. A. Soldatov, V. I. Ryabushko, A. V. Kuznetsov, V. P. Kurchenko, and E. V. Budkevich 135
- The Role of Supporting Afferentation in the Formation of Muscle Synergies Patterns in Locomotion
S. A. Moiseev 145
-

УНИКАЛЬНЫЕ СТРАТЕГИИ СТРЕКОЗ В ОХОТЕ И ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИПИДАХ МОЗГА: ЕСТЬ ЛИ СВЯЗЬ?

© 2024 г. Р. Г. Парнова^{1, *}

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

*e-mail: rimma_parnova@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

После доработки 27.11.2023 г.

Принята к публикации 30.11.2023 г.

Докозагексаеновая кислота (C22:6 ω 3) и в значительно меньшей степени эйкозапентаеновая (C20:5 ω 3) являются основными полиненасыщенными длинноцепочечными жирными кислотами омега-3 ряда в фосфолипидах мозга млекопитающих. Огромное количество проведенных за последние годы исследований свидетельствует о важной роли омега-3 жирных кислот в регуляции поведения, памяти, психического и когнитивного развития у человека и животных. Показано, что докозагексаеновая и эйкозапентаеновая жирные кислоты необходимы для процессов нейро- и синаптогенеза, формирования новых нейронных сетей, стимуляции продукции нейротрофических факторов, нейрональной и синаптической пластичности. Дефицит поступления в организм омега-3 кислот приводит к снижению пространственной памяти, когнитивного развития, способности к обучению, нарушению зрения, психомоторных функций. В контексте современных представлений о роли омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в когнитивных процессах в данной работе автор обсуждает опубликованные ранее собственные данные о резком увеличении количества эйкозапентаеновой кислоты C20:5 ω 3 в составе различных фосфолипидов в мозгу взрослых стрекоз *Aeschna grandis* L. по сравнению с личинками, связывая этот феномен с изменением среды обитания, значительным усложнением поведения взрослых форм, развитием высокоэффективных стратегий преследования добычи и переработки зрительной информации.

Ключевые слова: омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды, насекомые, мозг, поведение, когнитивные способности

DOI: 10.31857/S0044452924010012, EDN: ZGAEBC

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные публикации последних лет свидетельствуют об уникальных поведенческих стратегиях, которые используют стрекозы в охоте на мелких летающих насекомых. В отличие от классического преследования, повторяющего движение жертвы, стрекозы используют тактику перехвата добычи, действуя с высокой точностью и скоростью [1–7]. В 2015 г. в журнале *Nature* была опубликована работа, в которой авторами была применена сложная система оценки движения тела стрекозы и поворота ее глаз, фиксирующая положение жертвы в момент времени. Результаты показали, что мозг стрекозы способен моделировать траекторию движения летящего объекта, с огромной скоростью вычисляя ее изменения и рассчитывая угол атаки [1]. Стрекозы оказались первыми беспозвоночными, у которых была выявлена способность к моделированию. Эта стратегия позволяет им добиваться поимки жертвы в 97%

случаев [4]. В мозге стрекозы *Hemicordulia tau* были идентифицированы зрительные нейроны, получившие название Small Target Motion Detector (STMD) – детекторы движения малых мишеней [2, 8]. Эти нейроны, локализованные в третьем нейропиле оптических долей, обеспечивают выбор мелких движущихся объектов охоты из всего объема зрительной информации, оценивают их размеры и скорость передвижения, организуя поведение перехвата жертвы с учетом возможного изменения траектории ее движения. Проведенные авторами электрофизиологические эксперименты и компьютерное моделирование позволили установить, что даже очень незначительные отклонения в траектории движения одного выбранного целевого объекта при игнорировании изменений в общем зрительном фоне драматически меняют ответы этих нейронов из-за сложных тормозных и стимулирующих взаимодействий внутри рецептивного поля.

Наблюдение за стрекозами в природе и экспериментальные исследования их физиологии свидетельствуют о высокоорганизованной регуляции процесса полета и преследования жертвы. Их полет характеризуется очень высокой скоростью (до 60 км в час), огромной точностью и быстрой маневренностью. Стрекозы способны летать в разных направлениях (вперед, вбок и назад), менять угол наклона крыльев и мгновенно зависать в воздухе на длительное время, что не встречается у других насекомых. При этом в отличие от большинства других насекомых, каждое крыло иннервируется независимо, и мышцы, приводящие в движение каждое крыло, работают отдельно. Сложные задачи идентификации, отслеживания, предсказания и преследования цели решаются с помощью великолепно развитой зрительной системы. Большое число отдельных функционирующих омматидиев, число которых достигает 30000, маленький угол между ними, большой диаметр фасеток обеспечивают стрекозам отличное зрение и визуальный контроль пространства почти на 360 градусов, что позволяет великолепно различать мелкие движущиеся объекты на пестром фоне среди многочисленных отвлекающих факторов [9].

Сложный репертуар предсказательных стратегий преследования, оптическое устройство сложных сферических глаз, скорость обработки зрительной информации при относительно небольшом числе нейронов, нестандартная организация зрительно-моторных механизмов управления крыловыми мышцами позволяет предположить наличие у взрослых стрекоз не только структурно-функциональных, но и биохимических особенностей структуры ЦНС, связанных с таким сложным поведением. И такая особенность стрекоз, отличающая их не только от других наземных насекомых, но и от собственной стадии личинки, есть — исключительно высокий уровень в мембранных липидах головного мозга содержания эйкозапентаеновой кислоты (ЕРА, C20:5 ω 3) [10] — представителя длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) омега-3 ряда, важнейших структурно-функциональных компонентов фосфолипидов мембран мозга всех позвоночных животных.

Многочисленные работы последних лет, полученные главным образом на млекопитающих, свидетельствуют о важной роли длинноцепочечных омега-3 ПНЖК в нейро- и синаптогенезе, формировании новых нейронных сетей, синаптической пластичности, памяти и поведения [11–16]. Целью данной статьи является попытка автора найти убедительные аргументы в пользу существования взаимосвязи между сложным поведением стрекоз и обработки зрительной ин-

формации с высоким уровнем эйкозапентаеновой кислоты в липидах мозга.

Особенности состава ПНЖК в липидах наземных насекомых

Хорошо известно, что в тканях наземных насекомых, в отличие от наземных моллюсков или ракообразных, длинноцепочечные ПНЖК обнаруживаются в крайне незначительных количествах или не обнаруживаются вообще, а спектр полиеновых жирных кислот представлен только 18-атомными — линолевой (C18:2 ω 6) и альфа-линоленовой (C18:3 ω 3) кислотами, присутствующими в различных соотношениях [17–20]. Значительные количества арахидоновой кислоты, принадлежащей к омега-6 ряду (C20:4 ω 6), удается выявить лишь при анализе отдельных классов фосфолипидов в некоторых органах наземных насекомых, таких как мозг [21], репродуктивные ткани самцов и самок [22] и зрительные органы [23]. Так же как у других животных, у насекомых арахидоновая кислота является субстратом синтеза эйкозаноидов, регулирующих процессы иммунной защиты, репродукции, функционирования выделительной системы [24]. Длинноцепочечные (C $\geq$ 20) ПНЖК омега-3 ряда, основными представителями которых у позвоночных животных являются докозагексаеновая (DHA, C22:6 ω 3) и в значительно меньшей степени эйкозапентаеновая (ЕРА, C20:5 ω 3) кислоты, у наземных насекомых практически отсутствуют. Некоторые авторы рассматривают этот факт как выработанную насекомыми в ходе эволюции стратегию защиты от повреждающего воздействия окислительного стресса, к которому чрезвычайно чувствительны жирные кислоты с большим числом двойных связей [17]. Учитывая особенности организации трахейной системы насекомых, обеспечивающую прямую доставку кислорода к тканям, и исключительно высокую метаболическую активность при совершении мышечной работы, показанную для многих насекомых [25], такая гипотеза кажется вполне обоснованной.

Липиды амфибиотических насекомых содержат большое количество ЕРА

В отличие от наземных насекомых, липиды тканей амфибиотических или чисто водных видов насекомых содержат значительные количества ЕРА [26], получая ее из трофических цепей пресноводных экосистем, в которых основными продуцентами омега-3 ПНЖК являются диатомовые, криптофитовые, динофитовые микроводоросли [27, 28]. Амфибиотические насекомые

аккумулируют ЕРА на личиночной стадии своего развития, которая происходит в водной среде. Имагинальные формы многих амфибиотических видов прекрасно освоили воздушное пространство. И самый яркий пример в этом ряду — стрекозы. Их крыловые мышцы, как и у всех насекомых, снабжаются кислородом через трахейную систему, совершают интенсивную мышечную работу, в том числе при длительных перелетах и миграциях, и содержат при этом высокие количества ЕРА, имеющую в своей структуре 5 двойных связей [10, 26, 29–31]. По этой причине стрекозы, благодаря относительно крупным размерам тела и способности к дальним миграциям, рассматриваются как один из наиболее мощных источников экспорта омега-3 ПНЖК в трофические цепи наземных экосистем [29, 31]. Высокий уровень ЕРА у активно летающих стрекоз и других амфибиотических насекомых на стадии имаго противоречит гипотезе “стратегической защиты от окислительного стресса” и свидетельствует о том, что имагинальные формы, по всей вероятности, обладают развитыми механизмами защиты полиеновых жирных кислот от окислительного повреждения.

ЕРА — основная жирная кислота омега 3 ряда в липидах мозга стрекоз

Хорошо известно, что в мозгу различных млекопитающих, независимо от их систематической принадлежности, характера питания, образа жизни и способности к биосинтезу длинноцепочечных жирных кислот, количество и состав С20–22 омега-3 ПНЖК в фосфолипидах мозга очень схож [32]. Даже у дельфинов, питающихся морской пищей, богатой омега-3 кислотами, он мало чем отлича-

ется от такового у наземных травоядных или хищников. В фосфолипидах мозга всех исследованных млекопитающих среди ПНЖК омега-3 ряда доминирует С22:6 ω 3, а содержание ЕРА составляет не более 1% [27].

Жирнокислотный состав фосфолипидов мозга имаго стрекозы *Aeschna grandis L.*, обычного представителя прибрежной энтомофауны Северного полушария, демонстрирует исключительно высокий уровень ЕРА и лишь следовые количества ДНА во всех исследованных классах фосфолипидов [10] (табл. 1). Исключение составляет лишь сфингомиелин, который, так же как у всех других животных, ввиду своей особой структуры и мембранной локализации вообще не содержит ПНЖК [33]. Особенно высоко содержание ЕРА в плазмалогенной и диацильной формах фосфатидилэтаноламина (44 и 38% от суммы всех жирных кислот соответственно), фосфатидилсерине (32%) и фосфатидилинозите (28%). Такого количества ЕРА при анализе фосфолипидов целого мозга не обнаружено ни у одного из исследованных видов наземных животных. По сумме омега-3 ПНЖК в фосфолипидах мозга стрекозы значительно превосходят млекопитающих. Так, например, в диацильной форме фосфатидилэтаноламина, одном из самых ненасыщенных фосфолипидов у всех животных, суммарное количество омега-3 ПНЖК (18:3 + 20:5 + 22:5 + 22:6) в мозгу разных представителей млекопитающих составляет примерно 20–25% от суммы всех жирных кислот [32], а в мозгу стрекозы — 38%, представленных исключительно ЕРА (табл. 1). Высокое содержание ЕРА обнаружено в глазах стрекоз *Sympetrum flaveolum* [34], в то время как ДНА практически отсутствовала, тогда как у рыб и млекопитающих ее со-

Таблица 1. Содержание суммарных и отдельных фосфолипидов (в мг фосфолипидов/г сырой ткани и в % от суммы соответственно) и эйкозапентаеновой кислоты (в % от суммы всех жирных кислот) в головном мозгу личинки и имаго стрекозы *Aeschna grandis L.* (модифицировано по данным работы [10]). ND — не обнаружены

Фосфолипид	Личинка (нимфа)		Имаго	
Суммарные фосфолипиды (мг/г сырой ткани)	18.4 ± 2.4		22.3 ± 0.8	
Отдельные классы фосфолипидов	Количество фосфолипида (% от суммы)	Содержание С20:5 ω 3	Количество фосфолипида (% от суммы)	Содержание С20:5 ω 3
фосфатидилхолин	41.1 ± 0.4	6.8 ± 1.2	32.7 ± 1.4	10.6 ± 2.2
фосфатидилэтаноламин (диацильная форма)	30.9 ± 0.3	10.4 ± 2.1	36.8 ± 0.2	37.8 ± 4.1
фосфатидилэтаноламин (плазмалогенная форма)	5.9 ± 0.1	29.3 ± 2.5	5.1 ± 1.1	44.3 ± 4.2
фосфатидилсерин	7.6 ± 0.2	8.5 ± 2.5	8.4 ± 0.3	32.0 ± 3.5
фосфатидилинозит	3.5 ± 0.1	15.0 ± 3.0	4.2 ± 0.2	28.4 ± 3.3
сфингомиелин	6.7 ± 0.3	ND	10.1 ± 1.1	ND

держание в фоторецепторных клетках достигает очень высоких величин.

Переход стрекоз от стадии личинки к имаго сопровождается резким увеличением ЕРА в фосфолипидах мозга и значительным усложнением поведения

Удивительные результаты демонстрирует сравнение количества ЕРА в фосфолипидах мозга взрослых стрекоз и личинок (нимф) последнего возраста (табл. 1). Личинки стрекоз, представители трофических систем пресных водоемов, питаются пищей, богатой омега-3 ПНЖК (мелкие беспозвоночные, мальки рыб), тогда как пищей взрослых стрекоз являются наземные насекомые — мухи, мелкие чешуекрылые, комары, в которых эти жирные кислоты практически отсутствуют [20]. Тем не менее, содержание ЕРА в фосфолипидах мозга взрослых особей оказывается значительно выше, чем у личинок. В диацильной форме фосфатидилэтаноламина и в фосфатидилсерине ее содержание почти в 4 раза выше у взрослых форм, чем у личинок, в фосфатидилинозите и фосфатидилхолине — почти в 2 раза. Эта разница будет еще более выраженной, если учесть количественные различия в содержании отдельных классов фосфолипидов у личинки и имаго, например, увеличении количества фосфатидилэтаноламина — наиболее ненасыщенного фосфолипида, у взрослых форм (табл. 1).

По всей вероятности, ЕРА в тканях взрослых стрекоз имеет личиночное происхождение [29, 31]. Способность к длительному удержанию ценных для организма омега-3 ПНЖК, полученных в ходе личиночного развития, была показана и у насекомых с полным превращением, у которых на стадии куколки происходит полная структурная реорганизация тканей. Так, если в пищевой рацион гусениц восковой моли *Galleria melonella* добавить ЕРА, то она обнаруживается в фосфолипидах бабочек [35]. Хотя способность взрослых стрекоз синтезировать ЕРА *de novo* из более коротких предшественников, таких как альфа-линоленовая кислота, не изучалась, наиболее вероятным представляется предположение, что в процессе подготовки линьки личинки на имаго происходит избирательное перенаправление ЕРА в фосфолипиды ЦНС из других тканей. Основным донором ЕРА может являться пул жирных кислот, аккумулированных в ходе длительного личиночного развития в жировом теле, ключевом координаторе липидного метаболизма у насекомых [36], функционально аналогичном печени и жировой ткани позвоночных. По нашим данным содержание ЕРА в жировом теле личинки стрекозы *A. grandis* составляет 15.6% в фосфолипидах и 6.8% в триацилглицеринах [10]. Показано, что под действием 20-гидроксизона, стероидного

гормона, стимулирующего линьку и метаморфоз насекомых, происходит усиление липолиза в жировом теле, которое сопровождается увеличением содержания незэстерифицированных жирных кислот в гемолимфе. Максимальная интенсивность этих процессов, регулируемых изменением экспрессии генов, задействованных в регуляцию липидного метаболизма, отмечается на стадии линьки [36, 37].

Онтогенез стрекоз дает редкий пример усложнения поведения, способов получения и обработки сенсорной информации в связи с драматическими изменениями в характере среды обитания, передвижения в пространстве, охраны территории, способов добывания и характера пищи, которое обычно несвойственно насекомым с неполным метаморфозом. Личинки стрекоз малоподвижны, имеют слаборазвитое зрение, живут в мутной воде или зарываются в ил, в охоте используют выжидательную стратегию, ориентируясь главным образом на осязание и обоняние, обеспечиваемыми развитыми антеннами [38]. Хотя структура основных центров мозга стрекоз принципиально схожа у личинок и имаго, и предполагается, что поступающая различными сенсорными путями информация обрабатывается одними и теми же центрами мозга [39], у взрослых форм снижается количество обонятельных и механочувствительных сенсилл, значительно падает доля обоняния и резко возрастает роль зрения. Особое развитие приобретают грибовидные тела, основной ассоциативный центр мозга, отвечающий за зрение и координацию локомоции [40]. Показано, что зрительные доли, которые образуют фронтально-латеральные части протоцеребрума, достигают у взрослых стрекоз 80% от общего объема надглоточного ганглия [41]. Очевидно, что кардинальное усложнение поведения у взрослых стрекоз по сравнению с личинкой должно приводить к формированию новых нейронных сетей, обеспечивающих мгновенную переработку сложной зрительной информации и высокую скорость управления локомоторными действиями, обеспечивающими высокоэффективную стратегию охоты. В пользу этого предположения свидетельствуют также наши данные о более высоком количестве общих фосфолипидов на грамм ткани мозга у взрослых форм по сравнению с личинкой (табл. 1), что косвенно указывает на возрастание массы мембранных структур — числа отростков, а возможно и тел нейронов у взрослых стрекоз.

“Когнитивные эффекты” омега-3 ПНЖК у позвоночных и беспозвоночных животных

Наблюдаемая избирательная аккумуляция ЕРА в фосфолипидах нервной системы при переходе от стадии личинки к имаго, по всей вероятности,

важна для формирования новых нейронных сетей, обеспечивающих усложнение поведения. В пользу этого заключения свидетельствует огромный объем экспериментальных данных, полученный на млекопитающих, об аккумуляции в мозгу С20 омега-3 ПНЖК, главным образом ДНА, в период пренатального развития [15, 16, 42, 43] и их важнейшей роли в созревании мозга — обеспечении процессов нейрогенеза, нейрональной и синаптической пластичности, формирования памяти и поведения [11 — 14]. Обратные процессы — старение организма, нейродегенерация, напротив, сопровождаются снижением содержания омега-3 ПНЖК в структурах мозга [44]. ЕРА и ДНА задействованы в увеличении числа нейронов, стимуляции образования дендритных шипиков, синаптических контактов, разветвления и роста отростков нервных клеток [45 — 48]. Их действие связано с поддержанием необходимой жидкостности липидного бислоя, регуляцией соотношения “упорядоченных” (липидных рафтов) и “неупорядоченных” мембранных доменов, увеличением экспрессии синаптических белков [47, 48], обеспечением везикулярного транспорта в синапсах и регуляцией высвобождения нейротрансмиттеров [49], со стимуляцией продукции нейротрофического фактора мозга (BDNF) [50], а также с противовоспалительными и многими другими эффектами. У млекопитающих в эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера идентифицированы специфические белки-транспортёры Mfsd2a, обеспечивающие быстрый транспорт ЕРА и ДНА в составе лизофосфатидилхолина в мозг [51]. Особенно велика роль омега-3 кислот у млекопитающих в гиппокампе, ответственным за формирование эмоций, консолидацию пространственной памяти, необходимой для навигации. Недостаток омега-3 ПНЖК в рационе животных приводит к уменьшению числа и размеров нейронов гиппокампа [52], нарушению функционирования G-белок связанных рецепторов и потенциал-зависимых ионных каналов [53, 54]. Дефицит этих жирных кислот вызывает уменьшение поступления глюкозы в структуры мозга [55], снижение пространственной памяти, поведения, способности к обучению, нарушению зрения, психомоторных функций [50, 52, 56], а у человека приводит к развитию болезни Альцгеймера [14].

Роль омега-3 ПНЖК показана в структурно-функциональном развитии мозга птиц. При добавлении ДНА в пищу птенцов происходит ее накопление в структурах мозга [57], что приводит к ускорению их когнитивного развития [58, 59]. Нарушение синаптической функции при дефиците омега-3 ПНЖК выявляется уже у беспозвоночных. Так, на свободноживущей нематод *Caenorhabditis elegans*, способной синтезировать 20-атомные омега-3 ПНЖК [60], с помощью различных экс-

периментальных подходов было установлено, что у мутанта по гену *fat3*, кодирующего $\Delta 6$ десатуразу, ответственную за синтез жирных кислот с тремя и более двойными связями, было нарушено образование синаптических везикул и снижена продукция нейротрансмиттеров [61]. На моделях дрозофилы показано, что экзогенные ЕРА и ДНА оказывают нейропротективное действие, препятствуя развитию ингибирующих эффектов бипиридиновых гербицидов на экспрессию белков, обеспечивающих выживание нейронов и синаптическую стабильность, а также на функционирование митохондрий в нейронах [62]. На медоносных пчелах было показано, что изменение величины соотношения омега-3/омега-6 жирных кислот в пище в пользу омега-3 улучшает их способность к обонятельному и тактильному ассоциативному обучению [63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные выше факты позволяют предположить, что увеличение содержания ЕРА в фосфолипидах мозга взрослых стрекоз по сравнению с личинкой может являться важным, хотя, разумеется, не единственным механизмом, участвующим в обеспечении значительно более сложного поведения, предсказательных стратегий преследования добычи, переработки зрительной информации. По всей вероятности, селективная аккумуляция ЕРА в структурах мозга взрослых стрекоз, которая происходит даже при отсутствии ее поступления с пищей, призвана обеспечить формирование значительно более сложных нейронных сетей. У млекопитающих эту функцию в процессе пренатального развития мозга выполняет, главным образом, ДНА, содержание которой значительно выше, чем ЕРА. По какой-то причине у насекомых, в том числе и у амфибиотических, в отличие от большинства беспозвоночных и позвоночных животных, ДНА практически отсутствует, и даже при ее добавлении в пищу, как это было показано на дрозофилах, она быстро метаболизируется в ЕРА [64]. Возможно, что увеличение ненасыщенности жирных кислот на одну двойную связь подвергает наземных насекомых большему риску окислительного стресса. Анализ генома дрозофил выявил отсутствие элонгаз и десатураз, необходимых для превращения ЕРА в ДГК [64].

В последнее время интерес клинической медицины к специфической роли ЕРА в функционировании ЦНС сильно возрос. Хотя у млекопитающих она менее активно включается в липиды мозга и более интенсивно подвергается бета-окислению [65], обнаружены ее многочисленные самостоятельные эффекты в ЦНС, независимые от превращения ЕРА в ДНА [11, 66, 67]. Введение в диету ЕРА приводило к улучшению способности

крыс к обучению и значительно улучшала память у животных с моделью болезни Альцгеймера [49]. На нейронах гиппокампа и *in vivo* на моделях крыс с когнитивным дефицитом показано, что фосфатидилэтаноламин, обогащенный ЕРА (особенно его плазмалогенная форма), действуя через BDGF/CREB сигнальный путь обладает антиапоптотическим действием, стимулирует экспрессию белков синаптических окончаний, количество дендритов и образование дендритных шипиков [66]. Доказано, что именно ЕРА обладает терапевтическим потенциалом у человека при лечении депрессии, биполярных расстройств, шизофрении и других психических заболеваний [68–70], в основе которого лежит обеспечиваемая этой жирной кислотой модуляция синаптической пластичности [11]. Тем не менее, понять специфичность функций ЕРА на моделях млекопитающих довольно сложно ввиду потенциальной возможности ее метаболического превращения в ДНА. Наблюдаемое в ходе онтогенеза стрекоз резкое накопление ЕРА в фосфолипидах мозга, сопровождающееся значительным усложнением поведения насекомых, можно рассматривать как удивительный “природный эксперимент”, демонстрирующий корреляцию количества ЕРА в липидах мозга и степень когнитивного развития в отсутствие других длинноцепочечных жирных кислот омега-3 ряда.

ВКЛАД АВТОРОВ

Подбор литературы, написание текста были осуществлены автором лично.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (№ 075–00967–23–00). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mischianti M, Lin HT, Herold P, Imler E, Olberg R, Leonardo A* (2015) Internal models direct dragonfly interception steering. *Nature* 517(7534): 333–338. <https://doi.org/10.1038/nature14045>
2. *Fabian JM, Dunbier JR, O'Carroll DC, Wiederman SD* (2019) Properties of predictive gain modulation in a dragonfly visual neuron. *J Exp Biol* 222(Pt 17). <https://doi.org/10.1242/jeb.207316>
3. *Lancer BH, Evans BJE, Wiederman SD* (2020) The visual neuroecology of anisoptera. *Curr Opin Insect Sci* 42: 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.07.002>
4. *Olberg RM, Worthington AH, Venator KR* (2000) Prey pursuit and interception in dragonflies. *J Comp Physiol A* 186(2): 155–162. <https://doi.org/10.1007/s003590050015>
5. *Wiederman SD, O'Carroll DC* (2011) Discrimination of features in natural scenes by a dragonfly neuron. *J Neurosci* 31(19): 7141–7144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0970–11.2011>
6. *Dickinson MH* (2015) Motor control: how dragonflies catch their prey. *Curr Biol* 25(6): R232–R234. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.046>
7. *Olberg RM* (2012) Visual control of prey-capture flight in dragonflies. *Curr Opin Neurobiol* 22(2): 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.11.015>
8. *Wiederman SD, Fabian JM, Dunbier JR, O'Carroll DC* (2017) A predictive focus of gain modulation encodes target trajectories in insect vision. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.26478>
9. *Sherk TE* (1978) Development of the compound eyes of dragonflies (Odonata). III. Adult compound eyes. *J Exp Zool* 203(1): 61–80. <https://doi.org/10.1002/jez.1402030107>
10. *Parnova RG, Svetashev VI* (1985) Polyunsaturated fatty acids in tissue lipids of aquatic insects. *J Evol Biochem Physiol* 21: 139–144.
11. *Kawashima A, Harada T, Kami H, Yano T, Imada K, Mizuguchi K* (2010) Effects of eicosapentaenoic acid on synaptic plasticity, fatty acid profile and phosphoinositide 3-kinase signaling in rat hippocampus and differentiated PC12 cells. *J Nutr Biochem* 21(4): 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.12.015>
12. *Janssen CI, Kiliaan AJ* (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res* 53: 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.10.002>
13. *Godos J, Currenti W, Angelino D, Mena P, Castellano S, Caraci F, Galvano F, Del Rio D, Ferri R, Grosso G* (2020) Diet and Mental Health: Review of the Recent Updates on Molecular Mechanisms. *Antioxidants* (Basel) 9(4). <https://doi.org/10.3390/antiox9040346>
14. *Bazinet RP, Laye S* (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15(12): 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrn3820>
15. *Martinat M, Rossitto M, Di Miceli M, Laye S* (2021) Perinatal Dietary Polyunsaturated Fatty Acids in Brain Development, Role in Neurodevelopmental Disorders. *Nutrients* 13(4). <https://doi.org/10.3390/nu13041185>

16. *Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE* (2001) Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 36(9): 885–895.
<https://doi.org/10.1007/s11745-001-0798-1>
17. *Stanley D, Kim Y* (2020) Why most insects have very low proportions of C20 polyunsaturated fatty acids: The oxidative stress hypothesis. *Arch Insect Biochem Physiol* 103(1): e21622.
<https://doi.org/10.1002/arch.21622>
18. *Stanley-Samuelson DW, Jurenka RA, Cripps C, Blomquist GJ, de Renobales M* (1988) Fatty Acids in Insects: Composition, Metabolism, and Biological Significance. *Arch Insect Biochem Physiol* 9: 1–33.
19. *Moghadam NN, Holmstrup M, Manenti T, Loeschcke V* (2015) Phospholipid fatty acid composition linking larval-density to lifespan of adult *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 72: 177–183.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.10.007>
20. *Hixson SM, Sharma B, Kainz MJ, Wacker A, Arts MT* (2015) Production, distribution, and abundance of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: a fundamental dichotomy between freshwater and terrestrial ecosystems. *Envir Rev* 23(4): 414–424.
21. *Parnova RG* (1982) Polyunsaturated fatty acids in phospholipids of the cockroaches central nervous system (Blattoptera, Insecta). *J Evol Biochem Physiol* 18(6): 611–613.
22. *Pärnänen S, Turunen S* (1987) Eicosapentaenoic acid in tissue lipids of *Pieris brassicae*. *Experientia* 43: 215–217.
23. *Nor Aliza AR, Bedick JC, Rana RL, Tunaz H, Hoback WW, Stanley DW* (2001) Arachidonic and eicosapentaenoic acids in tissues of the firefly, *Photinus pyralis* (Insecta: Coleoptera). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128(2): 251–257.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(00\)00300-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(00)00300-7)
24. *Stanley D* (2006) Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu Rev Entomol* 51: 25–44.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151021>
25. *Kammer A, Heinrich B* (1974) Metabolic rates related to muscle activity in bumblebees. *J Exp Biol* 61(1): 219–227.
26. *Hanson BJ, Cummins KW, Cargill AS, Lowry RR* (1985) Lipid content, fatty acid composition, and the effect of diets on fats of aquatic insects. *Comp Biochem Physiol* 80B: 257–276.
27. *Khozin-Goldberg I, Iskandarov U, Cohen Z* (2011) LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(4): 905–915.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3441-x>
28. *Cui Y, Thomas-Hall SR, Chua ET, Schenk PM* (2021) Development of High-Level Omega-3 Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from *Phaeodactylum tricornutum*. *J Phycol* 57(1): 258–268.
<https://doi.org/10.1111/jpy.13082>
29. *Popova ON, Haritonov AY, Sushchik NN, Makhutova ON, Kalachova GS, Kolmakova AA, Gladyshev MI* (2017) Export of aquatic productivity, including highly unsaturated fatty acids, to terrestrial ecosystems via Odonata. *Sci Total Environ* 581–582: 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.017>
30. *Gladyshev MI, Sushchik NN, Makhutova ON* (2013) Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 107: 117–126.
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.03.002>
31. *MacKenzie R, Kaster JL* (2004) Temporal and spatial patterns of insect emergence from a Lake Michigan coastal wetland. *Wetlands* 24: 688–700.
32. *Crawford MA, Casperd NM, Sinclair AJ* (1976) The long chain metabolites of linoleic and linolenic acids in liver and brain in herbivores and carnivores. *Comp Biochem Physiol* B54(3): 395–401.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90264-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90264-9)
33. *Ramstedt B, Slotte JP* (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett* 531(1): 33–37.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03406-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03406-3)
34. *Sushchik NN, Popova ON, Makhutova ON, Gladyshev MI* (2017) Fatty acid composition of odonate's eyes. *Dokl Biochem Biophys* 475(1): 280–282.
<https://doi.org/10.1134/S1607672917040093>
35. *Stanley-Samuelson DW, Dadd RH* (1984) Polyunsaturated fatty acids in the lipids from adult *Galleria mellonella* reared on diets to which only one unsaturated fatty acid had been added. *Insect Biochem* 14(3): 321–327.
36. *Toprak U, Hegedus D, Dogan C, Guney G* (2020) A journey into the world of insect lipid metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol* 104(2): e21682.
<https://doi.org/10.1002/arch.21682>
37. *Wang S, Liu S, Liu H, Wang J, Zhou S, Jiang RJ, Bendena WG, Li S* (2010) 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation. *J Mol Cell Biol* 2(3): 128–138.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq006>
38. *Corbet PS* (1999) Dragonflies: Behaviour and Ecology of Odonata. Harley Books: Colchester. UK.
39. *Piersanti S, Rebora M, Salerno G, Anton S* (2020) The Antennal Pathway of Dragonfly Nymphs, from Sensilla to the Brain. *Insects* 11(12).
<https://doi.org/10.3390/insects11120886>
40. *Svidersky VL, Plotnikova SI* (2004) On structural-functional organization of dragonfly mushroom bodies and some general considerations about purpose of these formations. *J Evol Biochem Physiol* 40: 608–624.
41. *Hanström B* (1928) Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere unter Berücksichtigung seiner Funktion. Berlin. Springer.
42. *Basak S, Mallick R, Duttaroy AK* (2020) Maternal Docosahexaenoic Acid Status during Pregnancy and Its Impact on Infant Neurodevelopment. *Nutrients* 12(12).
<https://doi.org/10.3390/nu12123615>
43. *Kim H, Spector AA* (2018) N-Docosahexaenylethanolamine: A neurotrophic and neuroprotective metabolite of docosahexaenoic acid. *Mol Aspects Med* 64: 34–44.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.03.004>
44. *Lister J, Barnes CA* (2009) Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol* 66(7): 829–833.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.125>

45. *Wurtman RJ* (2017) Synapse formation in the brain can be enhanced by co-administering three specific nutrients. *Eur J Pharmacol* 817: 20–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.038>
46. *He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX* (2009) Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(27): 11370–11375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904835106>
47. *Su HM* (2010) Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem* 21(5): 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.003>
48. *Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S* (2013) n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem* 20(24): 2953–2963. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990140>
49. *Hashimoto M, Hossain S, Tanabe Y, Kawashima A, Harada T, Yano T, Mizuguchi K, Shido O* (2009) The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta(1–40). *J Nutr Biochem* 20(12): 965–973. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.08.009>
50. *Bach SA, de Siqueira LV, Muller AP, Oses JP, Quatrim A, Emanuelli T, Vinade L, Souza DO, Moreira JD* (2014) Dietary omega-3 deficiency reduces BDNF content and activation NMDA receptor and Fyn in dorsal hippocampus: implications on persistence of long-term memory in rats. *Nutr Neurosci* 17(4): 186–192. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.00000000087>
51. *Balakrishnan J, Kannan S, Govindasamy A* (2021) Structured form of DHA prevents neurodegenerative disorders: A better insight into the pathophysiology and the mechanism of DHA transport to the brain. *Nutr Res* 85: 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.12.003>
52. *Ahmad A, Murthy M, Greiner RS, Moriguchi T, Salem N Jr* (2002) A decrease in cell size accompanies a loss of docosahexaenoate in the rat hippocampus. *Nutr Neurosci* 5(2): 103–113. <https://doi.org/10.1080/10284150290018973>
53. *Shapiro H* (2003) Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct actions on the nervous system? *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids* 68(3): 219–224. [https://doi.org/10.1016/s0952-3278\(02\)00273-9](https://doi.org/10.1016/s0952-3278(02)00273-9)
54. *Javanainen M, Enkavi G, Guixa-Gonzalez R, Kulig W, Martinez-Seara H, Levental I, Vattulainen I* (2019) Reduced level of docosahexaenoic acid shifts GPCR neuroreceptors to less ordered membrane regions. *PLoS Comput Biol* 15(5): e1007033. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007033>
55. *Pifferi F, Roux F, Langelier B, Alessandri JM, Vancassel S, Jouin M, Lavialle M, Guesnet P* (2005) (n-3) polyunsaturated fatty acid deficiency reduces the expression of both isoforms of the brain glucose transporter GLUT1 in rats. *J Nutr* 135(9): 2241–2246. <https://doi.org/10.1093/jn/135.9.2241>
56. *Chung WL, Chen JJ, Su HM* (2008) Fish oil supplementation of control and (n-3) fatty acid-deficient male rats enhances reference and working memory performance and increases brain regional docosahexaenoic acid levels. *J Nutr* 138(6): 1165–1171. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1165>
57. *Price ER, Sirsat SKG, Sirsat TS, Venables BJ, Dzialowski EM* (2018) Rapid embryonic accretion of docosahexaenoic acid (DHA) in the brain of an altricial bird with an aquatic-based maternal diet. *J Exp Biol* 221(Pt 14). <https://doi.org/10.1242/jeb.183533>
58. *Lamarre J, Cheema SK, Robertson GJ, Wilson DR* (2021) Omega-3 fatty acids accelerate fledging in an avian marine predator: a potential role of cognition. *J Exp Biol* 224(Pt 4). <https://doi.org/10.1242/jeb.235929>
59. *Twining CW, Brenna JT, Lawrence P, Shipley JR, Tollefson TN, Winkler DW* (2016) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids support aerial insectivore performance more than food quantity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(39): 10920–10925. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603998113>
60. *Zhou XR, Green AG, Singh SP* (2011) *Caenorhabditis elegans* Delta12-desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the Delta12 and Delta15 positions. *J Biol Chem* 286(51): 43644–43650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266114>
61. *Marza E, Lesa GM* (2006) Polyunsaturated fatty acids and neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 1): 77–80. <https://doi.org/10.1042/BST0340077>
62. *de Oliveira Souza A, Couto-Lima CA, Catalao CHR, Santos-Junior NN, Dos Santos JF, da Rocha MJA, Alberici LC* (2019) Neuroprotective action of Eicosapentaenoic (EPA) and Docosahexaenoic (DHA) acids on Paraquat intoxication in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 70: 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.11.013>
63. *Arien Y, Dag A, Zarchin S, Masci T, Shafir S* (2015) Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(51): 15761–15766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517375112>
64. *Shen LR, Lai CQ, Feng X, Parnell LD, Wan JB, Wang JD, Li D, Ordovas JM, Kang JX* (2010) *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs. *J Lipid Res* 51(10): 2985–2992. <https://doi.org/10.1194/jlr.M008524>
65. *Chen CT, Domenichiello AF, Trepanier MO, Liu Z, Masoodi M, Bazinet RP* (2013) The low levels of eicosapentaenoic acid in rat brain phospholipids are maintained via multiple redundant mechanisms. *J Lipid Res* 54(9): 2410–2422. <https://doi.org/10.1194/jlr.M038505>
66. *Che H, Zhang L, Ding L, Xie W, Jiang X, Xue C, Zhang T, Wang Y* (2020) EPA-enriched ethanolamine plasmalogen and EPA-enriched phosphatidylethanolamine enhance BDNF/TrkB/CREB signaling and inhibit neuronal apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct* 11(2): 1729–1739. <https://doi.org/10.1039/c9fo02323b>
67. *Salvati S, Natali F, Attorri L, Di Benedetto R, Leonardi F, Di Biase A, Ferri F, Fortuna S, Lorenzini P, Sanchez M, Ricceri L, Vitelli L* (2008) Eicosapentaenoic acid stimu-

- lates the expression of myelin proteins in rat brain. *J Neurosci Res* 86(4): 776–784.
<https://doi.org/10.1002/jnr.21537>
68. Bazinet RP, Metherell AH, Chen CT, Shaikh SR, Nadjar A, Joffre C, Laye S (2020) Brain eicosapentaenoic acid metabolism as a lead for novel therapeutics in major depression. *Brain Behav Immun* 85: 21–28.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.001>
69. Peng Z, Zhang C, Yan L, Zhang Y, Yang Z, Wang J, Song C (2020) EPA is More Effective than DHA to Improve Depression-Like Behavior, Glia Cell Dysfunction and Hippocampal Apoptosis Signaling in a Chronic Stress-Induced Rat Model of Depression. *Int J Mol Sci* 21(5).
<https://doi.org/10.3390/ijms21051769>
70. Mocking RJ, Harmsen I, Assies J, Koeter MW, Ruhe HG, Schene AH (2016) Meta-analysis and meta-regression of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for major depressive disorder. *Transl Psychiatry* 6(3): e756.
<https://doi.org/10.1038/tp.2016.29>

UNIQUE HUNTING STRATEGIES OF THE DRAGONFLIES AND EXCEPTIONALLY HIGH LEVEL OF EICOSAPENTAENOIC ACID IN BRAIN LIPIDS: IS THERE A CONNECTION?

R. G. Parnova^{a, #}

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

[#] *e-mail: rimma_parnova@mail.ru*

Docosahexaenoic acid (C22:6 ω 3) and, to a much lesser extent, eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3) are the main polyunsaturated long-chain omega-3 fatty acids in mammalian brain phospholipids. A huge number of studies conducted in recent years indicate the important role of omega-3 fatty acids in the regulation of behavior, memory, mental and cognitive development in humans and animals. It has been shown that docosahexaenoic and eicosapentaenoic fatty acids are necessary for the processes of neuro- and synaptogenesis, the formation of new neural networks, stimulation of the production of neurotrophic factors, neuronal and synaptic plasticity. A deficiency of omega-3 acids leads to a decrease in spatial memory, cognitive development, learning ability, visual impairment, and psychomotor functions. In the context of modern concepts on the role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in cognitive processes, in this paper the author discusses his own previously published data on a sharp increase in the amount of eicosapentaenoic acid C20:5 ω 3 in various brain phospholipids of the dragonfly *Aeschna grandis* L. adult compared to the larvae, linking this phenomenon with a significant complication of the behavior of adult forms, the development of highly effective strategies for pursuing prey and processing visual information.

Keywords: omega-3 polyunsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid, brain, phospholipids, insects, behavior, cognition

ПОИСК МЕТАБОЛОМНЫХ МАРКЕРОВ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ СОСТОЯНИЙ РАЗНОГО ГЕНЕЗА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2024 г. А. А. Серяпина^{1,*}, А. А. Сорокоумова¹, Ю. К. Политыко^{1,3}, Л. В. Яньшолё²,
Ю. П. Центалович², М. А. Гилинский³, А. Л. Маркель^{1,4}

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

² Институт “Международный томографический центр” Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт
нейронаук и медицины”, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 18.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Персонализированный подход к диагностике и лечению артериальной гипертонии требует комплексного анализа особенностей патогенетических механизмов, лежащих в основе заболевания. Для определения специфических метаболомных маркеров различных гипертензивных состояний были исследованы четыре группы экспериментальных животных: крысы WAG (нормотензивный контроль); крысы НИСАГ (ISIAH) с наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертонией (АГ); крысы с АГ, индуцированной эндотелиальной дисфункцией, вызванной введением L-NAME; крысы с АГ, вызванной введением дезоксикортикостерона на фоне солевой нагрузки. Образцы сыворотки крови крыс анализировали методом ЯМР-спектроскопии. Проведённый метаболомный анализ дал возможность дифференцировать гипертензивные состояния различного генеза с помощью метаболомных биомаркеров сыворотки крови. Для крыс с ДОКА-солевой гипертонией характерно повышенное содержание холина. Гипертония, связанная с эндотелиальной дисфункцией, индуцированной введением L-NAME, сопровождалась снижением уровней тирозина, серина и глицина. Для крыс НИСАГ характерно повышение концентраций орнитина (цикл мочевины и оксида азота), валина, лейцина, изолейцина, мио-инозитола, глутамата, глутамина (метаболизм глюкозы).

Ключевые слова: артериальная гипертония, метаболом, биомаркеры, крысы НИСАГ, ДОКА-солевая гипертония, эндотелиальная дисфункция

DOI: 10.31857/S0044452924010021, **EDN:** ZGACPP

ВВЕДЕНИЕ

Ввиду разнообразия механизмов патогенеза артериальной гипертонии (АГ) возникает необ-

ходимость разработки персонализированной диагностики и терапии заболевания. Один из методов, которые позволяют комплексно оценить патологические изменения в организме — это метаболомное исследование. Метаболом рассматривается как совокупность низкомолекулярных веществ (метаболитов), детектируемых в исследуемом образце. Знание о метаболических путях, лежащих в основе того или иного типа артериальной гипертонии, позволит более рационально проводить ее терапию [1].

Способы моделирования артериальной гипертонии для изучения особенностей различных гипертензивных состояний практически настолько же разнообразны, как патогенетические механиз-

Сокращения: АД — артериальное давление; АГ — артериальная гипертония; WAG — Wistar Albino Glaxo (линия крыс); НИСАГ — наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертония (линия крыс, также ISIAH — Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension); L-NAME — N ω -Nitro-L-arginine methyl ester; DOCA — deoxycorticosterone acetate; NMDA — N-methyl D-aspartate; eNOS — endothelial nitric oxide synthase; NO — nitric oxide, оксид азота; GPCR — G protein-coupled receptor; РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система; ацетил-KoA — ацетилкофермент А; SCFA — short-chain fatty acids; BCAA — branched-chain amino acids; IP3R — inositol trisphosphate receptor.

мы самого заболевания. Однако, можно выделить две основные группы: патофизиологические и генетические модели. К патофизиологическим моделям относятся, например, хирургические (перевязка почечной артерии), гормон-индуцированные (введение ангиотензина-II, кортикостероидов), индуцированные диетой (солевые нагрузки) и др. Генетические модели воспроизводят АГ, которая развивается либо спонтанно (линии крыс GH, SHR, SPSHR), либо в провокационной среде (солечувствительные крысы DS, соле-гормон-чувствительные крысы SBH, стресс-чувствительные крысы НИСАГ/ISIAH) [2]. В нашем исследовании были использованы три модели АГ: две патофизиологические модели АГ — ДОКА-солевая и вызванная введением L-NAME (ингибитора синтеза NO), и одна генетическая модель — крысы линии НИСАГ/ISIAH).

ДОКА-солевая гипертония — это модель АГ, вызванной солевой нагрузкой и введением синтетического минералокортикоида — дезоксикортикостерона ацетата (DOCA). Гипертензивные состояния, связанные с гиперпродукцией минералокортикоидов и задержкой соли, являются одной из причин формирования гипертензивного статуса у людей [3]. Также одним из важных механизмов развития гипертонической болезни является эндотелиальная дисфункция с нарушениями продукции оксида азота, воспроизводимого в нашей модели АГ путем введения L-NAME [4]. Крысы линии НИСАГ/ISIAH (наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертония/ Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension) получена путем многолетней генетической селекции на повышение АД в условиях эмоционального стресса из аутбредной популяции крыс Вистар [5]. Значение эмоционального стресса как важнейшего фактора патогенеза гипертонической болезни хорошо документировано [6–9].

Цель данного исследования — определить метаболомные биомаркеры, специфические для трёх изучаемых моделей АГ, соответствующих аналогичным формам гипертонической болезни человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Исследование было проведено на 3–4-месячных самцах крыс, по 10 в каждой группе. Всего групп было четыре: 1) контрольные нормотензивные крысы линии WAG (Wistar Albino Glaxo); 2) крысы линии НИСАГ (ISIAH) с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией; 3) крысы с артериальной гипертонией, связанной с эндотелиальной дисфункцией (вве-

дение ингибитора эндотелиальной NO-синтазы — L-NAME); 4) крысы с артериальной гипертонией, индуцированной введением дезоксикортикостерона в сочетании с солевой нагрузкой (ДОКА-солевая гипертония). Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН, получали полнорационный корм (“Чара”, Россия) и питьевую воду *ad libitum*.

Фармакологически индуцированная артериальная гипертония

Моделирование гипертензивных состояний осуществляли с помощью фармакологического воздействия, руководствуясь протоколами, опубликованными ранее другими исследователями [10, 11]. Для моделирования гипертонии, связанной с эндотелиальной дисфункцией, крысам линии WAG перорально вводили раствор ингибитора эндотелиальной NO-синтазы (L-NAME, N^o-Nitro-l-arginine methyl ester, N-омера-нитро-L-аргинин метиловый эфир; Sigma Aldrich, США) в дозе 30 мг/кг массы тела в течение двух недель [10]. Для получения ДОКА-солевой гипертонии крысам линии WAG подкожно вводили DOCA (deoxycorticosterone acetate, дезоксикортикостерона ацетат; Sigma Aldrich, США) в дозе 25 мг/кг массы тела раз в 4 дня на фоне постоянной солевой нагрузки — 1% раствор NaCl в поилках — в течение трёх недель [11]. На протяжении всего эксперимента гипертензивный статус животных контролировали с помощью регулярных измерений АД. Кроме того, в течение недели перед забором образцов крови ежедневно регистрировали показатели потребления корма и выделения фекалий с использованием индивидуальных метаболомических клеток для грызунов (Tecniplast, Италия).

Мониторинг артериального давления (АД) и получение сыворотки крови

АД измеряли два раза в неделю с использованием прибора для неинвазивного измерения АД (БИОРАС, США) методом tail-cuff (с помощью хвостовой манжеты). При измерении АД также контролировали динамику массы тела животных. Образцы сыворотки крови получали при эвтаназии экспериментальных животных методом декаптации (забор крови у всех крыс производили в одно и то же время суток, животные в течение всего эксперимента получали воду и корм *ad libitum*). Собранную периферическую кровь отстаивали в течение 1 часа для формирования первичного сгустка, затем центрифугировали (+4°C, 3000 об/мин, 20 мин), полученную сыворотку крови хранили

при -70°C . Далее исследование образцов проводилось в ЦКП “Масс-спектрометрические исследования” Международного томографического центра СО РАН.

Экстракция метаболитов из образцов сыворотки крови

Для получения небелкового экстракта метаболитов сыворотки крыс использовали подобранные на основе проведенных ранее исследований [12] оптимальное соотношение объемов сыворотки и экстрагирующего раствора: сыворотка/метанол/хлороформ = 1/1/1. Образцы экстрагировали при -20°C в течение 30 мин, затем центрифугировали ($+4^{\circ}\text{C}$, 12000 об/мин, 30 мин) и отбирали надосадочную жидкость. Супернатант был высушен на вакуумном испарителе и хранился при -70°C .

Количественный метаболомный анализ образцов сыворотки крови крыс (ЯМР-спектроскопия)

Высушенные экстракты растворяли в дейтерированном фосфатном буфере (0.05 М, pH 7.4), содержащем натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропан-сульфокислоты (DSS, 20 мкМ) в качестве внутреннего стандарта. Спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре AVANCE III HD600 МГц (Bruker BioSpin, Германия), оснащённом зондом TXI 1H-13C/15N/D ZGR5 мм. Спектры были получены с использованием одноимпульсной последовательности zgpg с подавлением сигнала воды, время сбора данных 6.7 с. Спектры для каждого образца регистрировали путем суммарного накопления 64 спектров.

Анализ полученных данных

Для обработки спектров применялась программа MestReNova v12.0. Идентификация метаболитов проводилась с использованием Human Metabolome Database и собственных данных о метаболомном составе биологических жидкостей человека и животных [13]. Концентрации метаболитов в раство-

ре определялись путем интегрирования сигналов в спектре относительно сигнала DSS, а затем пересчитывались в значения концентраций в сыворотке крови (в единицах нмоль/мл). Полученные концентрации метаболитов анализировали с применением R-Studio и пакета программ Statistica 12: непараметрические критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Значения при $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Данные на графиках приведены в виде медиан с указанием границ первого и третьего квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование фармакологически индуцированной артериальной гипертензии привело к повышению АД с 134.3 ± 1.42 до 192.0 ± 2.96 мм. рт. ст. у группы L-NAME, с 137.5 ± 1.07 до 184.2 ± 1.19 мм. рт. ст. у группы DOCA. АД крыс НИСАГ (ISIAH) составляло 205.9 ± 2.12 мм.рт.ст., АД контрольных нормотензивных крыс WAG — 135.9 ± 1.21 мм. рт. ст. Масса тела экспериментальных животных, а также уровни потребления корма и выделения фекалий не имели достоверных отличий (табл. 1).

Метаболизм холина

Концентрация холина значительно повышена в сыворотке крови крыс с ДОКА-солевой гипертензией (рис. 1). Холин выполняет в организме многочисленные функции: является предшественником нейромедиатора ацетилхолина, входит в состав клеточных мембран, участвует в метаболизме липидов [14]. В митохондриях холин преобразуется в бетаин, который участвует в метилировании гомоцистеина с образованием метионина; бетаин, в свою очередь, превращается в диметилглицин [15]. Также холин является основным продуктом фосфолипазы D [16], которая участвует в механизмах воспаления и дестабилизации коронарной бляшки [17]. Повышенный уровень холина в плазме ассоциирован с риском возникновения острого коронарного синдрома [18].

Таблица 1. Физиологические параметры (АД, масса тела, потребление корма, выделение фекалий) экспериментальных животных в день забора образцов сыворотки крови

Физиологические параметры	Группы животных			
	WAG	ISIAH	L-NAME	DOCA
АД, мм.рт.ст.	135.9 ± 1.21	205.9 ± 2.12	192.0 ± 2.96	184.2 ± 1.19
Масса тела, г	325.16 ± 6.17	323.35 ± 5.76	324.45 ± 4.35	328.2 ± 6.18
Суточное потребление корма, г	16.0 ± 1.5	15.3 ± 0.9	17.3 ± 1.36	15.8 ± 0.6
Суточное выделение фекалий, г	6.67 ± 0.42	7.67 ± 0.43	7.70 ± 0.50	7.10 ± 0.18

Данные приведены в виде Mean $\pm$ SEM.

Биомаркеры почечной дисфункции

У всех трёх гипертензивных групп животных наблюдается сниженный уровень триптофана по сравнению с нормотензивным контролем (рис. 1). Триптофан — незаменимая аминокислота, метаболизм которой в организме происходит по трём путям: индольному, кинурениновому и серотониновому. Метаболиты индольного и кинуренинового путей участвуют в образовании активных форм кислорода, способствуя индукции оксидативного стресса и обострению воспаления [19]. В когорте больных, у которых впервые диагностировали различные сердечно-сосудистые заболевания, было обнаружено снижение уровней триптофана и кинуренина в плазме крови [20]. Снижение концентрации триптофана в сыворотке крови наблюдалось у больных с хронической почечной недостаточностью — при этом концентрации метаболитов кинуренинового пути были повышены [21]. Было показано, что производные триптофана, образующиеся в кишечнике, являются лигандами Ah-рецептора [22]. Ah-рецептор модулирует действие Т-хелперов 17 типа, участвующих в развитии гипертонии на фоне повышенной солевой нагрузки [23].

Метаболизм тирозина

Из фенилаланина под действием фермента фенилаланингидроксилазы образуется тирозин, который, в свою очередь, под действием тирозингидроксилазы превращается в дигидроксифенилаланин (ДОФА) — начальное звено в синтезе катехоламинов. Катехоламины (дофамин, адреналин, норадреналин) играют заметную роль в регуляции АД, воздействуя как на сократимость сосудов, так и на реабсорбцию натрия в почке [24, 25]. Наиболее выраженные изменения в метаболизме тирозина по сравнению с нормотензивным контролем наблюдаются у крыс с моделированной эндотелиальной дисфункцией (L-NAME) — снижение концентраций фенилаланина и тирозина (рис. 1).

Метаболизм глицина

У крыс группы L-NAME по сравнению с контролем достоверно снижены концентрации глицина и серина в сыворотке крови (рис. 2). L-серин под действием гидроксиметилтрансферазы превращается в глицин, а также может

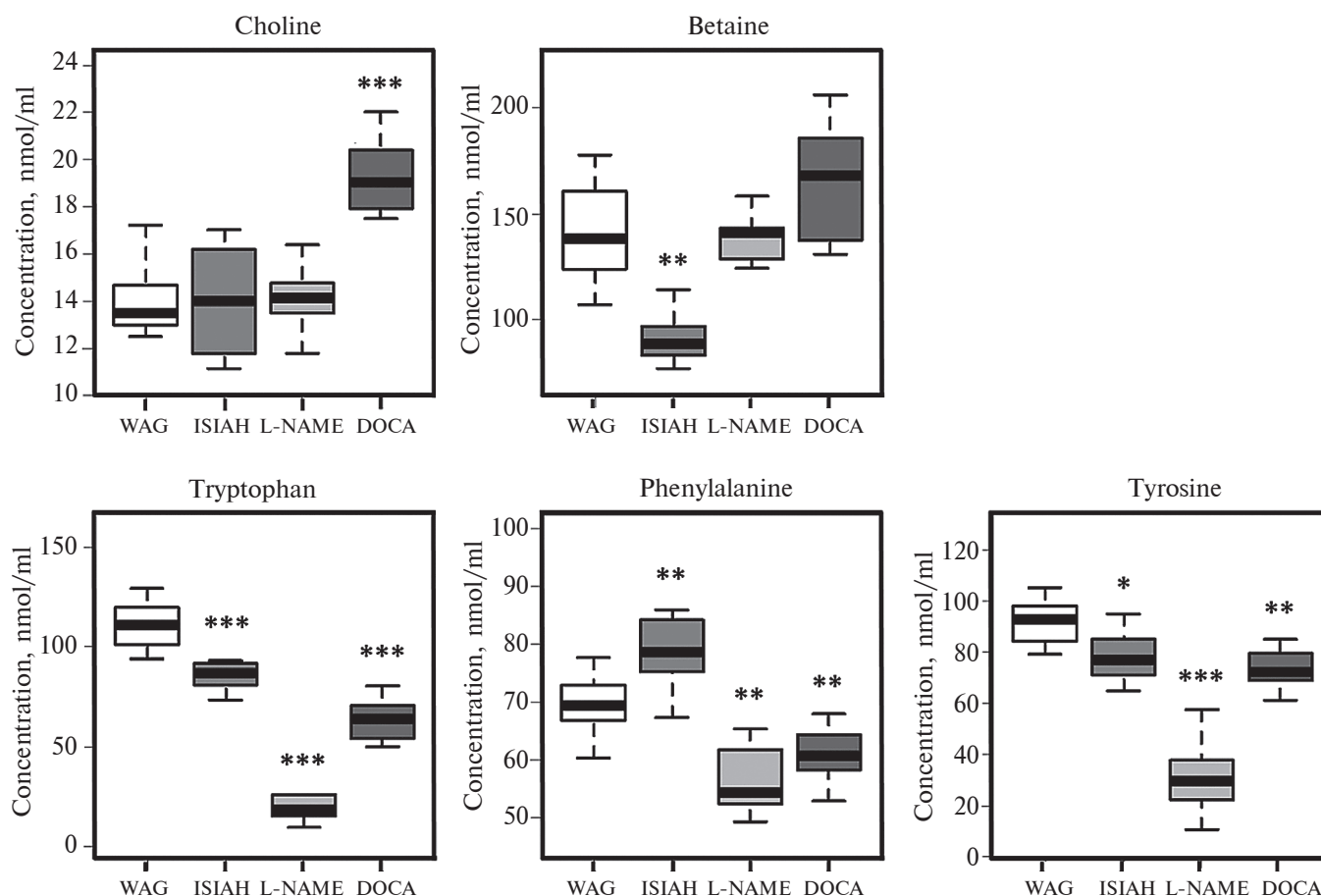


Рис. 1. Межгрупповые различия (ISIAH, L-NAME, DOCA vs WAG) в концентрациях метаболитов, связанных с метаболизмом холина (холин, бетаин), с почечной функцией (триптофан), с метаболизмом тирозина (фенилаланин, тирозин). Критерий Манна–Уитни, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$.

находиться *in vivo* в другом изомерном состоянии — в виде D-серина [26]. Как глицин, так и D-серин являются коагонистами ионотропных NMDA-рецепторов и, активируя их совместно с глутаматом, способствуют вазодилатации за счёт увеличения продукции оксида азота эндотелиальной NO-синтазой eNOS [27, 28].

Цикл Кребса

Группы L-NAME и DOCA отличаются пониженными концентрациями цитрата и сукцината (рис. 2). Сукцинат может связываться с рецептором, сопряжённым с G-белком (GPR91), активируя РААС и вызывая повышение АД [29]. Связь цитрата крови с регуляцией АД не настолько оче-

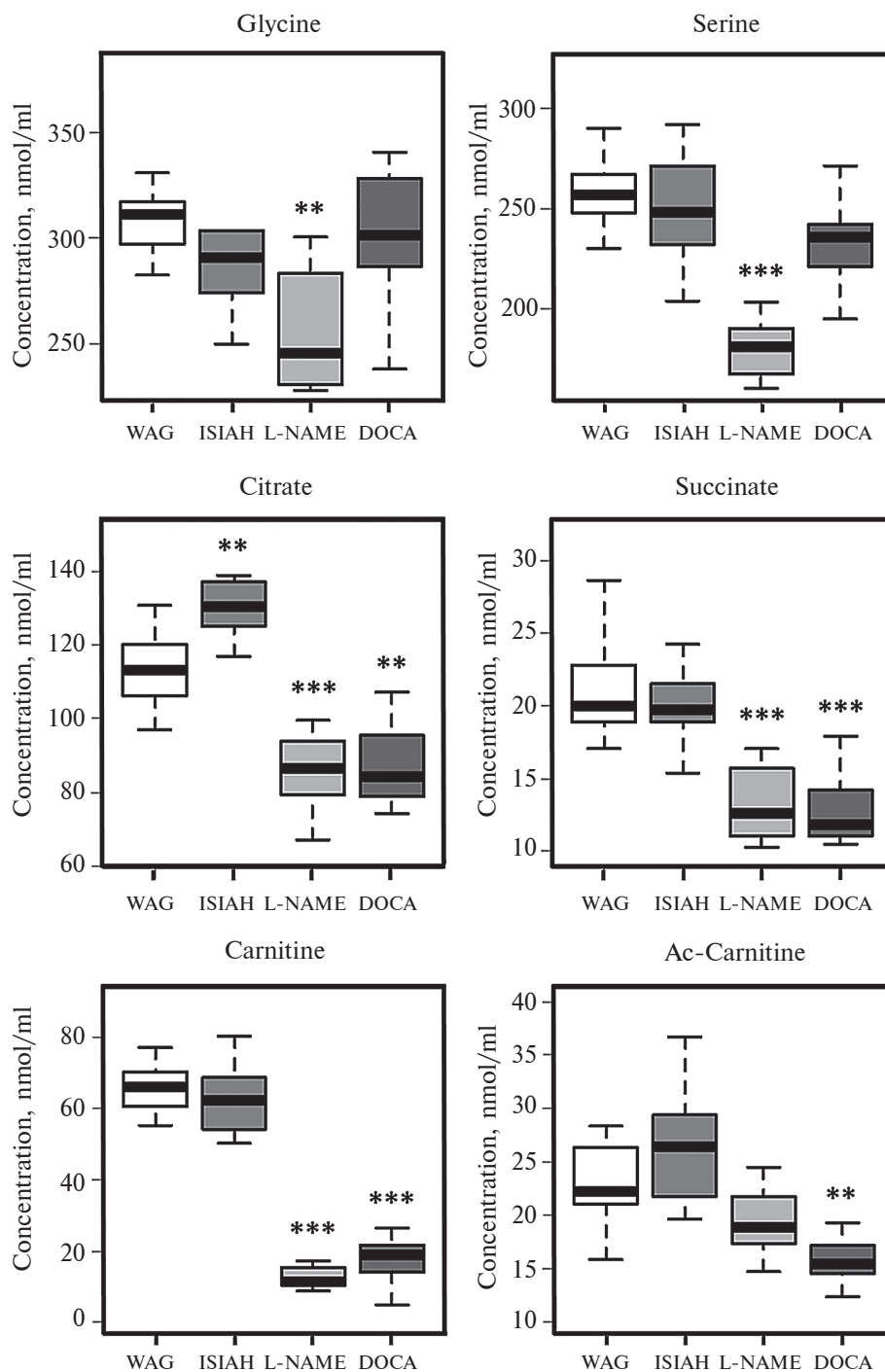


Рис. 2. Межгрупповые различия (ISIAH, L-NAME, DOCA vs WAG) в концентрациях метаболитов, связанных с метаболизмом глицина (глицин, серин), циклом Кребса (цитрат, сукцинат), с окислительным метаболизмом (карнитин, ацетилкарнитин).

Критерий Манна–Уитни, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$.

видна: исследователи отмечали снижение его уровня в моче крыс SHR со спонтанной гипертензией, связывая это с нарушением кислотно-щелочного баланса [30, 31].

Окислительный метаболизм

Крысы, которым вводили DOCA, имеют пониженные по сравнению с крысами линии WAG концентрации карнитина и ацетилкарнитина (рис. 2). L-карнитин принимает участие в окислении длинноцепочечных жирных кислот, взаимодействуя с ацетил-КоА с образованием ацетилкарнитина [32].

Метаболиты микробиоты кишечника

Обнаруживаемые в крови короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA, short-chain fatty acids) и их производные — формиаты, ацетаты, бутираты, изобутираты, валераты — в основном являются побочными продуктами метаболизма кишечной микробиоты. Их участие в регуляции АД может осуществляться через рецепторы, сопряжённые с G-белком — Gpr41, Gpr43, Gpr109a, Olfr78 [33], либо эпигенетически — ацилирование короткоцепочечных жирных кислот модифицирует гистоны и регулирует гены, ответственные в том числе за развитие метаболического синдрома и регуляцию АД [34]. Группа крыс НИСАГ/ИСИАН отличается от нормотензивного контроля повышенным содержанием изобутирата (рис. 3).

Цикл мочевины и оксида азота

Аспартат в цикле мочевины превращается в аргинин, который затем либо под действием NO-синтазы образует оксид азота, либо с помощью аргиназы распадается с образованием мочевины и орнитина. Орнитин затем может под действием карбамоилтрансферазы превращаться в цитруллин, который вместе с аспартатом снова может образовать аргинин. Концентрация орнитина достоверно повышена в сыворотке крови крыс НИСАГ (рис. 4).

Метаболизм глутамата

Орнитин также является продуктом метаболизма глутамата, который образуется в митохондриях из глутамина. Глутамин является важным источником аммиака, который образуется при его дезаминировании до глутамата — таким образом, глутамин участвует в поддержании кислотно-щелочного баланса [35]. Глутамат, связываясь с NMDA-рецепторами, усиливает уязвимость β -клеток поджелудочной железы при повышенном

уровне глюкозы [36], а повышенная концентрация глутамата в плазме крови ассоциирована с диабетом 2 типа [37]. Концентрации глутамата и глутамина достоверно повышены в сыворотке крови крыс НИСАГ по сравнению с контрольной группой WAG (рис. 4).

Метаболизм глюкозы

Как видно из рис. 5, у крыс НИСАГ по сравнению с остальными экспериментальными группами повышены концентрации валина, лейцина, изолейцина в сыворотке крови: это так называемые протеиногенные аминокислоты с разветвленным строением алифатической боковой цепи (BCAA, branched-chain amino acids). Они принимают участие в метаболизме глюкозы, активируя комплекс mTORC1, который фосфорилирует субстрат инсулинового рецептора IRS-1 [38, 39]. Также лейцин, изолейцин и валин участвуют в гипоталамической регуляции метаболизма глюкозы в печени [40]. Глюкоза и её метаболит глицерол имеют пониженные концентрации в сыворотке крови крыс, которым вводили L-NAME и DOCA. У крыс НИСАГ/ИСИАН по сравнению с остальными группами достоверно повышен уровень миоинозитола — миметика инсулина, эффективно снижающего уровень глюкозы после приёма пищи [41]. Миоинозитол также может участвовать в регуляции АД путём воздействия на инозитолтрифосфатные рецепторы (IP3R). Активация IP3R рецепторов приводит к высвобождению ионов Ca^{2+} в гладкомышечных стенках сосудов, увеличивая их сократимость [42].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Крысы с ДОКА-солевой гипертензией отличались повышенной концентрацией холина. Ввиду многообразия биологических функций холина дать однозначную интерпретацию на основе имеющихся данных затруднительно. Показано, что метаболизм холина связан с активацией протеинкиназы C и макрофагальным воспалением [43]. В пользу гипотезы о роли воспаления в патогенезе ДОКА-солевой гипертензии говорит то, что введение ингибиторов инфильтрации уменьшало сердечный фиброз у крыс с данной моделью гипертензии [44, 45]. В продолговатом мозге крыс с ДОКА-солевой гипертензией была обнаружена повышенная холинергическая активность, которую исследователи связали с активностью симпатической нервной системы [46].

Гипертензивный статус крыс с индуцированной введением L-NAME эндотелиальной дисфункцией характеризовался сниженными концентрациями тирозина, серина и глицина в сыворотке кро-

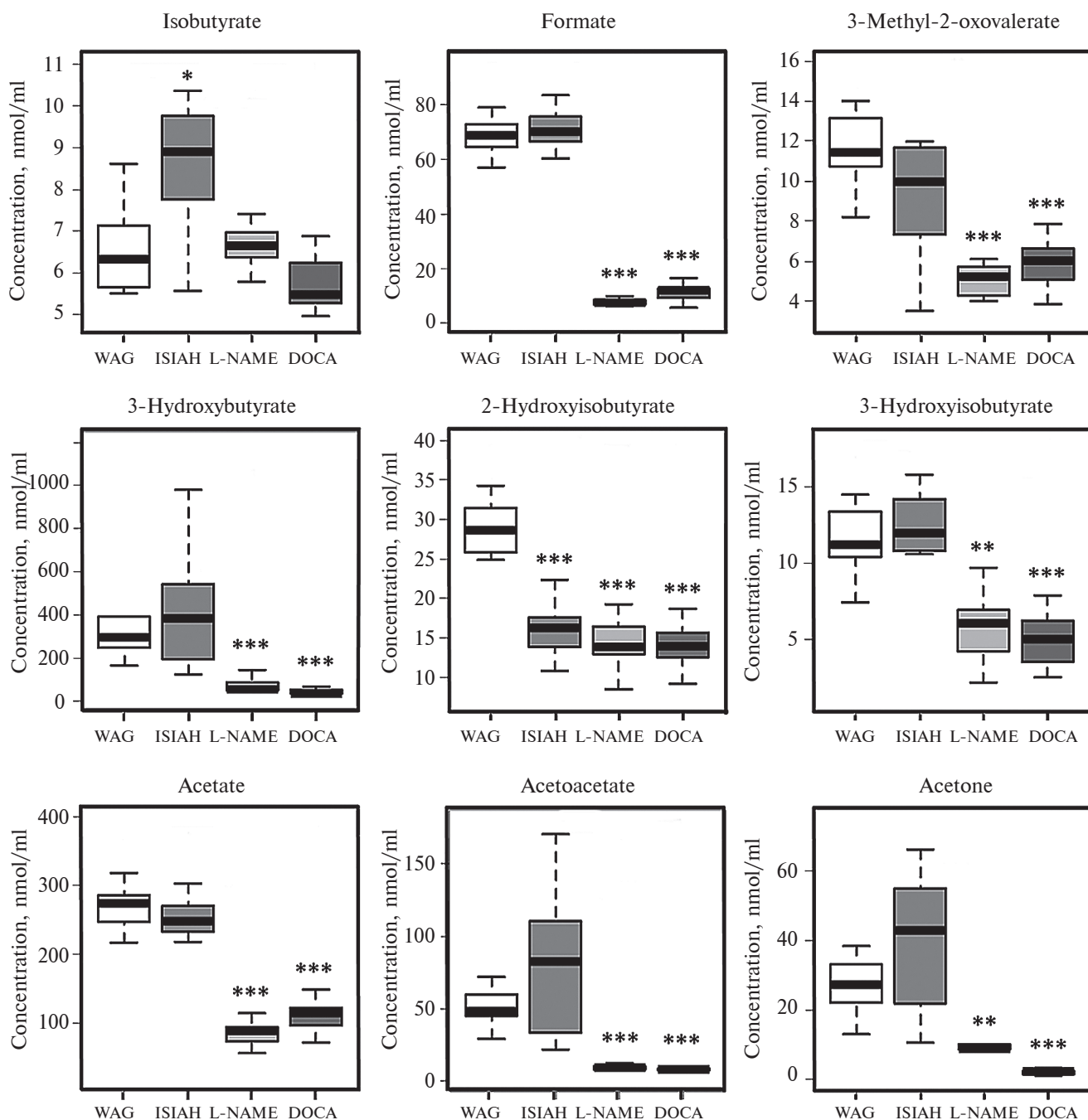


Рис. 3. Межгрупповые различия (ISIAH, L-NAME, DOCA vs WAG) в концентрациях метаболитов, связанных с деятельностью микробиоты кишечника (изобутират, формиат, 3-метил-2-оксoвалерат, 3-гидроксибутират, 2-гидроксиизобутират, 3-гидроксиизобутират, ацетат, ацетоацетат, ацетон). Критерий Манна–Уитни, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

ви. Показано, что в плазме крыс, получавших L-NAME, повышены концентрации катехоламинов (дофамин, адреналин, норадреналин) и их производных (дигидроксифенилуксусная кислота, дигидроксифенил гликоль) – и в условиях стресса концентрации адреналина, дигидроксифенилуксусной кислоты и дигидроксифенил гликоля возрастают ещё больше [47]. Это согласуется со снижением содержания в крови тирозина, ко-

торый является предшественником всех катехоламинов.

Серин и глицин также можно рассматривать в качестве биомаркеров: в подробном исследовании, посвящённом механизмам их действия на уровень АД крыс с L-NAME-гипертензией и SHR, было обнаружено, что глицин оказывает двоякий эффект, воздействуя на NMDA-рецепторы: снижает АД у нормотензивного контроля, но повышает

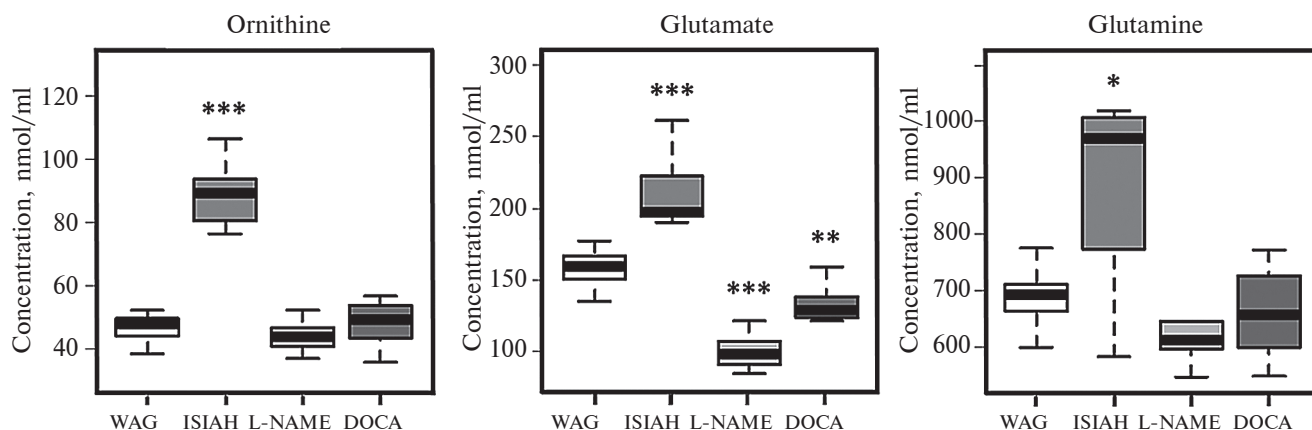


Рис. 4. Межгрупповые различия (ISIAH, L-NAME, DOCA vs WAG) в концентрациях метаболитов, связанных с циклом мочевины и оксида азота (орнитин), а также глутамата и глутамина. Критерий Манна–Уитни, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

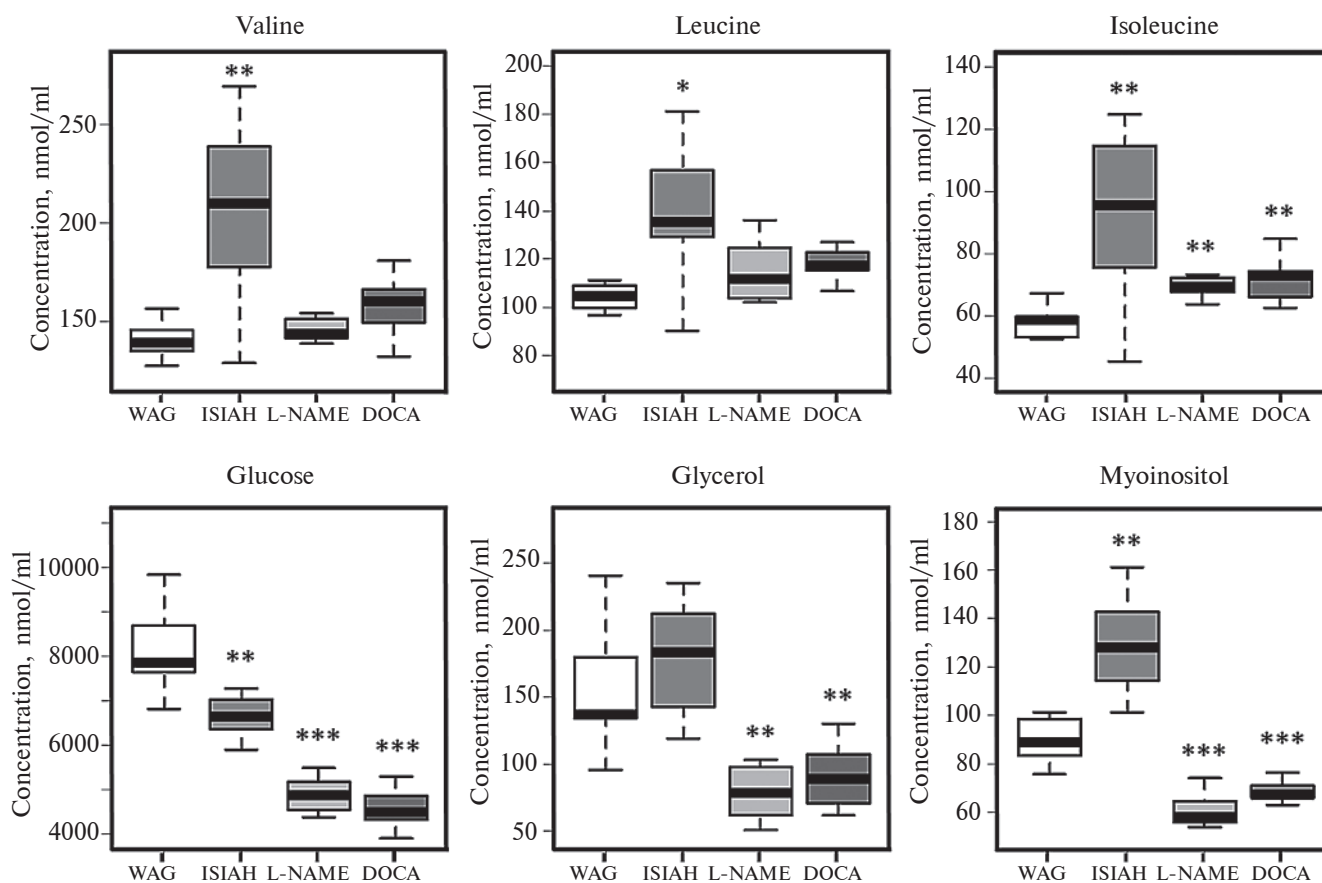


Рис. 5. Межгрупповые различия (ISIAH, L-NAME, DOCA vs WAG) в концентрациях метаболитов, связанных с метаболизмом глюкозы (валин, лейцин, изолейцин, глюкоза, глицерол, мио-инозитол). Критерий Манна–Уитни, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

ет его у гипертензивных крыс. L-серин же в данном случае действовал без участия NMDA-рецепторов, а через активируемые кальцием калиевые каналы, понижая АД у всех исследуемых животных [48].

Повышенная концентрация орнитина в крови крыс НИСАГ может свидетельствовать о преобладании активности аргиназы над активностью

НО-синтазы. Показано, что ингибирование аргиназы с помощью норвалина приводило к снижению АД у крыс НИСАГ [49].

Повышенные у крыс НИСАГ концентрации лейцина, изолейцина, валина, мио-инозитола, глутамата и глутамина, вероятнее всего, связаны с нарушением метаболизма глюкозы и инсулиноре-

зистентностью. У гипертензивных крыс НИСАГ по сравнению с крысами Wistar понижен уровень иммунореактивного инсулина при высокой концентрации свободных жирных кислот в крови, снижена толерантность к глюкозе, наблюдаются изменения в метаболизме глюкозы и липидов: в печени повышена активность гексогеназы, но снижено содержание гликогена [50]. Высокие концентрации изобутирата, ацетоацетата и ацетона можно отнести к активности кишечной микробиоты, однако прямых доказательств их влияния на уровень АД у крыс НИСАГ на данный момент нет.

Таким образом, проведённый метаболомный анализ дал возможность дифференцировать гипертензивные состояния различного генеза с помощью характерных биомаркеров сыворотки крови. ДОКА-солевую гипертензию отличает повышение концентрации холина. Артериальная гипертензия, связанная с эндотелиальной дисфункцией, индуцированной введением L-NAME, характеризуется сниженными уровнями тирозина, серина и глицина, что свидетельствует о нарушении баланса синтеза катехоламинов и изменении регуляции сократимости стенок сосудов. Для наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензии крыс НИСАГ характерны нарушения цикла мочевины и оксида азота (повышенный уровень орнитина), нарушения метаболизма глюкозы (маркеры — валин, лейцин, изолейцин, мио-инозитол, глутамат, глутамин).

БЛАГОДАРНОСТИ

Разведение и содержание животных осуществлялось в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН (бюджетный проект РФ FWNР-2022—0019). Метаболомные исследования проводились в ЦКП “Масс-спектрометрические исследования” Международного томографического центра СО РАН.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А.Л.М., Ю.П.Ц., М.А.Г. — концепция и руководство работой; А.А.С., Л.В.Я., А.А.С., Ю.К.П. — проведение экспериментов; А.А.С., Л.В.Я., А.Л.М., М.А.Г. — обсуждение результатов исследования; А.А.С. и А.А.С. — написание текста; А.Л.М. и Ю.П.Ц. — редактирование текста статьи.

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, утвержден-

ным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Межинститутской комиссии по биологической этике при Институте цитологии и генетики СО РАН (протокол № 127 от 08.09.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22—25—20025) совместно с Министерством науки Новосибирской области (соглашение № р-36 от 06.04.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Byrd JB (2016) Personalized medicine and treatment approaches in hypertension: current perspectives. *Integr Blood Press Contr* 9: 59—67. <https://doi.org/10.2147/IBPC.S74>
2. De Jong W, Birkenhäger WH, Reid JL (Eds) (2013) *Experimental and Genetic Models of Hypertension*. Handbook of Hypertension, Elsevier.
3. Schenk J, McNeill JH (1992) The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Meth* 27(3): 161—170. [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(92\)90036-Z](https://doi.org/10.1016/1056-8719(92)90036-Z)
4. Küng CF, Moreau P, Takase H, Lüscher TF (1995) L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta: prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension* 26(5): 744—751. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.26.5.744>
5. Markel AL (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. In *Genetic Hypertension*. (Ed.J. Sassard), Colloque INSERM John Libbey Eurotext Ltd 218: 405—407.
6. Redina OE, Markel AL (2018) Stress, genes, and hypertension. Contribution of the ISIAH rat strain study. *Curr Hyperten Rep* 20: 1—10. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0870-2>
7. Kulkarni S, O'Farrell I, Erasi M, Kochar MS (1998) Stress and hypertension. *Wisconsin Med J* 97(11): 34—38.
8. Hudzinski LG, Frohlich ED, Holloway RD (1988) Hypertension and stress. *Clin Cardiol* 11(9): 622—626. <https://doi.org/10.1002/clc.4960110906>
9. Freeman ZS (1990) Stress and hypertension — critical review. *Med J Austral* 153(10): 621—625. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1990.tb126276.x>
10. Fürstenau CR, da Silva Trentin D, Gossenheimer AN, Ramos DB, Casali EA, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JFF (2008) Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cell Mol Diseases* 41(2): 223—229. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2008.04.009>

11. Chan V, Hoey A, Brown L (2006) Improved cardiovascular function with aminoguanidine in DOCA-salt hypertensive rats. *British J Pharmacol* 148(7): 902–908. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706801>
12. Snytnikova OA, Khlichkina AA, Sagdeev RZ, Tsentlovich YP (2019) Evaluation of sample preparation protocols for quantitative NMR-based metabolomics. *Metabolomics* 15: 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1545-y>
13. Zelentsova EA, Yanshole LV, Snytnikova OA, Yanshole VV, Tsentlovich YP, Sagdeev RZ (2016) Post-mortem changes in the metabolomic compositions of rabbit blood, aqueous and vitreous humors. *Metabolomics* 12: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1118-2>
14. Hollenbeck CB (2012) An introduction to the nutrition and metabolism of choline. *Central Nervous Syst Agent Med Chem* 12(2): 100–113. <https://doi.org/10.2174/187152412800792689>
15. Corbin KD, Zeisel SH (2012) Choline metabolism provides novel insights into non-alcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol* 28(2): 159. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834e7b4b>
16. Morris AJ, Frohman MA, Engebrecht J (1997) Measurement of phospholipase D activity. *Analyt Biochem* 252(1): 1–9. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2299>
17. O'Brien KD, Pineda C, Chiu WS, Bowen R, Deeg MA (1999) Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D is expressed by macrophages in human atherosclerosis and colocalizes with oxidation epitopes. *Circulation* 99(22): 2876–2882. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.22.2876>
18. Danne O, Möckel M, Lueders C, Mügge C, Zschunke GA, Lufft H, Müller C, Frei U (2003) Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes. *American J Cardiol* 91(9): 1060–1067. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(03\)00149-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(03)00149-8)
19. Kwiatkowska I, Hermanowicz JM, Mysliwiec M, Pawlak D (2020) Oxidative storm induced by tryptophan metabolites: missing link between atherosclerosis and chronic kidney disease. *Oxidat Med Cell Longevity* ID6656033. <https://doi.org/10.1155/2020/6656033>
20. Konje VC, Rajendiran TM, Bellovich K, Gadegbeku CA, Gipson DS, Afshinnia F, Mathew AV (2021) Tryptophan levels associate with incident cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Kidney J* 14(4): 1097–1105. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa031>
21. Saito K, Fujigaki S, Heyes MP, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M (2000) Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. *Am J Physiol-Renal Physiol* 279(3): F565–F572. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F565>
22. Roager HM, Licht TR (2018) Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Communicat* 9(1): 3294. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05470-4>
23. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomeus H, Müller DN (2017) Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* 551(7682): 585–589. <https://doi.org/10.1038/nature24628>
24. Guimarães S, Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological reviews* 53(2): 319–356.
25. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78(1): 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
26. De Koning TJ, Klomp LW (2004) Serine-deficiency syndromes. *Curr Opin Neurol* 17(2): 197–204. <https://doi.org/10.1097/00019052-200404000-00019>
27. Brawley L, Torrens C, Anthony FW, Itoh S, Wheeler T, Jackson AA, Clough GF, Poston L, Hanson MA (2004) Glycine rectifies vascular dysfunction induced by dietary protein imbalance during pregnancy. *J Physiol* 554(2): 497–504. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.052068>
28. Le Maistre JL, Sanders SA, Stobart MJ, Lu L, Knox JD, Anderson HD, Anderson CM (2012) Coactivation of NMDA receptors by glutamate and D-serine induces dilation of isolated middle cerebral arteries. *J Cerebr Blood Flow Metabol* 32(3): 537–547. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.161>
29. Sadagopan N, Li W, Roberds SL, Major T, Preston GM, Yu Y, Tones MA (2007) Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens* 20(11): 1209–1215. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2007.05.010>
30. Akira K, Masu S, Imachi M, Mitome H, Hashimoto M, Hashimoto T (2008) ¹H NMR-based metabolomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats. *J Pharmaceut Biomed Anal* 46(3): 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.017>
31. Lucas PA, Lacour B, McCarron DA, Drüeke T (1987) Disturbance of acid-base balance in the young spontaneously hypertensive rat. *Clin Sci* 73(2): 211–215. <https://doi.org/10.1042/cs0730211>
32. Carrero JJ, Grimbale RF (2006) Does nutrition have a role in peripheral vascular disease? *British J Nutrit* 95(2): 217–229. <https://doi.org/10.1079/BJN20051616>
33. Pluznick JL (2017) Microbial short-chain fatty acids and blood pressure regulation. *Current hypertension reports* 19: 1–5. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0722-5>
34. Chen XF, Chen X, Tang X (2020) Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases. *Clin Sci* 134(6): 657–676. <https://doi.org/10.1042/CS20200128>
35. Gstraunthaler G, Holcomb T, Feifel E, Liu W, Spitaler N, Curthoys NP (2000) Differential expression and acid-base regulation of glutaminase mRNAs in gluconeogenic LLC-PK(1)-FBPase(+) cells. *Am J Physiol* 278: F227–F237. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.2.F227>
36. Huang XT, Li C, Peng XP, Guo J, Yue SJ, Liu W, Zhao FY, Han JZ, Huang YH, Li Y, Cheng QM, Zhou ZG, Chen C,

- Feng DD, Luo ZQ (2017) An excessive increase in glutamate contributes to glucose-toxicity in β -cells via activation of pancreatic NMDA receptors in rodent diabetes. *Scientif rep* 7(1): 44120. <https://doi.org/10.1038/srep44120>
37. Liu X, Zheng Y, Guasch-Ferré M, Ruiz-Canela M, Toledo E, Clish C, Liang L, Razquin C, Corella D, Estruch R, Fito M, Gómez-Gracia E, Arós F, Ros E, Lapetra J, Fiol M, Serra-Majem L, Papandreou C, Martínez-González MA, Hu FB, Salas-Salvadó J (2019) High plasma glutamate and low glutamine-to-glutamate ratio are associated with type 2 diabetes: case-cohort study within the PREDIMED trial. *Nutrit Metabol Cardiovascul Dis* 29(10): 1040–1049. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.06.005>
 38. Yoshizawa F (2012) New therapeutic strategy for amino acid medicine: notable functions of branched chain amino acids as biological regulators. *J Pharmacol Sci* 118(2): 149–155. <https://doi.org/10.1254/jphs.11R05FM>
 39. Yoon MS (2016) The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. *Nutrients* 8(7): 405. <https://doi.org/10.3390/nu8070405>
 40. Arrieta-Cruz I, Su Y, Gutiérrez-Juárez R (2016) Suppression of endogenous glucose production by isoleucine and valine and impact of diet composition. *Nutrients* 8(2): 79. <https://doi.org/10.3390/nu8020079>
 41. Croze ML, Soulage CO (2013) Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie* 95(10): 1811–1827. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.011>
 42. Abou-Saleh H, Pathan AR, Daalis A, Hubrack S, Abou-Jassoum H, Al-Naeimi H, Rusch NJ, Machaca K (2013) Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor up-regulation in hypertension is associated with sensitization of Ca^{2+} release and vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 288(46): 32941–32951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.496802>
 43. Snider SA, Margison KD, Ghorbani P, LeBlond ND, O'Dwyer C, Nunes JR, Xu H, Bennett S, Fullerton MD (2018) Choline transport links macrophage phospholipid metabolism and inflammation. *J Biol Chem* 293(29): 11600–11611. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003180>
 44. Kagitani S, Ueno H, Hirade S, Takahashi T, Takata M, Inoue H (2004) Tranilast attenuates myocardial fibrosis in association with suppression of monocyte/macrophage infiltration in DOCA/salt hypertensive rats. *J Hypertens* 22(5): 1007–1015.
 45. Ishimaru K, Ueno H, Kagitani S, Takabayashi D, Takata M, Inoue H (2007) Fasudil attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of monocyte/macrophage infiltration in the heart of DOCA/salt hypertensive rats. *J Cardiovascul Pharmacol* 50(2): 187–194. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318064f150>
 46. Kubo T, Fukumori R, Kobayashi M, Yamaguchi H (1996) Enhanced cholinergic activity in the medulla oblongata of DOCA-salt hypertensive and renal hypertensive rats. *Hypertens Res* 19(3): 213–219. <https://doi.org/10.1291/hypres.19.213>
 47. Kvetňanský R, Pacák K, Tokarev D, Jeloková J, Ježová D, Rusnák M (1997) Chronic blockade of nitric oxide synthesis elevates plasma levels of catecholamines and their metabolites at rest and during stress in rats. *Neurochem Res* 22: 995–1001. <https://doi.org/10.1023/A:1022426910111>
 48. Mishra RC, Tripathy S, Quest D, Desai KM, Akhtar J, Dattani ID, Gopalakrishnan V (2008) L-Serine lowers while glycine increases blood pressure in chronic L-NAME-treated and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 26(12): 2339–2348. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328312c8a3>
 49. Gilinsky MA, Polityko YK, Markel AL, Latysheva TV, Samson AO, Polis B, Naumenko SE (2020) Norvaline reduces blood pressure and induces diuresis in rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *BioMed Res Internat* 2020: 4935386. <https://doi.org/10.1155/2020/4935386>
 50. Shorin IP, Markel AL, Seliatitskaia VG, Pal'chikova NA, Grinberg PM, Amstislavskii SI (1990) Endocrine-metabolic relations in rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Bull Exp Biol Med* 109(6): 768–770. <https://doi.org/10.1007/BF00841441>

SEARCH FOR METABOLOMIC MARKERS OF HYPERTENSIVE CONDITIONS OF DIFFERENT GENESIS: EXPERIMENTAL STUDY

A. A. Seryapina^{a, #}, A. A. Sorokoumova^a, Yu. K. Polityko^{a, c}, L. V. Yanshole^b,
Yu. P. Tsentalovich^b, M. A. Gilinsky^c, and A. L. Markel^{a, d}

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

^b Institute “International Tomographic Center”, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^c Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Neuroscience and Medicine”, Novosibirsk, Russia

^d Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

[#]E-mail: seryapina@bionet.nsc.ru

A personalized approach to the diagnosis and treatment of arterial hypertension requires a comprehensive analysis of the pathogenetic mechanisms underlying the disease. To determine specific metabolomic markers of various

hypertensive conditions, four groups of experimental animals were studied: WAG rats (normotensive control); ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension (AH); L-NAME-treated rats with hypertension induced by endothelial dysfunction; rats with hypertension caused by DOCA administration in combination with the salt loading. Rat blood serum samples were analyzed by NMR spectroscopy. The metabolomic analysis differentiated the hypertensive conditions of various origins using group-specific blood serum metabolomic biomarkers. Rats with DOCA-salt hypertension are characterized by increased concentration of choline. Hypertension associated with endothelial dysfunction induced by L-NAME administration was accompanied by a decrease in the levels of tyrosine, serine and glycine. Distinctive features of ISIAH rats are increased concentrations of ornithine (urea and nitric oxide cycle), valine, leucine, isoleucine, myo-inositol, glutamate, glutamine (glucose metabolism).

Key words: arterial hypertension, metabolome, biomarkers, ISIAH rats, DOCA-salt hypertension, endothelial dysfunction

СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ СПИННОГО МОЗГА ЛЯГУШКИ И УЧАСТИЕ 5-HT_{5A} РЕЦЕПТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ МИНИАТЮРНЫХ ГЛИЦИНЕРГИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПОЯСНИЧНЫХ МОТОНЕЙРОНОВ

© 2024 г. Н. М. Чмыхова^{1,*}, Д. С. Васильев¹, Н. П. Веселкин¹

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

* e-mail: nchmykhova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 18.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Роль серотониновых рецепторов 5-HT_{5A} в модуляции миниатюрной тормозной синаптической активности исследована с помощью внутриклеточной регистрации миниатюрных глицинергических тормозных постсинаптических потенциалов (глимТПСП) в мотонейронах поясничных сегментов изолированного спинного мозга лягушки *Rana ridibunda*. В среде, содержащей ТТх, CNQX, DAP5, bicuculline, аппликация агониста серотониновых рецепторов 5-СТ (10 мкМ) с высокой аффинностью к 5-HT_{5A} приводила к подавлению частоты на 86%, а также исчезновению высокоамплитудных глимТПСП (200–500 мкВ) при сохранении редких потенциалов амплитудой около 100 мкВ, что свидетельствует о возможности пре- и постсинаптического действия 5-СТ в такой концентрации, не исчерпывающегося его действием только на 5-HT_{5A} рецепторы. Добавление в среду метисергида, блокатора 5-HT_{1,2} рецепторов, снижало среднюю частоту глимТПСП на 67%, частоту высокоамплитудных событий в 5 раз и их среднюю амплитуду на 20%, что может свидетельствовать об участии 5-HT_{5A} рецепторов в пре- и постсинаптической модуляции в глимТПСП мотонейронов. Аппликация 1 мкМ 5-СТ приводила к уменьшению частоты глимТПСП на 49% без заметного изменения амплитуды глимТПСП, а последующее введение в раствор SB-699551, селективного антагониста 5-HT_{5A} рецепторов, увеличивало частоту событий на 41%, что подтверждает участие 5-HT_{5A} рецепторов в пресинаптической модуляции глимТПСП. Иммунофлуоресцентное исследование показало, что супра- и интраспинальные 5-HT⁺ ir нейроны дают обильные ветвления в поясничном отделе с возможностью образования аксосоматических контактов с мечеными мотонейронами и аксодендритных контактов на проксимальных и дистальных участках их дендритов. Также возможно образование контактов в перимедулярном сплетении, пронизанном дистальными дендритами мотонейронов и астроцитарными отростками. Это представляет структурную основу для пост-, пре- и экстрасинаптической модуляции активности мотонейронов серотином. Возможность постсинаптической модуляции активности мотонейронов через 5-HT_{5A} рецепторы подтверждает точечноподобная флуоресценция 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала на дендритах и телах меченых мотонейронов, который присутствует в нейропиле, но отсутствует в перимедулярном сплетении. Двойное мечение антителами к 5-HT_{5A} рецептору и Ca²⁺-связывающему белку, парвальбумину (PV+ir), выявило локализацию 5-HT_{5A}Rlike+ в миелиновой оболочке волокон дорсальных и вентромедиальных канатиков. На препаратах после длительной стимуляции вентральных корешков через всасывающие электроды при мечении мотонейронов биоцитином обнаружен яркий 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал в миелине моторных аксонов, дорсальнокорешковых волокон, входящих в мозг в области дорсального рога и отдельных волокон вентромедиального канатика. Обсуждается участие экстрасинаптических рецепторов 5-HT_{5A} в функционировании цепей обратной связи активности поясничных мотонейронов, с возможным участием в этих цепях глиальных элементов.

Ключевые слова: спинальный мотонейрон, серотонинергическая иннервация, 5-HT_{5A} рецептор, миниатюрная глицинергическая активность, лягушка

DOI: 10.31857/S0044452924010035, EDN: ZFYBEE

ВВЕДЕНИЕ

Функциональное значение семейств и подтипов серотониновых рецепторов, модулирующих моторный выход спинного мозга изучено недостаточно. Это касается 5-HT₅, одного из семейств се-

ротониновых рецепторов, обнаруженного в конце прошлого столетия [1]. Его два подтипа: 5-HT_{5A} R и 5-HT_{5B} R выявлены у грызунов, у человека описан только один – 5-HT_{5A} R [2–4]. По данным атласа протеинов человека (HRA – The version 21,

www.proteinatlas.org). экспрессия РНК 5-HT_{5A} рецептора присутствует в тормозных и возбуждающих нейронах, а также в глиальных клетках, причем наибольший базовый уровень экспрессии отмечен в мозжечке, наименьший — в спинном мозге.

Распределение 5-HT_{5A}R- like иммунореактивности в разных отделах мозга крысы было успешно картировано иммуногистохимически [5]. С помощью световой и электронной микроскопии в спинном мозгу крыс распределение 5-HT_{5A}R выявлено иммуноцитохимически [6, 7]. Доли с соавторами описано заметное присутствие 5-HT_{5A}R в нейронах дорсальных рогов и редкое — в немиелинизированных и миелинизированных волокнах в области входа дорсальных корешков в мозг. Ими высказана гипотеза, что рецепторы 5-HT_{5A} согласно их обильному распределению в нейронах поверхностных пластин дорсального рога, возможно участвуют в контроле ноцицепции. Кроме экспрессии 5-HT_{5A}R в дорсальных рогах спинного мозга показана экспрессия в дорсолатеральном моторном ядре поясничного сегмента L6. Слабая экспрессия рецептора выявлена во всех группах мотонейронов пластинки IX других сегментов и в интермедиолатеральной области, что предполагает постсинаптическое участие 5-HT_{5A}R в контроле моторных и вегетативных функций [6].

Известно, что успешная расшифровка функции рецепторов возможна с применением селективных лигандов. Ранее была установлена высокая аффинность агониста серотониновых рецепторов 5-СТ (5-carboxamidotryptamine) к 5-HT_{5A}R при изучении его путей сигнализации [3, 8–10], а позже были разработаны селективные антагонисты, SB699551 [11, 12] и ASP5736 [13]. Исследования боли на крысах в моделях с использованием формалинового и других тестов с параллельной оценкой экспрессии 5-HT_{5A}R в спинном мозгу и в спинномозговых ганглиях привели ряд авторов к констатации антиноцицептивной роли 5-HT_{5A}R [14–16]. В результате было сделано заключение, что 5-HT_{5A}R могут служить терапевтической мишенью для разработки анальгетиков.

Другой аспект изучения 5-HT_{5A}R — его функциональное значение при регуляции возбудимости в сенсомоторных цепочках, например, в слуховой цепи при реакции вздрагивания, испуга в ответ на звуковой стимул. Пластичность реакции вздрагивания обычно изучается с помощью определения преимпульсного торможения (PPI) [17]. Дефицит преимпульсного торможения связан с нарушениями обработки информации, особенно при шизофрении [18, 19]. Важно отметить, что при этом заболевании обнаружены вариации генов 5-HT_{5A} рецепторов, которые могут являться потенциальными клиническими мишенями [11, 20]. Сенсомоторные проявления участия 5-HT_{5A}R в регуляции

возбудимости в слуховой цепи успешно анализировались на низших позвоночных: фармакологические и электрофизиологические исследования функции 5-HT_{5A}R с тестированием поведения проводились *in vivo* на золотой рыбке [17]. Экспрессия 5-HT_{5A}R документирована в маутнеровском нейроне рыбки тилапии [21]. Однако вопросы функционирования 5-HT_{5A}R в нейронных цепях спинного мозга, в CPG (Central Pattern Generator) и их роль в модуляции активности мотонейронов остаются невыясненными.

Попытка раскрыть возможное участие 5-HT_{5A}R в модуляции тормозной глицинергической миниатюрной активности (глимТПСП) мотонейронов поясничного отдела спинного мозга предпринята нами на изолированном спинном мозге одного из представителей наземных тетрапод, взрослой озерной лягушки *Rana ridibunda*.

Мы выполняли исследование с помощью двух подходов: электрофизиологического с внутриклеточной регистрацией миниатюрных глицинергических тормозных постсинаптических потенциалов (глимТПСП) мотонейронов лягушки, модулируемых лигандами серотониновой передачи, и флуоресцентного иммуногистохимического для выявления серотонинергической иннервации, а также возможного присутствия в поясничных сегментах 5-HT_{5A}R.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиология

Электрофизиологические исследования совместно с фармакологическими тестами проводили на суперфузируемых поясничных сегментах изолированного спинного мозга взрослых озерных лягушек *Rana ridibunda*, животных обоего пола массой тела 70–160 г.

После эфирного наркоза животного проводили дорсальную ламинэктомию до зрительных бугров с непрерывным орошением по ходу операции физиологическим раствором, вырезали костную пластинку со спинным и продолговатым мозгом и погружали в предварительную камеру с охлажденным раствором, где высвобождали корешки 8–10-го поясничных сегментов. Затем переносили мозг в экспериментальную камеру. Поперечными разрезами выделяли сегменты толщиной около 2.5–3 мм, которые использовали последовательно. С помощью тонких иглол тестируемый срез фиксировали в камере с дном, покрытым силгардом, ростральной поверхностью вверх. Нормальный суперфузирующий раствор имел следующий состав в мМ: NaCl 98, KCl 2.0, NaHCO₃ 9.3, MgCl₂ 0.5, глюкоза 5, CaCl₂ 1.1, Трис (pH 7.4–7.6) и постоянно аэрировался карбогеном (98% O₂ и 2% CO₂). Температуру раствора в камере поддерживали в диапазоне 15–18 °C.

Внутриклеточное отведение от мотонейронов производили с помощью стеклянных микроэлектродов из боросиликатных трубочек (SUTTER INSTRUMENT), заполненных 3 М раствором KCl, с диаметром кончика 1–1.5 мкм и сопротивлением 10–20 МОм. Мотонейроны идентифицировали по антидромным потенциалам действия (АПД), вызываемым раздражением вентрального корешка (через всасывающий электрод одиночными стимулами (0.1 мс, 10–15 мкА)). Уровень мембранного потенциала покоя (МПП) измеряли цифровым вольтметром. Потенциалы регистрировали через аналогово-цифровой преобразователь на персональный компьютер с выхода микроэлектродного усилителя с автоматической стабилизацией нулевой линии, разработанного в лаборатории. Записывали пробеги длительностью 250 мс с частотой 1 с^{-1} при регистрации АПД (5–10 пробегов) и с частотой 3 с^{-1} при регистрации спонтанной (сПСП) и миниатюрной постсинаптической активности мотонейронов (мПСП) по 300 пробегов. Время отведений активности мотонейронов длилось от одного (в случае быстрого установления стабильных показаний МПП, до двух часов. Обусловленные спонтанным выделением медиаторов мПСП регистрировали в условиях блока проведения импульсов по пресинаптическим волокнам через 15–20 мин после добавления в суперфузирующий раствор 1.0 мкМ тетродотоксина (TTx). Затем для выделения тормозной фракции мПСП в раствор добавляли блокатор NMDA-рецепторов (D-AP5, 50 мкМ) и блокатор АМПА- и кинатных рецепторов (CNQX, 25 мкМ), таким образом исключая возбуждающую синаптическую активность, опосредованную глутаматом. Для выделения глимТПСП апплицировали бикикуллин (20 мкМ) – избирательный антагонист ГАМК_A-рецепторов, для идентификации глимТПСП – стрихнин (Str) (1 мкМ), блокатор глициновых рецепторов.

Для проведения работы использовали следующие вещества от фирмы Sigma (США): TTx, стрихнин – Str, серотонин, (5-hydroxytryptamine) – 5-НТ, (10 мкМ) и лиганды серотониновых рецепторов: агонист 5-НТ рецепторов – 5-СТ с высокой аффинностью к 5-НТ_{5A} рецептору (1 и 10 мкМ); высокоселективный антагонист 5-НТ_{5A} рецепторов – SB699551 (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}-4-biphenyl)methyl]propanamide dihydrochloride), (10 мкМ); антагонист 5-НТ_{1,2} рецепторов – метисергидмалеат (MS) [8β(S)]-9,10-Didehydro-N-[1-(hydroxymethyl)propyl]-1,6-dimethylergoline-8-carboxamide maleate, (10 мкМ).

D-AP5 и CNQX получены от фирмы RBI (США); бикикуллин метаклорид – от фирмы Tocris bioscience (Великобритания).

Анализ параметров потенциалов проводили с помощью компьютерных программ пакета

POTENTL и программы Clampfit 8.2 пакета Pclamp 8.2 Axon instruments. Компьютерный анализ мПСП осуществляли с помощью программы Pick6, являющейся модифицированной программой Анкри [22], дополненной блоком селекции потенциалов по заданным амплитудным и временным характеристикам. Статистический анализ и графические построения выполняли с помощью пакета программ Sigma Plot 2.0 и 12.0. Результаты представлены в виде $m \pm SD$ или $m \pm SE$. Значимость действия лигандов выявляли с помощью *t*-критерия Стьюдента, а также с помощью оценки распределений по Колмогорову–Смирнову.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического изучения серотониновой иннервации в экспериментальной камере подготавливали не только отдельные сегменты, но и весь препарат изолированного спинного мозга с продолговатым мозгом. Маркирование мотонейронов осуществляли двумя способами: ретроградным и антероградным. Ретроградное маркирование мотонейронов дало возможность выявлять моторные ядра и области распространения дендритов мотонейронов, чтобы в них проследить распределение серотониновых терминальных ветвлений. При ретроградном способе маркеры апплицировали через всасывающий электрод на филаменты вентральных корешков вырезанного поясничного сегмента или одного из сегментов полного препарата изолированного спинного мозга: декстран, конъюгированный с флуоресцирующим родамином (DRh) (Dextran Rhodamine Green, 3000 MW, Invitrogen, Molecular Probes, США), биоцитин (B) (Biocytin, SIGMA, США) или нейробиотин (NB), (Neurobiotin, Vector Labs, Burlingame, CA, США) в концентрации 1–5% в физиологическом растворе. Биоцитин и нейробиотин апплицировали с подачей чередующихся депо- и гиперполяризующих толчков тока через всасывающий электрод. Время аппликации маркеров на вентральный корешок в камере с протоком физиологического раствора составляло от 2-х до 4-х ч.

При антероградном мечении мотонейронов маркер, биоцитин или нейробиотин 3–10% в 2М KCl, инъецировали в мотонейроны с помощью внутриклеточных микроэлектродов с диаметром кончика около 1 мкм. Мечение мотонейронов проводили после антидромной идентификации мотонейронов. Инъекция маркера осуществлялась подачей деполяризующих толчков тока силой 3–5 нА, длительностью 60 мс с частотой 10 Гц или 600 мс с частотой 1 Гц в течение 10–20 мин.

Для дальнейшего транспорта маркера в дистальные отделы дендритного дерева мотонейронов мозг, погруженный в аэрированный физиологи-

ческий раствор, помещали на ночь в холодильник (+4°C), после чего сутки фиксировали в растворе параформальдегида 4% на 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4, затем последовательно погружали в 20%, затем 30% раствор сахарозы в 0.1 М фосфатном буфере на 1–3 дня для криопротекции ткани. В изопентане, охлажденном жидким азотом, блоки продолговатого мозга и спинного замораживали. Фронтальные, сагиттальные и горизонтальные срезы толщиной 14–50 мкм, готовили на криостате или на замораживающем микротоме. Реакции проводили либо на тонких (толщиной 14–20 мкм) серийных срезах, смонтированных на стеклах (Superfrost® Plus, Menzel), либо на свободноплавающих (толщиной 40–50 мкм), в отдельных случаях также серийных, для изучения распространения ветвей дендритного дерева мотонейронов. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела против серотонина (5-HT) (Immunostar, cat# 20080, США) в разведении 1:20000 и против 5-HT_{5A}R (Immunostar, cat# 24429, США) в разведении 1:200/400 в течение 48 часов при t +4°C. В части опытов без мечения мотонейронов для картирования в срезе клеточных элементов в раствор с антителом к 5-HT добавляли мышинное моноклональное антитело к кальций-связывающему белку, парвальбумину (PV), (Sigma, cat# P3088, США) в разведении 1:1000. В контрольной процедуре без введения первичных антител (негативный контроль) проверяли их специфичность. Вторичные козы антитела против Ig кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 (Invitrogen, cat# A-11036, США), применяли для выявления 5-HT, 5-HT_{5A}R, для выявления PV – козы антитела против Ig мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, cat# A-11029, США). Нейробиотин и биоцитин меченых внутриклеточно мотонейронов выявляли для флуоресцентной микроскопии реактивом Alexa- Fluor 488, конъюгированным со стрептавидином (Invitrogen, Molecular Probes, США) или для изучения в световом микроскопе с авидин-биотин-пероксидазным комплексом (ABC; Vector) и реакцией Ni-DAB [23].

После завершения процедур выявления и промывки свободноплавающие срезы монтировали на стекла, заключали в нефлуоресцирующую среду мовиоль (Mowiol, Calbiochem) или в энтелан под покровное стекло. Классические гистологические методы окрашивания по Ниссли и импрегнации препаратов по Быстрому методу Гольджи [24] применяли для получения общих морфологических характеристик срезов и выявления глиальных элементов (2 животных). Изучение препаратов проводили на микроскопе фирмы Zeiss (AxioImager A1, Germany) и конфокальном микроскопе Leica SP5 MF, (Leica Microsystems, Германия). С помощью программного обеспечения AxioVision AC проводи-

ли морфометрию структурных элементов в срезах мозга. С помощью программы ImageJ оценивали сравнительную плотность распределения 5-HT ветвлений. Для этого цветные изображения срезов поясничного утолщения толщиной 40 мкм (по три от трех животных) переводили в черно-белый режим. Выбранную площадку 20×50 мкм помещали на белый фон изображения, а затем устанавливали по разным участкам срезов с разной плотностью реакции. Полученные значения плотности в условных единицах уровня серого усредняли по участкам, строили гистограмму для представления контрастной неоднородности серотониновой иннервации поясничного отдела спинного мозга.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиология

Результаты исследования участия 5-HT_{5A} рецепторов в модуляции миниатюрной глицинергической передачи, (глимТПСР) в поясничных мотонейронах получены в 21 эксперименте на срезах спинного мозга 15 животных обоего пола. Мотонейроны идентифицировали по наличию антидромного потенциала (АПД) при раздражении вентрального корешка. В 6 нейронах в выборках по 5–10 пробегов средние значения АПД составляли 71.7 ± 7.5 мВ, ($m \pm SD$, $n = 6$) со средними значениями быстрой (fАНР) и медленной следовой гиперполяризации (sАНР) 11.7 ± 3.7 и -2.4 ± 1.7 мВ, соответственно. В остальных мотонейронах анализ характеристик АПД не проводили. Установившийся МПП мотонейронов перед проведением фармакологических тестов составлял от –60 до –80 мВ, в среднем -67.6 ± 6.0 мВ ($m \pm SD$, $n = 21$).

Исследование модуляции глимТПСР (в суперфузате, содержащем ТТх, CNQX, D-AP5 и бикуккулин) проводили в 4-х сериях экспериментов I, II, III, IV (табл. 1): с вариацией концентрации для сопоставления эффектов 5-СТ: 10 мкМ – серии I и II, 1 мкМ – серия IV; с предварительным, до аппликации 5-СТ, введением в раствор антагониста 5-HT_{1,2} рецепторов – 10 мкМ метисергид малеата (MS) – серия II; с аппликацией селективного антагониста 5-HT_{5A} рецепторов, 10 мкМ SB699551-A, после добавления в перфузат 10 мкМ 5-HT и антагониста 5-HT_{1,2} рецепторов – 10 мкМ метисергида (MS) – серия III; с аппликацией 1 мкМ 5-СТ и последующей аппликации 10 мкМ SB699551, селективного антагониста 5-HT_{5A} рецепторов, – серия IV.

Выделенная фракция миниатюрной глициновой активности 13 мотонейронов в сериях экспериментов I и IV представляет собой колебания мембранного потенциала, амплитудой от 80 до 1500 мВ, в среднем, 117.0 ± 45.5 мВ ($m \pm SD$, $n = 13$) и частотой событий от 1.0 до 16.8 с⁻¹, в среднем 4.6 ± 4.4 с⁻¹ ($m \pm SD$, $n = 13$) со следующими

Таблица 1. Серии экспериментов (I, II, III, IV) изучения действия лигандов серотониновых рецепторов, 5-СТ и SB-699551, на глимТПСП поясничных мотонейронов ($n = 21$) в срезах изолированного спинного мозга лягушки. Звездочкой обозначаются компоненты суперфузирующего раствора, а числами — концентрация лигандов

Серии экспериментов с числом мотонейронов	Состав раствора				
	TTx, CNQX, D-AP5, bicuculline	TTx, CNQX, D-AP5, MS, bicuculline	TTx, CNQX, D-AP5, 5-HT, MS bicuculline	Агонист 5-HT R 5-СТ (мкМ)	Антагонист 5-HT _{5A} R SB-699551 (мкМ)
I — 6 клеток	*			10	
II — 5 клеток		*		10	
III — 3 клетки			*		10
IV — 7 клеток	*			1	10

значениями характеристик глимТПСП ($m \pm SD$, $n = 21$): время нарастания (RT) 1.5 ± 0.2 мс, полуширина (HW) 7.6 ± 1.8 мс; время спада (DT) 8.0 ± 1.6 мс, ($m \pm SD$, $n = 13$). Класс высокоамплитудных миниатюрных потенциалов со средним значением амплитуды $216,9 \pm 38.1$ мкВ в этой выборке был немногочислен, частота событий составляла в среднем 0.1 ± 0.06 с⁻¹.

В серии I определяли действие 10 мкМ 5-СТ на глимТПСП шести поясничных мотонейронов.

Средние значения характеристик миниатюрной глициновой активности мотонейронов не отличались от приведенных выше данных двух серий. Действие раствора, содержащего 10 мкМ 5-СТ, уже в течение 5–10 мин приводило к подавлению глимТПСП с сокращением частоты событий в среднем на $85.7 \pm 5.5\%$ ($m \pm SE$, $n = 6$) (рис. 1а). Через 30 мин продолжения подачи раствора с агонистом наблюдали полное исчезновение высокоамплитудных миниатюрных потенциалов. (рис. 1б, с).

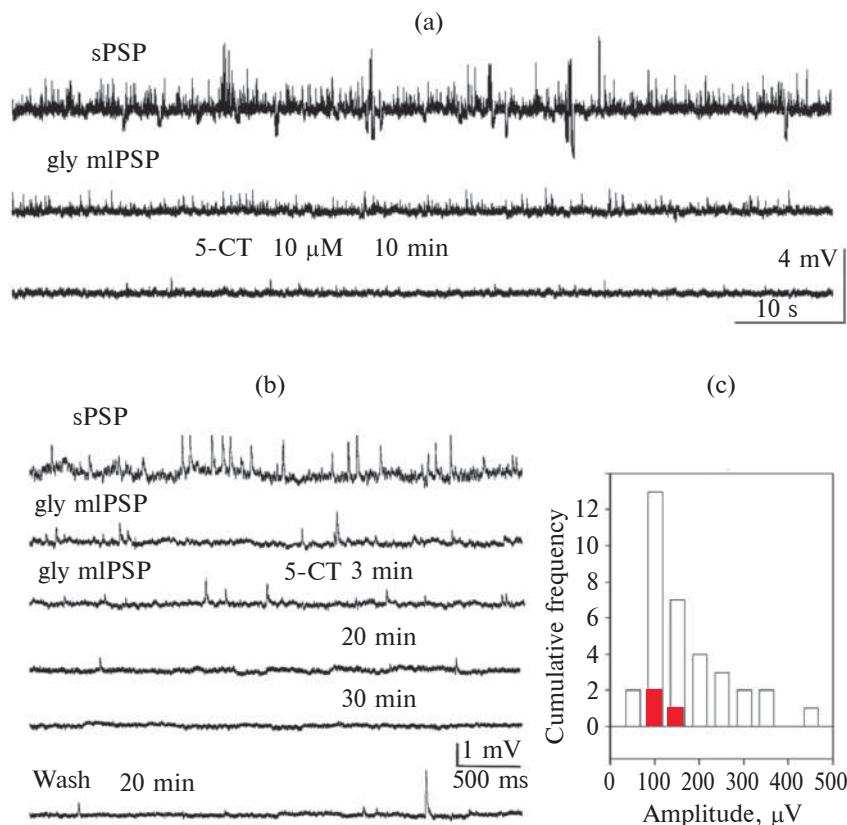


Рис. 1. Параметры глимТПСП мотонейрона, частоты и амплитуды, при аппликации 10 мкМ 5-СТ (экспериментальная серия I); (а) — примеры регистрации (полные записи из 300 пробегов) общей спонтанной активности (сПСП), выделенной фракции миниатюрных глициновых тормозных постсинаптических потенциалов (глимТПСП) и глимТПСП через 10 мин аппликации 5-СТ, агониста 5-HT рецепторов, (10 мкМ) в поясничном мотонейроне спинного мозга лягушки; (б) — фрагменты (4 сек) записей активностей мотонейрона: сПСП, глим ТПСП, их подавления через 20 и 30 минут аппликации 5-СТ и восстановления спонтанной активности с появлением высокоамплитудных событий (более 1 мВ) через 20 мин после смещения экспериментального раствора на нормальный состав; (с) — гистограмма уменьшения числа и амплитуды глимТПСП в мотонейроне при действии 5-СТ (10 мкМ) (красные столбики) по сравнению с контролем (белые столбики).

Последующий отмыв тестового раствора раствором нормального физиологического состава через 15–20 минут привел к появлению редких спонтанных постсинаптических потенциалов амплитудой более 1 мВ.

В следующей **серии II** экспериментов исследовали возможность участия рецепторов семейства 5-HT₁ при действии 5-СТ. После предварительной аппликации 10 мкМ метисергида малеата (MS), смешанного блокатора серотониновых рецепторов 5-HT₁ и 5-HT₂, аппликация 10 мкМ 5-СТ также приводила к существенному подавлению глимТПСП (рис. 2).

Среднее значение снижения частоты событий в пяти мотонейронах этой серии составляло $-66.8 \pm 4.2\%$ ($m \pm SE$). Редкие высокоамплитудные глимТПСП со средней амплитудой 240.0 ± 31.3 ($m \pm SD$, $n = 5$) и частотой событий 0.1 ± 0.86 с⁻¹, при действии 5-СТ оставались в незначительном числе, средняя частота событий уменьшалась до 0.02 с⁻¹, средняя амплитуда уменьшалась на 20%, 191.0 ± 38.0 ($m \pm SD$, $n = 5$). Добавление в суперфузирующий раствор стрихнина 1 мкМ, блокатора глицинергической синаптической передачи, приводило к их исчезновению уже через 5 мин протока. Последующая смена раствора, содержащего блокатор передачи импульсов, 4 блокатора ионных

каналов и лиганды серотониновых метаботропных рецепторов, на раствор нормального состава приводила к появлению спонтанных постсинаптических потенциалов мотонейронов.

В экспериментах **серии III** наблюдали влияние селективного антагониста 5-HT_{5A}R — SB699551 10 мкМ на глимТПСП с предварительной аппликацией 10 мкМ 5-НТ и 10 мкМ MS (табл. 1, рис. 3). Этот протокол был выбран для оценки возможного возвращения синаптической активности после действия 5-НТ на глимТПСП при заблокированных рецепторах 5-HT₁ \ 5-HT₂ антагонистом MS.

В первые минуты суперфузии раствором с селективным антагонистом 5-HT_{5A} рецепторов 10 мкМ SB-699551 регистрировали его значительное подавляющее действие на частоту глимТПСП: $-85.3 \pm 7.8\%$ ($m \pm SE$, $n = 3$), с заметным уменьшением числа высокоамплитудных событий в одном мотонейроне от 0.38 с⁻¹ до 0.02 с⁻¹ и их исчезновением в двух других. При дальнейшей суперфузии этим раствором отрицательная модуляция сменялась положительной, что видно на регистрациях миниатюрной активности мотонейрона через 15 мин (рис. 3а, регистрации 7 и 8).

В семи экспериментах **серии IV**, без предварительной аппликации MS, как и в серии I, вводили

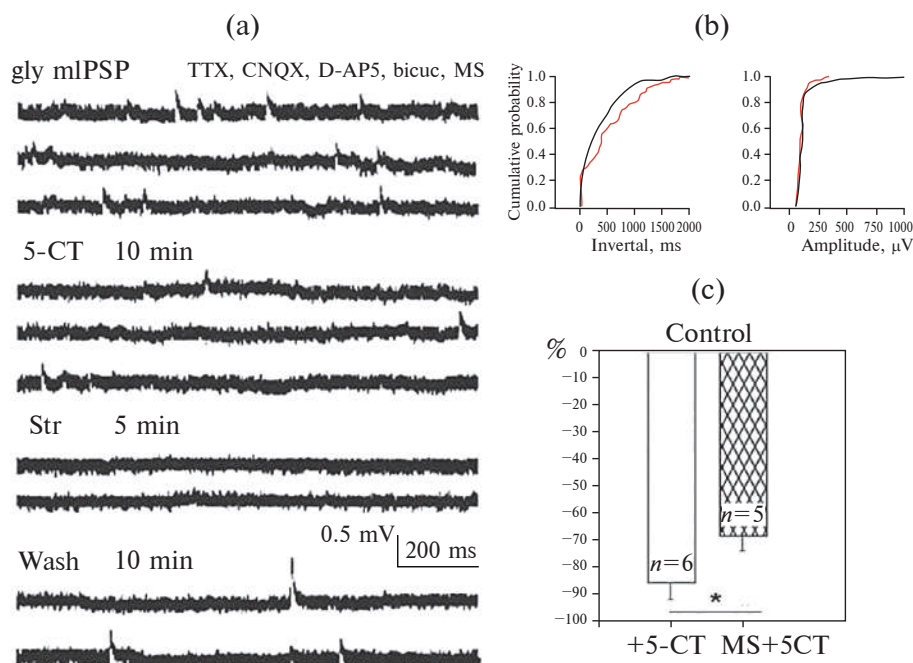


Рис. 2. Действие 5-СТ (10 мкМ) на глимТПСП при дополнительном введении в суперфузирующий раствор антагониста 5-HT_{1,2} рецепторов метисергида (MS) (10 мкМ) (экспериментальная **серия II**). (а) — регистрации глимТПСП в одном из пяти мотонейронов. В растворе с 5-СТ наблюдается уменьшение числа глимТПСП, которые блокируются при последующем введении в раствор стрихнина (Str). Отмыв препарата раствором нормального состава приводит к появлению спонтанной синаптической активности мотонейрона. (б) — распределение вероятностей встречаемости различных интервалов частоты и амплитуды глимТПСП мотонейрона до- (Контроль-черная линия) и при действии 5-СТ (10 мкМ) (красная линия) в условиях присутствия метисергида в суперфузирующем растворе. (с) — сравнение действия 5-СТ (10 мкМ) в экспериментах без присутствия в растворе метисергида и с метисергидом показывает достоверное различие в подавлении частоты глимТПСП в поясничных мотонейронах ($p < 0.05$, непарный критерий t — Стьюдента).

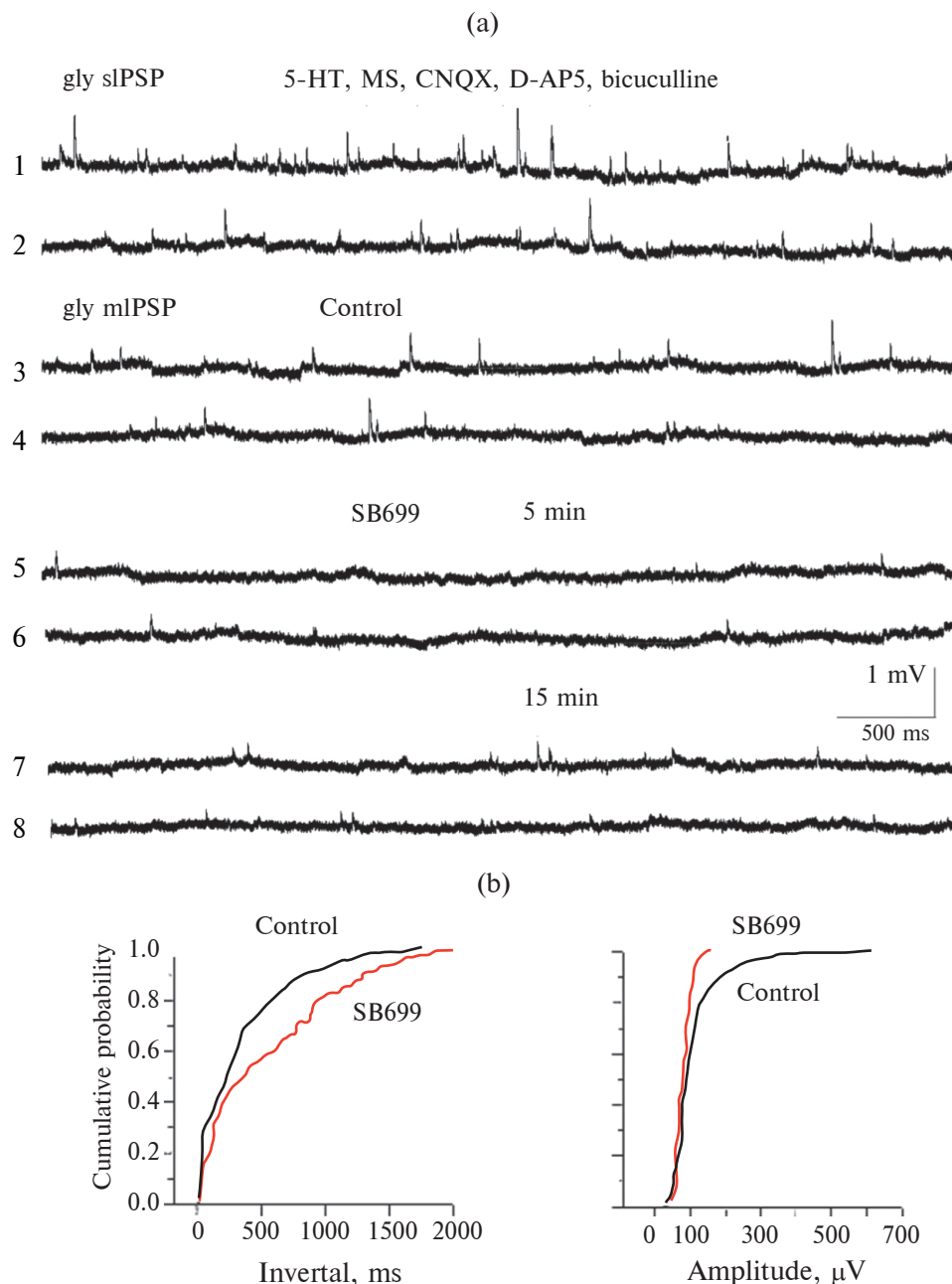


Рис. 3. Действие SB-699551, антагониста 5-HT_{5A} рецепторов, на глимТПСП мотонейрона при суперфузии раствором без 5-СТ, содержащим 5-HT (10 мкМ) и метисергид (экспериментальная серия III). (a) – фрагменты регистраций в мотонейроне: 1, 2 – бурной спонтанной глициновой активности; 3, 4 – глимТПСП после добавления в раствор ТТх – контроль; 5–8 – глимТПСП при действии аппликации SB-699551 – в первые 5 мин и через 15 мин. (b) – распределения вероятностей встречаемости различных интервалов частоты и амплитуды глимТПСП в контроле (черная линия) и через 5 мин действия антагониста SB-699551 (красная линия).

5-СТ, но в концентрации на порядок меньшей – 1 мкМ. По сравнению с результатом экспериментов **серии I**, это приводило к меньшему снижению частоты событий глимТПСП ($-48.6 \pm 8.0\%$, $m \pm SE$) (рис. 4).

Высокоамплитудные события присутствовали во всех 7 случаях, что видно на записи регистраций глимТПСП и отражено на графике накопленных вероятностей частоты и амплитуды событий. При

последующей аппликации в раствор антагониста 5-HT_{5A} рецепторов SB-699551 в пяти экспериментах частота глимТПСП выросла (от 10 до 112%) относительно значений уменьшенной частоты глимТПСП под действием 5-СТ (рис. 4а, 5). Действие антагониста 5-HT_{5A} рецепторов SB-699551, увеличивающее частоту глимТПСП мотонейронов в этой серии экспериментов, в среднем составило 41.0 ± 16.4 ($m \pm SE$).

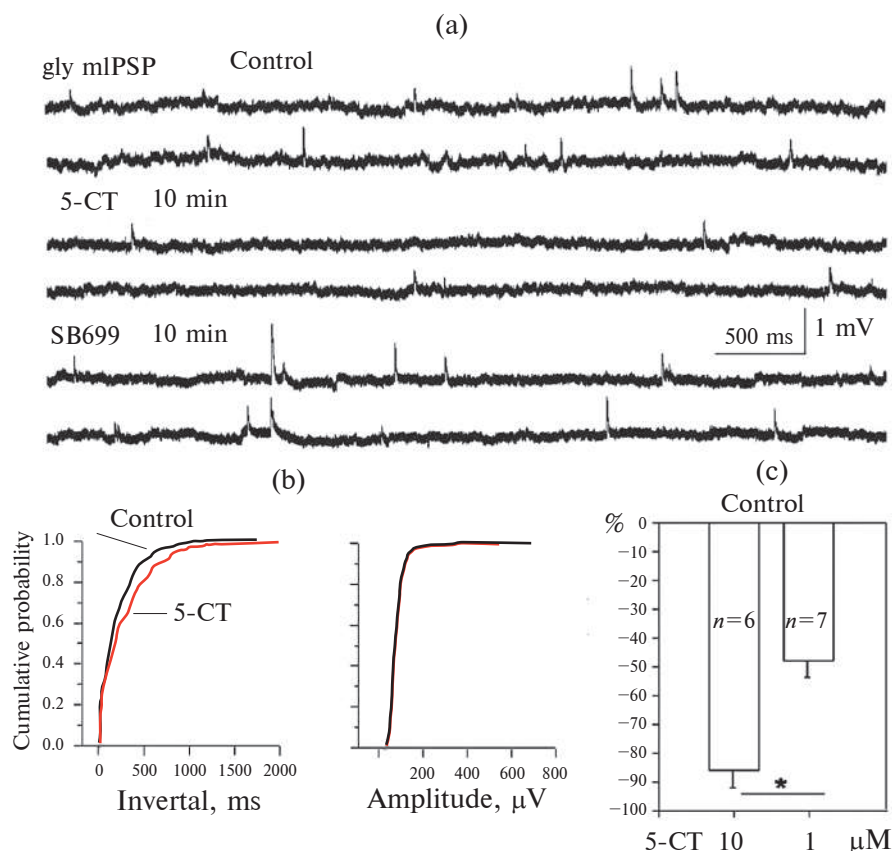


Рис. 4. Действие 5-СТ и введенного в раствор антагониста 5-НТ_{5A} рецепторов SB-699551 на глимТПСР (экспериментальная серия IV). (а) — 5-СТ в малой концентрации (1 мкМ) также подавляет частоту глимТПСР с незначительным влиянием на амплитуду глимТПСР, а антагонист 5-НТ_{5A} рецепторов восстанавливает тормозную активность (две нижние записи глимТПСР). (б) — распределение вероятностей встречаемости различных интервалов частоты и амплитуды глимТПСР в контроле (черная линия) и через 10 мин введения в раствор 5-СТ гистограмма (красная линия). (с) — снижение частоты глимТПСР при действии агониста серотониновых рецепторов 5-СТ в концентрациях 10 и 1 мкМ ($n = 6$ и 7 соответственно) с достоверным различием эффектов ($p < 0.05$, непарный критерий t —Стьюдента).

Иммуногистохимия

Результаты иммуногистохимического исследования серотониновой иннервации в спинном мозге лягушки получены на 16 животных обоего пола. С помощью иммунофлуоресцентного метода выявлены серотониниммунореактивные нейроны озера лягушки: 5-НТ+ ир супраспинальные нейроны ядра шва продолговатого мозга и интраспинальные 5-НТ+ ир нейроны спинного мозга (ISN). На горизонтальных срезах дна ромбовидной ямки продолговатого мозга вдоль медиальной линии видны 2 ряда мелких 5-НТ+ ир нейронов (рис. 6а, б). Они окружены многочисленными 5-НТ+ ир терминальными ветвлениями. Латеральнее располагаются крупные нейроны гигантоклеточного ретикулярного ядра, имеющие PV+ир и 5-НТ-ир (рис. 6а, с). Все 5-НТ+ ир структуры в продолговатом мозгу были также PV-ир.

Интраспинальные серотониновые нейроны (ISN) обнаружены в вентромедиальной области серого вещества спинного мозга (рис. 6д — л). Они расположены вентральнее центрального канала на

100–200 мкм и латерально от медиальной линии на 50–200 мкм. Число ISN в ростокаудальном направлении мозга варьирует. В цервикальном сегменте III — единичные нейроны, в сегментах грудного отдела (IV–VII сегменты) они встречаются часто, в 1 мм протяженности мозга в ростокаудальном направлении до сотни. Они располагаются в горизонтальном срезе мозга в виде 2х цепочек по обе стороны медиальной линии мозга без строгой симметрии (рис. 6д). Зачастую можно видеть тесно расположенные несколько клеток, есть удаленные друг от друга до 100 мкм.

В поясничном утолщении на 1 мм длины сегментов их насчитывается меньше, от 10 до 30 (рис. 6h). Как и супраспинальные 5-НТ+ ир нейроны ядер шва, ISN не имеют положительного сигнала парвальбумина (PV-ир) (рис. 6g). Это мелкие округлые клетки, средний диаметр сомы которых составляет 18.2 ± 3.07 мкм ($n = 90$) (рис. 6f). Крупное ядро с хорошо различимым ядрышком занимает большую часть сомы ISN (рис. 6i). На тонких поперечных срезах мозга толщиной 14 мкм видны

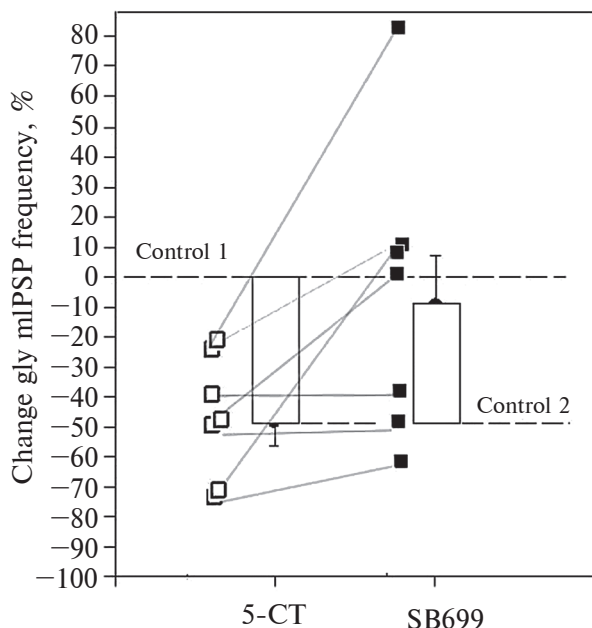


Рис. 5. Гистограммы, представляющие действие лигандов серотониновых рецепторов на частоту или мТПСП (Контроль 1) семи мотонейронов. Агонист 5-HT_{5A} рецепторов 5-CT в концентрации (1 мкМ) уменьшает частоту в среднем на $-48.6 \pm 8.0\%$ (Контроль 2), антагонист 5-HT_{5A} рецепторов SB-699551 восстанавливает частоту событий в среднем на $41.0 \pm 16.4\%$ (m + SE).

иногда 1–2 дендрита. На срезах мозга разной ориентации толщиной 40–50 мкм, можно видеть их мультиполярными с 4–5 первичными дендритами, отходящими от сомы в разных направлениях и делящихся на ветви высших порядков (рис. 6j, k). Идентифицировать аксон с его терминальными разветвлениями было затруднительно или не представлялось возможным. Следует отметить, что сома и проксимальные дендриты ISN окружены многочисленными 5-HT⁺ ир волокнами и утолщениями (рис. 6g, j, k).

Серотониновые терминальные ветвления обильно пронизывают спинной мозг (рис. 7).

На фронтальных срезах поясничного отдела легко выделяются области с превалирующей серотониновой иннервацией: в перимедулярном сплетении и в области вентральной комиссуры (рис. 7b, c). На препаратах с поясничными мотонейронами, выявленными внутриклеточной инъекцией нейробиотина и реакцией Ni-DAB, прослеживаются тонкие дистальные дендриты мотонейронов в этих областях (рис. 7d). На препаратах с двойным флуоресцентным иммуномечением 5-HT⁺ ир ветвлений и маркированных мотонейронов видно распределение серотониновых терминалей в моторном ядре вдоль профилей сом (рис. 7e, f). На сомах и проксимальных дендритах мотонейронов 5-HT⁺ ир бутоны встречаются с разной частотой (рис. 7e – h). Отмечаются возможные контакты серотониновых волокон с вентромедиальными дендритами

(рис. 7i), направленными к центральному каналу, реже с дендритами, идущими в латеральном канатике. Обнаружено, что контакты утолщений серотониновых волокон с мотонейронами возможны с высокой степенью вероятности в области перимедулярного плексуса, самой богатой области ветвления серотониновых окончаний. Сюда вступают, идут вдоль поверхности мозга, извиваясь и переплетаясь, тончайшие дистальные дендриты мотонейронов (рис. 7j).

Так как у низших позвоночных животных документирована экспрессия 5-HT_{5A}R [21, 25, 26], а присутствие 5-HT_{5A}R в спинальных мотонейронах показано у крыс, мышей [6, 7], мы применили кроличье поликлональное антитело 5-HT_{5A}R в экспериментах с двойным флуоресцентным иммуномечением на препаратах с моноклональным антителом к кальцийсвязывающему белку парвальбумину (PV) и с ретро- или anterogradно маркированными мотонейронами. Это пробное применение поликлонального антитела для 5-HT_{5A}R без предварительной расшифровки аминокислотной последовательности протеина у озерной лягушки, без использования животных с нокаутом гена 5-HT_{5A}R. Сигнал флуоресценции в срезах мозга лягушки будет обозначен как положительный 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал.

На фронтальных срезах поясничного утолщения с двойным иммуномечением, к 5-HT_{5A}R и PV, сигнал 5-HT_{5A}Rlike+ обнаружен в срезах с большей яркостью в белом веществе. Заметная флуоресценция видна в миелине волокон, идущих в белом веществе дорсальных и вентральных канатиков (рис. 8).

Совмещенное изображение 2х сигналов иммунореактивностей четко представляет PV + ир аксоплазму волокон, окруженную кольцами миелина с ярким 5-HT_{5A}Rlike+ сигналом.

На меченных биоцитином телах мотонейронов выявлен положительный 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал в виде точек (рис. 9a – c).

На дорсально направленных дендритах мотонейронов также можно различить в виде точек или зерен 5-HT_{5A}Rlike+ сигналы (рис. 9g, h, i), которые присутствуют и в нейропиле. Яркие, контрастные 5-HT_{5A}Rlike+ сигналы обнаружены после ретроградного мечения мотонейронов биоцитином с длительной антидромной стимуляцией вентрального корешка во время аппликации. Они отмечены стрелками на рис. 9a, d. Яркий сигнал виден в вентральном канатике в миелиновых оболочках аксонов мотонейронов на всем пути до их выхода из мозга. Кроме того, в отдельных волокнах медиального канатика заметно выделяются миелиновые колечки с красным 5-HT_{5A}Rlike+ сигналом.

Неожиданно яркая флуоресценция видна в дорсальном роге в области входа афферентов в мозг,

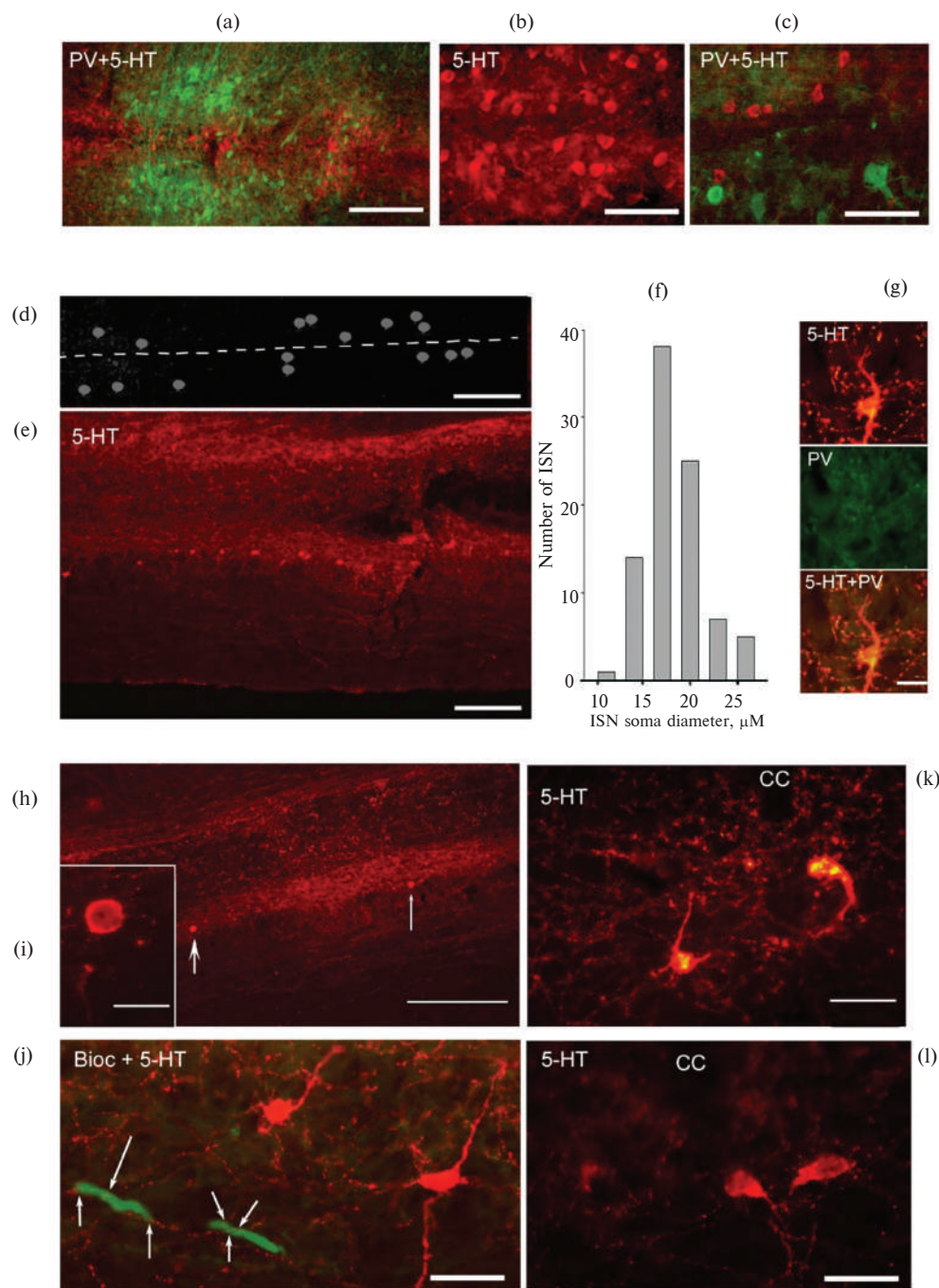


Рис. 6. Серотониниммунореактивные (5-HT+ ir) нейроны в продолговатом и спинном мозге лягушки *Rana ridibunda*: (a – c) – три горизонтальных среза продолговатого мозга с двойным иммуномечением к 5-HT (красный) и к PV (зеленый), представляющие расположение и сравнительные размеры 5-HT+ ir нейронов и нейронов ретикулярного ядра парвальбуминиммунореактивных (PV+ir) без иммунореактивности к серотонину (5-HT – ir); (d) – схема-пример расположения интраспинальных серотониновых нейронов (ISN) в одном из горизонтальных срезов грудного отдела спинного мозга (горизонтальный план); (e) – сагиттальный срез грудного отдела спинного мозга с цепочкой часто повторяющихся ISN; (f) – гистограмма среднего диаметра сом ISN в грудных и поясничных сегментах; (g) – вентромедиальный участок фронтального среза поясничного сегмента с ISN, имеющим ветвящиеся дорсальный и вентральный дендриты. Множество 5-HT+ir терминалей окружают нейрон. Как и супраспинальные серотониновые нейроны, ISN не имеет сигнала иммунореактивности к PV (PV- ir); (h) – расположение ISN в сагиттальном срезе поясничного утолщения (2 стрелки указывают на тела ISN); (i) – изображение одного из ISN (жирная стрелка на рис. 6h) с хорошо различимыми крупным ядром и ядрышком; (j) – расположения двух ISN в сагиттальном срезе поясничного утолщения и фрагменты идущих рядом дендритов мотонейрона, меченого биоцитином (зеленый цвет). Стрелками отмечены возможные контакты 5-HT+ir терминалей с дендритами мотонейрона; (k, l) – расположения нескольких ISN на фронтальных срезах поясничного сегмента толщиной 14 и 40 мкм: по одному нейрону в половинах мозга или по два в одной и третьим в другой половине (cc – *canalis centralis*). Масштаб: (a), (d), (e), (h) – 200 мкм; (b), (c) – 100 мкм; (j), (k), (l) – 40 мкм; (i) – 30 мкм; (g) – 20 мкм.

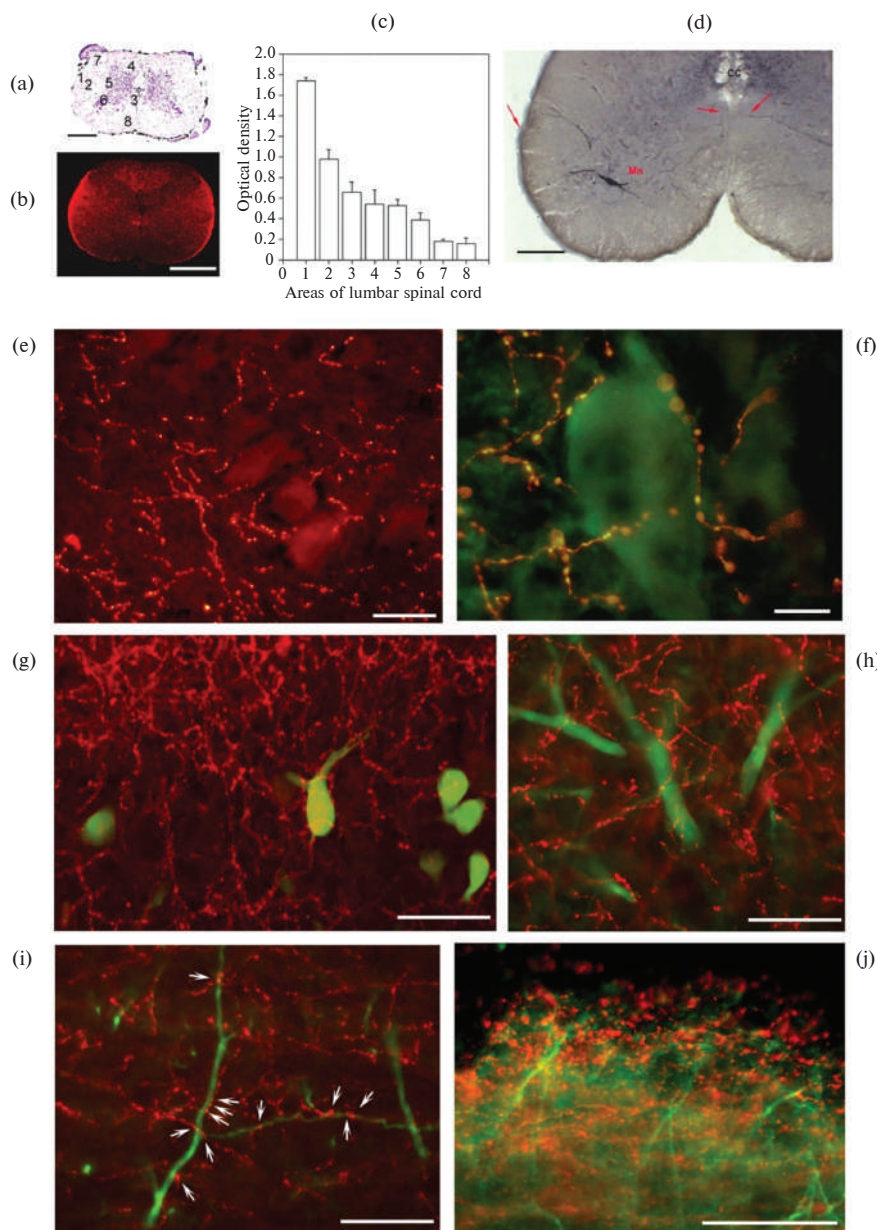


Рис. 7. Распределение серотониниммунореактивных элементов в поясничных сегментах и возможные контакты 5-HT+ir терминалей с мотонейронами, меченными внутриклеточно инъекцией нейробиотина или аппликацией маркеров на вентральный корешок: (a) — фронтальный срез поясничного сегмента IX, окрашенный по Нисслю, для сравнительной ориентации участков срезов с 5-HT иммунореакцией (b); (b) — фронтальный срез X поясничного сегмента с5-HT+ir; (c) — гистограмма интенсивностей (в условных единицах от 0 до 2.0) сигнала 5-HT+ir участков (1–8) поясничного утолщения спинного мозга: 1 — перимедулярное сплетение (маргинальный плексус); 2 — латеральный канатик; 3 — вентральная комиссура; 4 — дорсальный рог; 5 — интермедиальная зона; 6 — моторное ядро; 7 — область входа дорсальнокорешковых волокон; 8 — вентромедиальный канатик; (d) — изображение фрагмента поясничного сегмента IX с мотонейронами, меченными внутриклеточной инъекцией нейробиотина и последующим выявлением DAB реакцией. Реконструкция по двум фронтальным серийным срезам. Слева видна сома мотонейрона с проксимальными и дистальными участками его дендритного дерева. Справа от медиальной линии видны дендриты мотонейрона, меченного внутриклеточно в правой половине мозга. Тончайшие дистальные дендриты мотонейрона слева ветвятся в перимедулярном плексусе (область 1 на гистограмме рис. 7с). В вентральной комиссуре (область 3 — на гистограмме), где располагаются ISN, простираются дендриты мотонейронов, регистрируемых в обеих половинах спинного мозга; (e) — редкие 5-HT+ir терминальные ветвления в моторном ядре фронтального тонкого среза мозга поясничного сегмента; (f) — 5-HT+ir ветвления в моторном ядре на фронтальном срезе мозга толщиной 40 мкм другого препарата. Их возможные контакты видны на теле мотонейрона, меченого ретроградно декстран-родомином; (g — j) — участки сагиттальных срезов поясничного утолщения с возможными контактами 5-HT+ir терминальных ветвлений на телах меченых биоцитином мотонейронов (g), проксимальных дендритах (h), дендритах высших порядков (i). Область наивысшей интенсивности 5-HT+ir, перимедулярный плексус (j), пронизана тонкими дистальными дендритами многих мотонейронов, где предполагается высокая вероятность контактов с серотониниммунореактивными синаптическими бутонами. Масштаб: (a), (b) — 500 мкм; (d) — 200 мкм; (g) — 100 мкм; (e), (h — j) — 50 мкм; (f) — 20 мкм.

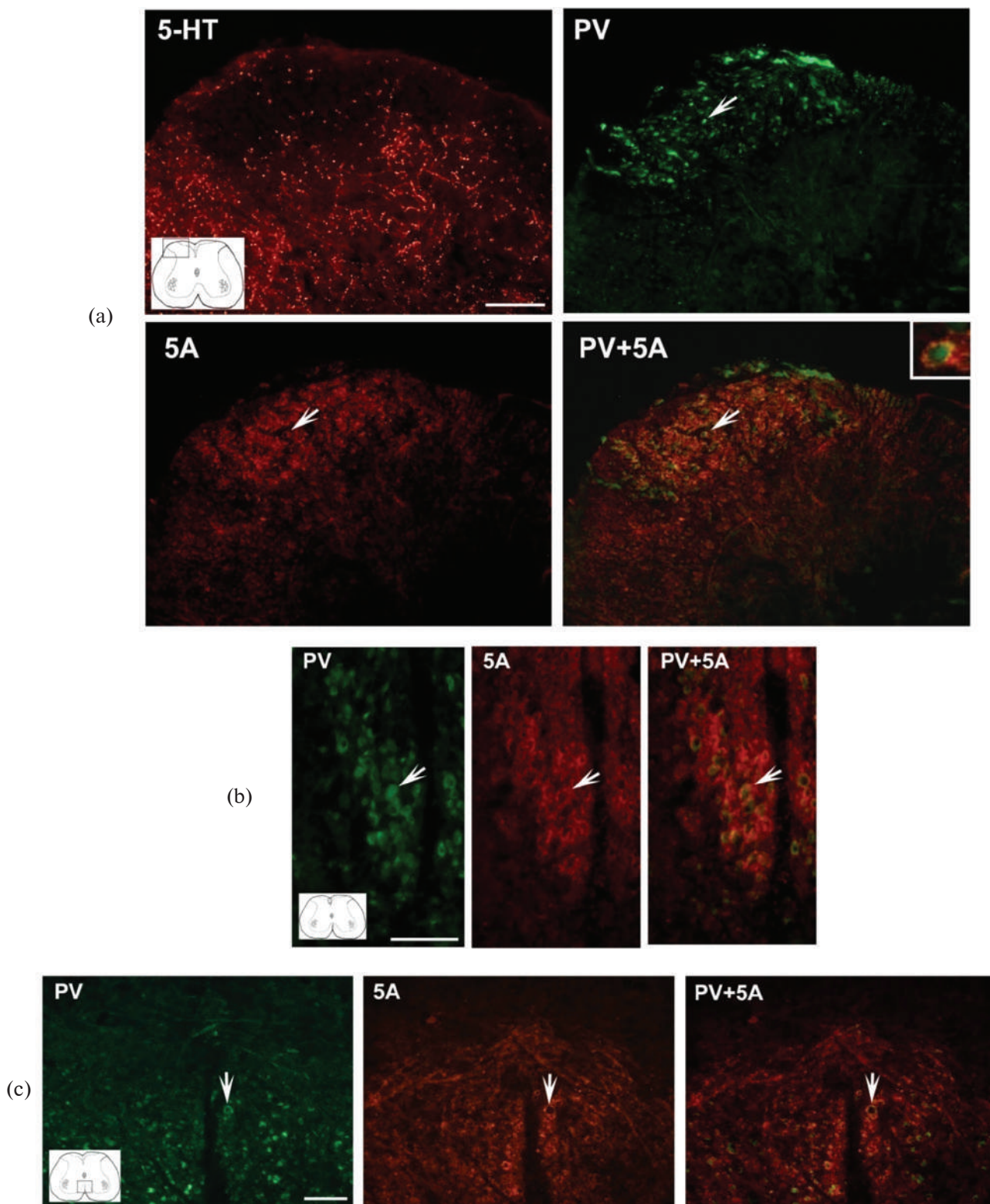


Рис. 8. Обнаружение 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала иммунореактивности в поясничном утолщении спинного мозга лягушки (области срезов представлены на схемах): (a) — область входа волокон дорсального корешка в спинной мозг, где мало терминалей с 5-HT+ ir, но видны отчетливые профили PV+ ir афферентных волокон (зеленый цвет) и повышенная интенсивность 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала (красный). Стрелки указывают на сечение аксоплазмы одного из крупных афферентов с PV+ ir (зеленый цвет), на сечение его миелиновой оболочки в виде кольца (красное) и на колокализацию двух изображений со вставкой увеличенного изображения профиля аксона; (b, c) — композиции изображений медиальной области дорсального канатика (b) и медиальной области вентрального канатика (c) также представляют присутствие 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала в миелине волокон с PV+ ir (указано стрелками). Масштаб — 50 мкм.

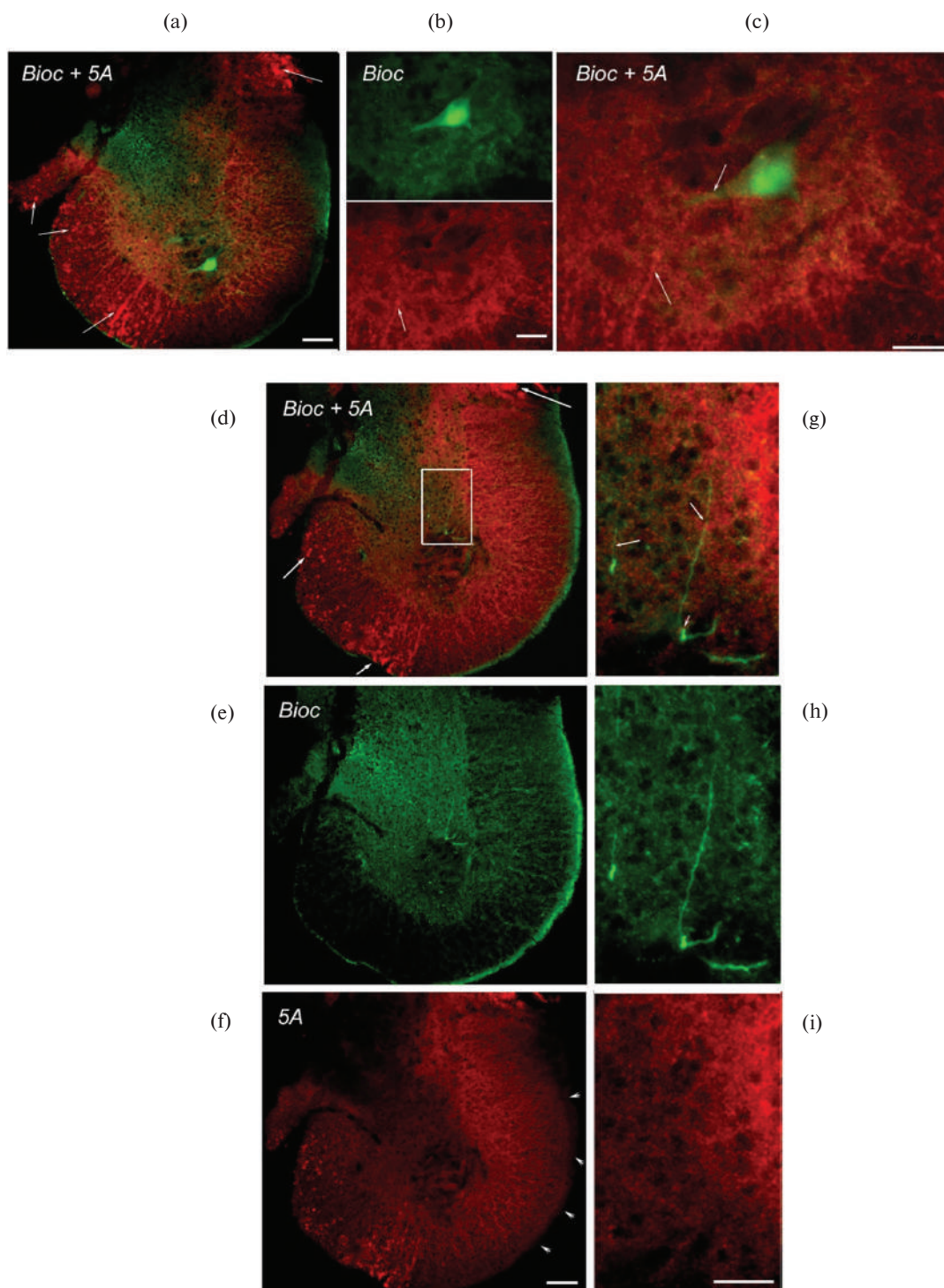


Рис. 9. Ретроградно меченные биоцитином мотонейроны поясничных сегментов и 5-HT_{SA}Rlike+ иммунореактивность на фронтальных срезах поясничного сегмента X: (a) — фронтальный срез мозга при малом увеличении объектива с двумя сигналами флуоресценции: меченного биоцитином мотонейрона (зеленый) и 5-HT_{SA}Rlike+ сигнала (красный) в нейропиле. Яркий контрастный 5-HT_{SA}Rlike+ сигнал (стрелки) виден в виде колец в медиальном канатике, в виде пятен, колец, полосок — в области входа афферентных волокон в дорсальный рог, в вентральном канатике по ходу моторных аксонов; (b) — отдельные изображения участка с флуоресцирующим маркированным мотонейроном и 5-HT_{SA}Rlike+ флуоресценцией; (c) — на совмещенном изображении видно присутствие 5-HT_{SA}Rlike+ сигнала в виде зерен на соме и первичном вентральном дендрите мотонейрона (стрелка), в вентральной части серого вещества с яркой полоской миелиновой оболочки аксона мотонейрона; (d – i) — композиция изображений другого среза с выделенной областью (g, h, i) дорсально направленных дендритов меченного мотонейрона. На совмещенном изображении (g) можно видеть 5-HT_{SA}Rlike+ сигнал в виде зерен на тонких дендритах мотонейрона (стрелки). В перимедулярном сплетении 5-HT_{SA}Rlike+ сигнал отсутствует (f - малые стрелочки). Масштаб: (a), (d), (e), (f) — 100 мкм; (b), (c), (g), (h), (i) — 50 мкм.

сходная по яркости с таковой миелина моторных аксонов (рис. 9a, d, f). Ширина светящихся полос, пятен миелина с 5-HT_{5A}Rlike+ сигналом в дорсальном роге, (плоскость среза совпадает с траекторией входящих афферентов) достигает 10–15 мкм, что соответствует диаметру крупных дорсальнокорешковых волокон, входящих в спинной мозг лягушки.

Не обнаружено структур, имеющих 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал, с характерной формой астроцитов, детально описанных ранее в спинном мозге бесхвостых амфибий, [27, 28] и выявленных нами на гистологических препаратах с серебрением спинного мозга *Rana ridibunda*. Нет положительной 5-HT_{5A}Rlike+ флуоресценции в богатом астроцитарными отростками перимедулярном сплетении (рис. 9f), хотя в этой области нами показаны многочисленные переплетения дистальных дендритов меченых мотонейронов и самая высокая плотность 5-HT+ и терминальных ветвлений серотониновых волокон. (рис. 7b, c, j).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Электрофизиологические эксперименты

Рецептор 5-HT_{5A}, для которого пока не существует селективных агонистов, остается наименее изученным рецептором серотонина [29, 30]. Данные нашего комбинированного исследования присутствия и функции 5-HT_{5A} рецепторов в спинном мозге бесхвостых амфибий получены впервые, можно сделать выводы об их эволюционном значении.

Мы применили лиганды серотониновых рецепторов, 5-СТ для активации 5-HT_{5A}R и для их блокирования -SB-69955. 5-СТ — известный агонист серотониновых рецепторов, который несмотря на то, что он имеет аффинность к другим типам 5-HT рецепторов, и в настоящее время успешно служит инструментом для расшифровки структуры 5-HT_{5A}R [30]. SB-699551, коммерческий антагонист 5-HT_{5A}R широко используется для исследования его функции при многих неврологических расстройствах, включая боль [11, 14–16].

В нашей работе электрофизиологические эксперименты с фармакологическими тестами в серии I в первые 5 минут аппликации 10 мкМ агониста 5-СТ в суперфузирующий раствор показали быстрое уменьшение частоты глимТПСП поясничных мотонейронов и через 20–30 минут полное исчезновение высокоамплитудных миниатюрных потенциалов, свидетельствующее о действии агониста на **пре- и постсинаптические** 5-HT_{5A} рецепторы. По литературным данным у крыс 5-HT_{5A} рецепторы присутствуют в дорсальном роге и в мотонейронах спинного мозга [6, 7], но столь быстрый и значительный эффект агониста возможно

вызван кооперативным действием 5-СТ на другие 5-HT рецепторы. 5-СТ проявляет разную селективность для Gi/o-связанных серотониновых рецепторов: высока аффинность к 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} и 5-HT_{1D} (pKi = 7.9–8.1) и относительно слабая к 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, а также к 5-HT_{5A} (pKi = 5.4–7.0) [30]. В работе Калининой с соавт. показано подавляющее пресинаптическое действие 5-HT_{1B/D} рецепторов на глимТПСП поясничных мотонейронов спинного мозга лягушки [31]. На основании результатов этого исследования были проведены исследования с блокированием этих рецепторов.

Вторая серия (II) экспериментов с предварительным введением в раствор метисергида, смешанного антагониста 5-HT_{1,2} рецепторов, и последующей аппликации такой же концентрации 5-СТ дала не столь мощное подавление частоты глимТПСП по сравнению с результатом первой серии (86% и 67%). Значительное подавление частоты высокоамплитудных событий отмечалось вновь, в 5 раз по сравнению с контрольным значением, а уменьшением их амплитуды, в среднем на 20%.

Сравнение действия агониста серотониновых рецепторов 5-СТ в экспериментах серий I (без метисергида в растворе) и II (с метисергидом) на частоту событий показало статистически значимое различие средних величин при блокировании 5-HT₁, что может являться свидетельством **пресинаптического** механизма подавления глимТПСП поясничных мотонейронов именно 5-HT_{5A} рецепторами (рис. 2в). Относительно исчезновения высокоамплитудных глимТПСП или уменьшения их амплитуды можно предположить участие **постсинаптических** 5-HT_{5A} рецепторов.

Аппликацию высокоселективного антагониста 5-HT_{5A} рецептора, SB-699551, мы проводили для предварительной проверки возможности его применения в экспериментах, так как при разработке химического зонда для исследования функции 5-HT_{5A} рецептора при неврологических расстройствах, включающих боль, Капланом с сотрудниками были отмечены существенные сложности молекулы SB-699551 [29]. В наших трех опытах без введения в раствор 5-СТ вектор действия SB-699551 (10 мкМ) на глимТПСП поясничных мотонейронов, регистрируемых в растворе с 5-HT, был время зависимым (серия III): в первые 5 минут после аппликации антагониста наблюдали резкое сокращение числа событий, но через 15–20 минут предполагаемая для него функция блокирования подавляющего действия 5-HT_{5A} рецепторов на глимТПСП мотонейронов появлялась. Обнаруженные нами, а также Калининой и Веселкиным [32] свидетельства физиологической (функциональной) активности применяемого антагониста 5-HT_{5A} рецептора в препарате спинного мозга

лягушки подтвердили возможность его использования в следующей серии экспериментов (IV). На порядок уменьшение концентрации 5-СТ в серии IV по сравнению с концентрацией агониста в серии I привело к меньшему подавлению частоты глимТПСП ($85.7 \pm 5.5\%$ и $-48.6 \pm 8.0\%$) и без значимого изменения их средней амплитуды. Последующая аппликация в раствор антагониста 5-НТ_{5A}R, SB-69955, увеличивала частоту глимТПСП в среднем на $41.0 \pm 16.4\%$, что также может указывать на участие **пресинаптических** 5-НТ_{5A}R в торможении глимТПСП.

Таким образом, эксперименты с 10 мкМ 5-СТ в растворе свидетельствуют о пре- и постсинаптическом участии 5-НТ_{5A}R в подавлении глимТПСП мотонейронов, а меньшая концентрация агониста с последующим введением антагониста SB-69955 о пресинаптическом участии 5-НТ_{5A}R в модуляции глициновых миниатюрных событий.

Обсуждения требует временная зависимость действия лигандов на глимТПСП. Уже в первые минуты суперфузии срезов мозга раствором с 10 мкМ агониста или антагониста 5-НТ_{5A}R регистрируются эффекты. Наблюдаемые эффекты одной направленности. Если действие агониста сразу оказывается подавляющим глимТПСП, что не противоречит предполагаемым механизмам его действия, то также подавляющая функция антагониста в начальный период действия остается тайной. Ранее обнаружена гетерологичная десенсибилизация другого серотонинового рецептора человека, 5-НТ₇ [33]. Она вызывается стимуляцией как агонистом, так и антагонистом 5-НТ₇R. Подобных сведений для НТ_{5A}R не имеется. Более того, при анализе фармакологических средств и биологических реакций, чувствительных к фармакологическим обратным агонистам/антагонистам некоторые серотониновые рецепторы, 5-НТ_{5A}R в том числе, не рассматривали, так как их молекулярная фармакология *in vitro* в системе коэкспрессии неясна [34].

Ожидаемые эффекты антагониста НТ_{5A}R появляются позже, через 15–20 минут его аппликации в раствор: увеличение частоты глициновых миниатюрных событий. Относительно быстрого начального действия обоих лигандов на миниатюрную активность мотонейронов можно предположить, что оно возможно осуществляется в поверхностных структурах мозга лягушки — в перимедулярном сплетении. В этой области, где множество обильных дистальных ветвлений дендритного дерева мотонейронов, а по литературным данным имеются и классические синаптические контакты на тончайших дендритах [35], вполне вероятно пре- и постсинаптическое участие 5-НТ_{5A} рецепторов в модуляции глимТПСП мотонейронов. Такое предположение было выдвинуто нами по завершению серий фармакологических тестов

и выполнению первых иммуногистохимических экспериментов.

Иммуногистохимия

К настоящему времени накопилось большое число исследований серотониновой иннервации спинного мозга земноводных (*Urodella*, *Anurae*). Трейсерные методы, флуоресцентная гистохимия, применение антител к серотонину выявили распределение серотониновой иннервации в спинном мозге *Rana catesbiana*, *R. pipiens*, *Xenopus laevis* [36]. Однако на рисунках-схемах расположения и плотности серотониновых ветвлений в спинном мозге обнаруживаются различия. Места обитания земноводных животных, питание, размножение различные. Это приводит к разнообразным адаптивным приспособлениям особей разных видов, в том числе бесхвостых земноводных. Адаптации связаны с изменениями электрических характеристик нейронов, связей и их модуляций. Проведенное нами флуоресцентное иммуногистохимическое исследование распределения 5-НТ+ir элементов в спинном мозге озерной лягушки выявило картину, отражающую возможное интенсивное 5-НТ влияние на функционирование нервных цепей, составляющих центральные паттерн генераторы (CPG) и на активность мотонейронов.

Нами показаны источники серотонина не только супраспинальные, 5-НТ+ir нейроны ядер шва, но и интраспинальные 5-НТ+ir нейроны (ISN). Их значительное число располагается в торакальных сегментах, меньшее — в поясничном утолщении, как и у иглистого тритона *Pleurodeles waltl* [37]. На основании распределения ISN в спинном мозге тритона, авторы сделали вывод, что их высокая плотность в торакальном отделе не коррелирует с появлением конечностей, т. е. ISN тритона участвуют в модуляции сокращения туловищных мышц (axial CPGs). По нашим данным у озерной лягушки *R. ridibunda* на одном срезе области вентральной комиссуры поясничного отдела ISN встречаются по два, имеют разветвленные отростки в вентромедиальной области спинного мозга. Эта область пронизана дендритами и аксонами поясничных мотонейронов, маркированных хлоридом кобальта, пероксидазой хрена, нейробиотином или биоцитином [38–40]. Однако контакты немаркированных ISN с мотонейронами или инterneйронами в нашей работе идентифицировать не представлялось возможным.

Схема распределения терминальных полей нервных волокон, содержащих индоламин и выявленных с помощью флуоресцентной иммуногистохимии в поясничном сегменте спинного мозга лягушки *R. pipiens*, приведена Соллером [41]. Его сравнительная оценка уровня интенсивности

флуоресценции представлена в пределах относительных значений 0–4. Мы, используя реактив фирмы Immunostar (anti-5-НТ) и применяя программу ImageJ для анализа и оценки яркости флуоресценции, получили данные о более контрастных её градациях в поясничном отделе спинного мозга *R. ridibunda*. Например, измерен в 10 раз более яркий сигнал в латеральном перимедулярном сплетении по сравнению с сигналом в вентромедиальном канатике и в 4 раза — с сигналом области моторного ядра (рис. 7б, с). Высоковероятной зоной контактов 5-НТ+ir волокон с поясничными мотонейронами, с их тончайшими дистальными дендритами, может являться перимедулярное сплетение (рис. 7j). Эту область спинного мозга *R. esculenta* изучал Антал с соавт., реконструировал классические синаптические контакты неидентифицированных терминалей с дендритами меченых мотонейронов по серийным ультратонким срезам [35]. Кроме возможных контактов 5-НТ+ir волокон с дистальными участками в перимедулярном сплетении мозга *R. ridibunda* 5-НТ+ir утолщения или бутоны видны на телах мотонейронов, проксимальных дендритах и дендритах высших порядков ветвления в латеральном и вентральном канатике (рис. 7). По нашим наблюдениям присутствие утолщений 5-НТ волокон на соматической мембране разных мотонейронов неравномерно: у одних — редкие или почти их нет, другие окружены их цепочками.

Детальные трехмерные реконструкции расположения серотониновых бутонов на идентифицированных мотонейронах шейных мышц кошки были выполнены Монтанж и Маратта [42, 43]. Среднее число 5-НТ контактов на мотонейроне экстензора составляло 1586 при общей средней длине дендритов 87 мм (87296 мкм) и площади мембраны мотонейронов 0,5 мм² (529002 мкм²) [42]. Позже Маратта на трехмерных реконструкциях мотонейронов шейной мышцы флексора привел меньшее среднее число 5-НТ контактов — 793 при средней общей длине дендритов 74 мм (74.005 мкм), а площади мембраны мотонейронов также около 0.5 мм² (541921 мкм²) [43]. На удаленных участках дендритного дерева мотонейронов мышцы-флексора кошки (от 1500 до 1750 мкм от сомы) рассчитано большее нормализованное число плотности контактов — 1.5 по сравнению с зонами в радиусе до 250 мкм от сомы — 0.93. Наши трехмерные реконструкции меченых пероксидазой хрена и нейробиотином поясничных мотонейронов лягушки показали подобное значение средней длины дендритов 4-х клеток около 82 мм (81750 мкм), а так как значительная доля дендритных деревьев — тончайшие веточки, то площадь поверхностной мембраны, соответственно, в 2.5 раза меньше около 0.2 мм² (0.1972 мм²) [40]. Число и плотность распре-

деления 5-НТ окончаний на мембране мотонейрона лягушки неизвестно. По результатам нашего иммуногистохимического исследования при высокой флуоресценции 5-НТ ветвлений в области перимедулярного плексуса закономерно предполагать высокую вероятность **постсинаптического** влияния 5-НТ также на дистальных дендритах мотонейронов лягушки. Есть основание предполагать и участие в серотониновой модуляции множества астроцитарных отростков, заполняющих эту область, но никаких данных о 5-НТ рецепторной оснащенности её у амфибий нет.

По литературным данным в сетчатке лягушки показано большое разнообразие различных типов рецепторов серотонина, 5-НТ_{5A} рецептор в том числе, не только в волокнах, нейронах, фоторецепторах, но и в глии [26]. Многочисленность рецепторов дает авторам основание считать, что сетчатка чрезвычайно чувствительна к серотонину: “создается впечатление, что сетчатка устроена так, чтобы “улавливать” каждую высвободившуюся молекулу серотонина”. Селада с соавт. по результатам многих исследований на млекопитающих представляет различное распределение двух других подтипов 5-НТ рецепторов на пирамидном нейроне медиальной префронтальной коры: апикальные дендриты обогащены рецепторами 5-НТ_{2A}, где они могут способствовать входу АМПА, а на аксонном холмике локализуются рецепторы 5-НТ_{1A}, возможно, вместе с ГАМК_A-рецепторами. [44].

Известно, что применение иммуногисто- и цитохимических методов исследования может давать противоречивые результаты на одном животном, в одних и тех же структурах мозга, в зависимости от используемых антител [45]. Важно также отметить, что после работ 2-х групп исследователей распределения 5-НТ_{5A} рецепторов в спинном мозге крысы [6, 7], эти методы не применялись на других позвоночных. Вероятно, и данные о незначительном содержании мРНК рецепторов 5-НТ_{5A} в спинном мозге человека не вдохновляли исследователей на решение задач об участии 5-НТ_{5A} рецептора в модуляции моторного выхода (НРА-2021). На рыбке тилапии с использованием транскриптомики продемонстрировано, что можно собирать мРНК высокого качества из одиночных Маутнеровских нейронов [21]. Было показано, что у этого высокосоциального позвоночного с регулируемым импульсным торможением в слуховой цепи при реакции испуга и убегания среди подмножества подтипов 5НТ рецепторов в латеральном дендрите Маутнеровского нейрона экспрессируется 5-НТ_{5A} рецептор.

В нашей работе применение кроличьих поликлональных антител против 5-НТ_{5A}R не показало положительную иммунореактивность в самой богатой зоне 5-НТ иннервации, перимедулярном

сплетении спинного мозга лягушки (рис. 9а, d, f). Сомы и дендриты меченых биоцитином мотонейронов, которые можно проследить на срезах, имеют редкую в виде точек или зерен 5-HT_{5A}Rlike+ флуоресценцию (рис. 9b – c, g), возможный морфологический субстрат для экспрессии 5-HT_{5A} рецепторов на мотонейронах лягушки и постсинаптического участия в подавлении глимТПСР. Общая 5-HT_{5A}Rlike+ зернистость видна в нейропиле серого и белого вещества, как возможное присутствие в глиальных клетках, со значительным превышением плотности сигнала в белом веществе (рис. 9). Обнаруживается четкий сигнал в отдельных миелиновых кольцах PV+ir волокон в дорсальном роге, дорсомедиальном и вентральном канатиках (рис. 8). Полоски и кольца миелина ещё более контрастно и ярко выделяются на препаратах с ретроградным маркированием мотонейронов биоцитином через всасывающий электрод с длительной стимуляцией вентрального корешка. 5-HT_{5A}Rlike+ миелиновые профили видны не только в вентральном канатике, но и в дорсальном роге, в области входа дорсальнокорешковых афферентов в спинной мозг (рис. 9а, d, f).

Возможно, такой способ маркирования мотонейронов выявил результат их опасной стимуляции, включающей цепь обратной связи через возвратные коллатерали мотонейронов. Возвратные коллатерали в спинном мозгу лягушек были выявлены [46], детально прослежены для их трехмерной реконструкции [44, 47, 48]. По возвратным коллатералям сигналы поступают не только росто-каудально в моторную колонну, но и дорсально, в интермедиальную область серого вещества спинного мозга. Показано, что у крыс в этой области расположено множество тормозных глицинергических интернейронов [49]. Тормозные интернейроны V1 и V2b основные участники-компоненты CPG, который координирует активность флексор – экстензор мотонейронов [50].

В электронномикроскопическом исследовании синапсов в спинном мозге лягушки *Rana temporaria* с помощью метода двойной иммунной метки в сочетании с двумя антителами к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК) и глицину показан высокий процент распределения из найденных тормозных синапсов на сомах, дендритах мотонейронов, первичных афферентных аксонах, иммунореактивных к обеим аминокислотам [51]. Экспрессия 5-HT_{5A} рецепторов в этих синапсах могла бы являться структурным базисом **пресинаптического** модулирующего влияния на глимТПСР в поясничных мотонейронах, выявленное нами в фармакологических тестах на срезах-сегментах спинного мозга лягушки.

Присутствие яркого сигнала именно в миелине можно объяснить, обратившись снова к цепям об-

ратной связи активности мотонейронов в спинном мозге. Известно, что по ним не только передаются сигналы о параметрах активности мотонейронов в высшие центры, но и сигналы, вызывающие изменение активности дорсальнокорешковых афферентных волокон в случае опасности или бесполезности совершаемого движения. Модуляция возбудимости может осуществляться через сложный путь аксо-аксональных контактов афферентных волокон [52]. На личинках рыб *Danio rerio* с помощью кальциевого имиджининга показано критическое участие радиальной астроглии для остановки неэффективного действия и дальнейшего изменения поведения особи [49]. Другие исследования также указывают на то, что глиальные клетки являются ключевыми регуляторами функции нервной цепи, а среди них и миелинизирующая глия в ЦНС, олигодендроциты [53–55]. Суммируя с соавторами приводят схему-таблицу аксональных субдоменов, их возможные модификации и предполагаемые эффекты на физиологию аксона [54]. Олигодендроциты реагируют на активность нейронов, и, в свою очередь, настраивают нейрофизиологическую функцию, изменяя коренным образом проводящие свойства аксонов. Показано, что в нодальной-паранодальной зоне длина перехвата Ранвье и плотность ионных каналов могут меняться при изменениях в миелине. Обобщающие схемы представляют эту область аксона с экспрессией ионных каналов, транспортеров, щелевых контактов, паранодальных и околопаранодальных протеинов, нейрофасцина, контактина и протеина, связанного с контактином (Caspr). Caspr2 точно локализуется в околопаранодальной области аксона с Shaker-подобными K⁺ каналами, где специфически связывается с Kv1.1, Kv1.2 и их субъединицей Kvβ2 [56]. Калво с соавт. исследовал состав и распределение калиевых каналов шейкерного типа (каналы Kv1) в пределах перехватов Ранвье миелинизированных аксонов после повреждения [57]. Они показали, что экспрессия в норме каналов Kv1.1 и 1.2, локализованных в околопаранодальном участке, после повреждения была заметно снижена. Напротив, Kv1.4 и 1.6, которые едва обнаруживались в наивном состоянии, демонстрировали повышенную экспрессию в околопаранодальном и паранодальном участках после повреждения как у крыс, так и у людей.

Впервые о регистрации спонтанной синаптической активности первичных афферентов спинного мозга озерной лягушки, ди- и полисинаптически связанных с мотонейронами, было доложено в работах Шаповалова и Ширяева [58, 59]. Но только значительно позже стали уделять внимание этой стороне функционирования аксонов в ЦНС, признавая наряду с цифровой сигнализацией “все или ничего”, аналоговую [60]. Обнаруженный на-

ми яркий сигнал 5-HT_{5A} Rlike+ в миелине волокон в дорсальном роге, а также в вентральном и медиальном канатиках спинного мозга после длительной стимуляции вентрального корешка мог появиться через сработавшую цепь обратной связи активности мотонейронов. Возможно, в норме рецепторы 5-HT_{5A} в олигодендроцитах и миелине в спинном мозге лягушки экспрессированы интернализированными. При функционально опасных сигналах цепей рецепторы 5-HT_{5A} миелина принимают активную форму, меняющую мембранные свойства чувствительных волокон в пара- и околопаранодальных областях. В гиппокампе на мышах показано, что парвальбуминовые интернейроны экспрессируют функционально молчащие рецепторы 5-HT_{5A}, которые транслоцируются на клеточную мембрану и становятся активными при хроническом, но не остром лечении селективным ингибитором обратного захвата серотонина [61]. Таким образом, 5-HT_{5A} рецептор активно включается в арсенал фармакологических мишеней. Создается основанный на структуре дизайн набора химических зондов для серотонинового рецептора 5-HT_{5A} [29].

В нашей работе обнаружена реакция в миелине входящих в спинной мозг дорсальнокорешковых афферентных волокон на опасную вызванную активность мотонейронов появлением яркого 5-HT_{5A} Rlike+ сигнала. Подобный сигнал-ответ также виден в миелине моторных аксонов, длительно стимулируемых через вентральный корешок, и в миелине отдельных волокон вентромедиального канатика, где локализованы нисходящие вестибуло-спинальные тракты амфибий. Появилась информация о новых подходах исследователей к характеристике и нарушению миелина в контексте управляемых нейронных цепей по мере их созревания на модели личинки *Danio rerio* [55]. Включение тормозящих сигналов через модуляцию при опасности или при бесполезных попытках совершить действие дает путь к новому поведению животного, подстраиванию к возникшей ситуации [49]. На примере беспозвоночных животных Лиллвис и Катц [62] обсуждают роль нейромодуляции в эволюции механизмов поведения, поскольку она способна обеспечить различные результаты совместного использования компонентов нейронных цепей нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показана комбинированная вовлеченность изучаемого подтипа серотониновых рецепторов (5-HT_{5A}) в подавлении глимТПСР в поясничных мотонейронах на пре-, постсинаптическом уровне. Результаты иммунофлуоресцентного исследования обильной серотониновой

иннервации спинного мозга лягушки и обнаружения 5-HT_{5A} Rlike+ сигнала на соме и дендритах поясничных мотонейронов подтверждают постсинаптическое распределение 5-HT_{5A} рецепторов. Обсуждается участие экстрасинаптических рецепторов 5-HT_{5A} в функционировании цепей обратной связи активности поясничных мотонейронов, возможно, с глиальными посредниками.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Н.М.Ч. — планирование экспериментов, сбор данных, обработка данных, приготовление графиков, рисунков, написание статьи, Д.С.В. — обсуждение результатов, редактирование статьи, Н.П.В. — идея работы, обсуждение результатов и редактирование статьи.

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 биоэтике ИЭФБ РАН (протокол 6—3/2022 от 23 июня 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме государственного задания НИР 075—00967—23—00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N, Hen R (1992) The mouse 5HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT_{ID} receptor family. EMBO J 11: 4779—4786. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05583.x>
2. Rees S, den Daas I, Foord S, Goodson S, Bull D, Kilpatrick G, Lee M (1994) Cloning and characterisation of the human 5-HT_{5A} serotonin receptor. FEBS Lett 355: 242—246. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01209-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01209-1)
3. Grailhe R, Grabtree GW, Hen R (2001) Human 5-HT₅ receptors: the 5-HT_{5A} receptor is functional but the 5-HT_{5B} receptor was lost during mammalian evolution. Eur J Pharmacol 418: 157—167. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00933-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00933-5)
4. Barnes NM, Ahern GP, Becamel C, Bockaert J, Camilleri M, Chaumont-Dubel S, Claeyssen S, Cunningham KA, Fone KC, Gershon M, Di Giovanni G, Goodfellow NM,

- Halberstadt AL, Hartley RM, Hassaine G, Herrick-Davis K, Hovius R, Lacivita E, Lambe EK, Leopoldo M, Levy FO, Lummis SCR, Marin P, Maroteaux L, McCreary AC, Nelson DL, Neumaier JF, Newman-Tancredi A, Nury H, Roberts A, Roth BL, Roumier A, Sanger GJ, Teitler M, Sharp T, Villalón CM, Vogel H, Watts SW, Hoyer D (2021) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol Rev* 73: 310–520.
<https://doi.org/10.1124/pr.118.015552>
5. Oliver K, Kinsey A, Wainwright A, Sirinathsinghji DJ (2000) Localization of 5-HT_{5A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* 867: 131–142.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02273-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02273-3)
 6. Doly S, Fischer J, Brisorgueil M-J, Vergé D, Conrath M (2004) 5-HT_{5A} receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J Comp Neurol* 476: 316–329.
<https://doi.org/10.1002/cne.20214>
 7. Xu C, Giuliano F, Sun XQ, Brisorgueil M-J, Leclerc P, Vergé D, Conrath M (2007) Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{5A} receptors are expressed by different motoneuron populations in rat Onuf's nucleus. *J Comp Neurol* 502: 620–634.
<https://doi.org/10.1002/cne.21344>
 8. Hurley PT, McMahon RA, Fanning P, O'Boyle KM, Rogers M, Martin F (1998) Functional coupling of a recombinant Human 5-HT_{5A} receptor to G-proteins in HEK-293 cells. *Br J Pharmacol* 124: 1238–1244.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701928>
 9. Francken BJB, Jurzak M, Vanhauwe JFM, Luyten WHML, Leysen JE (1998) The human 5-HT_{5A} receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur J Pharmacol* 361: 299–309.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00744-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00744-4)
 10. Francken BJ, Jossion K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WH, Leysen JE (2000) Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Mol Pharmacol* 57: 1034–1044.
 11. Thomas D (2006) 5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target. *Pharmacol Ther* 111: 707–714.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.006>
 12. Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JNC, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ (2006) SB-699551-A (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}-4-biphenyl)methyl]propanamide dihydrochloride), a novel 5-HT_{5A} receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role. *Neuropharmacology* 51: 566–577.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.019>
 13. Yamazaki M, Harada K, Yamamoto N, Yarimizu J, Okabe M, Shimada T, Ni K, Matsuoka N (2014) ASP5736, a novel 5-HT_{5A} receptor antagonist, ameliorates positive symptoms and cognitive impairment in animal models of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 24: 1698–1708.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.07.009>
 14. Muñoz-Islas E, Vidal-Cantú GC, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Quiñonez-Bastidas GN, Pineda-Farías JB, Barragán-Iglesias P, Granados-Soto V (2014) Spinal 5-HT_{5A} receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 120: 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.02.001>
 15. Avila-Rojas SH, Velázquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farías JB, Granados-Soto V (2015) Role of spinal 5-HT_{5A} and 5-HT_{1A/1B/1D} receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res* 1622: 377–385.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.06.043>
 16. Vidal-Cantú GC, Jiménez-Hernández M, Rocha-González HI, Villalón CM, Granados-Soto V, Muñoz-Islas E (2016) Role of 5-HT_{5A} and 5-HT_{1B/1D} receptors in the antinociception produced by ergotamine and valerenic acid in the rat formalin test. *Eur J Pharmacol* 781: 109–116.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.009>
 17. Curtin PCP, Medan V, Neumeister H, Bronson DR, Preuss T (2013) The 5-HT_{5A} Receptor Regulates Excitability in the Auditory Startle Circuit: Functional Implications for Sensorimotor Gating. *J Neurosci* 33: 10011–10020.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4733-12.2013>
 18. Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001) Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 234–258.
<https://doi.org/10.1007/s002130100810>
 19. Braff DL (2010) Prepulse Inhibition of the Startle Reflex: A Window on the Brain in Schizophrenia. pp 349–371.
 20. Arias B, Collier D, Gastó C, Pintor L, Gutiérrez B, Vallès V, Fañanás L (2001) Genetic variation in the 5-HT_{5A} receptor gene in patients with bipolar disorder and major depression. *Neurosci Lett* 303: 111–114.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01701-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01701-3)
 21. Whitaker KW, Neumeister H, Huffman LS, Kidd CE, Preuss T, Hofmann HA (2011) Serotonergic modulation of startle-escape plasticity in an African cichlid fish: a single-cell molecular and physiological analysis of a vital neural circuit. *J Neurophysiol* 106: 127–137.
<https://doi.org/10.1152/jn.01126.2010>
 22. Ankri N, Legendre P, Faber DS, Korn H (1994) Automatic detection of spontaneous synaptic responses in central neurons. *J Neurosci Methods* 52: 87–100.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90060-4)
 23. Hancock MB (1984) Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining. *J Histochem Cytochem* 32: 311–314.
<https://doi.org/10.1177/32.3.6198359>
 24. Romeis B (1953) Microscopische technik. M Issue FL, Transl 414–415.
 25. Kreiling JA, Stephens RE, Reinisch CL (2005) A mixture of environmental contaminants increases cAMP-dependent protein kinase in *Spisula* embryos. *Environ Toxicol Pharmacol* 19: 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.02.007>
 26. Liliya V, Desislava Z, Petia K (2017) Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Receptors 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{3A},

- 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ in Frog and Turtle Retina: an Immunofluorescence Study. *J Adv Mol Biol* 1. <https://doi.org/10.22606/jamb.2017.11003>
27. *Stensaas LJ, Stensaas SS* (1967) Astrocytic neuroglial cells, oligodendrocytes and microgliaocytes in the spinal cord of the toad. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 84: 473–489. <https://doi.org/10.1007/BF00320863>
28. *Stensaas LJ, Stensaas SS* (1968) Astrocytic neuroglial cells, oligodendrocytes and microgliaocytes in the spinal cord of the toad. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 86: 184–213. <https://doi.org/10.1007/BF00348524>
29. *Levit Kaplan A, Strachan RT, Braz JM, Craik V, Slocum S, Mangano T, Amabo V, O'Donnell H, Lak P, Basbaum AI, Roth BL, Shoichet BK* (2022) Structure-Based Design of a Chemical Probe Set for the 5-HT_{5A} Serotonin Receptor. *J Med Chem* 65: 4201–4217. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02031>
30. *Tan Y, Xu P, Huang S, Yang G, Zhou F, He X, Ma H, Xu HE, Jiang Y* (2022) Structural insights into the ligand binding and Gi coupling of serotonin receptor 5-HT_{5A}. *Cell Discov* 8: 50. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00412-3>
31. *Kalinina NI, Zaitsev AV, Vesselkin NP* (2018) Presynaptic serotonin 5-HT_{1B/D} receptor-mediated inhibition of glycinergic transmission to the frog spinal motoneurons. *J Comp Physiol A* 204: 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1244-y>
32. *Калинина НИ, Веселкин НП* (2022) Участие 5-HT₁ и 5-HT_{5A} рецепторов в модуляции синаптической передачи и внутренних свойств мембраны спинальных мотонейронов лягушки (*Rana ridibunda*). *Российский физиологический журнал им И М Сеченова* 108: 85–97. <https://doi.org/10.31857/S0869813922010071>
33. *Krobert KA, Andressen KW, Levy FO* (2006) Heterologous desensitization is evoked by both agonist and antagonist stimulation of the human 5-HT₇ serotonin receptor. *Eur J Pharmacol* 532: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.039>
34. *De Deurwaerdère P, Bharatiya R, Chagraoui A, Di Giovanni G* (2020) Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology* 168: 107967. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107967>
35. *Antal M, Kraftsik R, Székely G, Van Derloos H* (1986) Distal dendrites of frog motor neurons: a computer-aided electron microscopic study of cobalt-filled cells. *J Neurocytol* 15: 303–310. <https://doi.org/10.1007/BF01611433>
36. *ten Donkelaar HJ* (1998) Anurans. In: *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin. Heidelberg. 1151–1314.
37. *Branchereau P, Rodriguez JJ, Delvolvé I, Abrous DN, Le Moal M, Cabelguen JM* (2000) Serotonergic systems in the spinal cord of the amphibian urodele *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 419: 49–60. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(20000327\)419:1<49::aid-cne3>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(20000327)419:1<49::aid-cne3>3.0.co;2-#)
38. *Székely G* (1976) The morphology of motoneurons and dorsal root fibers in the frog's spinal cord. *Brain Res* 103: 275–290. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90799-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90799-X)
39. *Birinyi A, Antal M, Wolf E, Székely G* (1992) The Extent of the Dendritic Tree and the Number of Synapses in the Frog Motoneuron. *Eur J Neurosci* 4: 1003–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00127.x>
40. *Dityatev AE, Chmykhova NM, Dityateva G V, Babalian AL, Kleinle J, Clamann HP* (2001) Structural and physiological properties of connections between individual reticulospinal axons and lumbar motoneurons of the frog. *J Comp Neurol* 430:433–447. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010219\)430:4<433::aid-cne1041>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010219)430:4<433::aid-cne1041>3.0.co;2-z)
41. *William Soller R* (1977) Monoaminergic inputs to frog motoneurons: An anatomical study using fluorescence histochemical and silver degeneration techniques. *Brain Res* 122: 445–458. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90456-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90456-5)
42. *Montague SJ, Fenrich KK, Mayer-Macaulay C, Maratta R, Neuber-Hess MS, Rose PK* (2013) Nonuniform distribution of contacts from noradrenergic and serotonergic boutons on the dendrites of cat splenius motoneurons. *J Comp Neurol* 521: 638–656. <https://doi.org/10.1002/cne.23196>
43. *Maratta R, Fenrich KK, Zhao E, Neuber-Hess MS, Rose PK* (2015) Distribution and density of contacts from noradrenergic and serotonergic boutons on the dendrites of neck flexor motoneurons in the adult cat. *J Comp Neurol* 523: 1701–1716. <https://doi.org/10.1002/cne.23765>
44. *Chmykhova NM, Adanina VO, Karamian OA, Kozhanov VM, Vesselkin NP, Clamann H-P* (2005) Comparative study of spinal motoneuron axon collaterals. *Brain Res Bull* 66: 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.08.008>
45. *Geurts FJ, De Schutter E, Timmermans J-P* (2002) Localization of 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat* 24: 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(02\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(02)00020-0)
46. *Grantyn R, Shapovalov AI, Shiriaev BI* (1984) Tracing of frog sensory-motor synapses by intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Physiol* 349: 441–458. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015166>
47. *Chmykhova NM, Babalian AL* (1992) [A light microscopic study of the axonal collaterals of the lumbar motoneurons in the spinal cord of the frog *Rana ridibunda*]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 28: 244–253.
48. *Chmykhova NM, Babalian AL* (1993) Structure of recurrent axon collaterals of frog lumbar motoneurons as revealed by intracellular HRP labelling. *Brain Res* 603:289–295. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91250-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91250-v)
49. *Hossaini M, French PJ, Holstege JC* (2007) Distribution of glycinergic neuronal somata in the rat spinal cord. *Brain Res* 1142: 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.078>

50. Zhang J, Lanuza GM, Britz O, Wang Z, Siembab VC, Zhang Y, Velasquez T, Alvarez FJ, Frank E, Goulding M (2014) V1 and V2b Interneurons Secure the Alternating Flexor-Extensor Motor Activity Mice Require for Limbed Locomotion. *Neuron* 82: 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.013>
51. Adanina VO, Rio JP, Adanina AS, Reperant J, Veselkin NP (2010) GABA- and glycine-immunoreactive synapses in spinal cord of frog *Rana temporaria*. *Cell tissue biol* 4: 380–390. <https://doi.org/10.1134/S1990519X10040115>
52. Ashrafi S, Betley JN, Comer JD, Brenner-Morton S, Bar V, Shimoda Y, Watanabe K, Peles E, Jessell TM, Kaltschmidt JA (2014) Neuronal Ig/Caspr Recognition Promotes the Formation of Axoaxonic Synapses in Mouse Spinal Cord. *Neuron* 81: 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.060>
53. Mu Y, Bennett D V., Rubinov M, Narayan S, Yang C-T, Tanimoto M, Mensh BD, Looger LL, Ahrens MB (2019) Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior. *Cell* 178: 27–43.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.050>
54. Nelson AD, Jenkins PM (2017) Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front Cell Neurosci* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00136>
55. Suminaite D, Lyons DA, Livesey MR (2019) Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia* 67: 2050–2062. <https://doi.org/10.1002/glia.23665>
56. Auer F, Schoppik D (2022) The Larval Zebrafish Vestibular System Is a Promising Model to Understand the Role of Myelin in Neural Circuits. *Front Neurosci* 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.904765>
57. Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E (1999) Caspr2, a New Member of the Neurexin Superfamily, Is Localized at the Juxtaparanodes of Myelinated Axons and Associates with K⁺ Channels. *Neuron* 24: 1037–1047. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81049-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81049-1)
58. Calvo M, Richards N, Schmid AB, Barroso A, Zhu L, Ivulic D, Zhu N, Anwandter P, Bhat MA, Court FA, McMahon SB, Bennett DL (2016) Altered potassium channel distribution and composition in myelinated axons suppresses hyperexcitability following injury. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12661>
59. Shapovalov AI, Shiriaev BI (1979) Spontaneous miniature potentials in primary afferent fibres. *Experientia* 35: 348–349. <https://doi.org/10.1007/BF01964345>
60. Tamarova ZA, Shapovalov AI, Shiriaev BI (1981) [Synaptic effects in the endings of individual primary afferent fibers mono- and polysynaptically connected to spinal motor neurons]. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* 67: 1511–1520.
61. Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon Physiology. *Physiol Rev* 91: 555–602. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2009>
62. Sagi Y, Medrihan L, George K, Barney M, McCabe KA, Greengard P (2020) Emergence of 5-HT_{5A} signaling in parvalbumin neurons mediates delayed antidepressant action. *Mol Psychiatry* 25: 1191–1201. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0379-3>
63. Lillvis JL, Katz PS (2013) Parallel Evolution of Serotonergic Neuromodulation Underlies Independent Evolution of Rhythmic Motor Behavior. *J Neurosci* 33: 2709–2717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4196-12.2013>

SEROTONINERGIC INNERVATION OF THE FROG SPINAL CORD AND INVOLVEMENT OF 5-HT_{5A} RECEPTORS IN THE MODULATION OF MINIATURE GLYCINERGIC POSTSYNAPTIC POTENTIALS OF LUMBAR MOTONEURONS

N. M. Chmykhova^{a, #}, D. S. Vasilev^a and N. P. Veselkin^a

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

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

The role of serotonin 5-HT_{5A} receptors in the modulation of miniature inhibitory synaptic activity was studied using intracellular recording of miniature glycinergic inhibitory postsynaptic potentials (glymIPSPs) in the lumbar motoneurons of the isolated spinal cord of the frog *Rana ridibunda*. In a medium containing TTX, CNQX, DAP5, bicuculline, application of the serotonin receptor agonist 5-CT (10 μM) with high affinity for 5-HT_{5A} led to a suppression of frequency by 86%, as well as the disappearance of high-amplitude glymIPSPs (200–500 μV) at preservation of rare potentials with an amplitude of about 100 μV. This effect indicates the possibility of pre- and postsynaptic action of 5-CT at such a concentration, not limited to its effect only on 5-HT_{5A} receptors. The addition of methysergide, a blocker of 5-HT_{1,2} receptors, to the medium reduced the average frequency of glymIPSPs by 67%, the frequency of high-amplitude events by 5 times and their average amplitude by 20%, which may indicate the participation of 5-HT_{5A} receptors in pre- and postsynaptic modulation in glymIPSPs of motoneurons. Application of 1 μM 5-CT led to a decrease in the frequency of glymIPSPs by 49% without a noticeable change in the amplitude of glymIPSPs, and the subsequent introduction of SB-699551, a selective antagonist of 5-HT_{5A} receptors, into the solution increased the frequency of events by 41%, which confirms the involvement of

5-HT_{5A} receptors in presynaptic modulation of glymIPSPs. Immunofluorescence study showed that supra- and intraspinal 5-HT⁺ neurons produce abundant branching in the lumbar region with the possibility of forming axosomatic contacts with labeled motoneurons and axodendritic contacts on the proximal and distal portions of their dendrites. It is also possible to form contacts in the perimedullary plexus, penetrated by the distal dendrites of motoneurons and astrocytic processes. This represents the structural basis for post-, pre- and extrasynaptic modulation of motoneuron activity by serotonin. The possibility of postsynaptic modulation of motoneuron activity through 5-HT_{5A} receptors is confirmed by the point-like fluorescence of the 5-HT_{5A}Rlike+ signal on the dendrites and bodies of labeled motoneurons, which is present in the neuropil but absent in the perimedullary plexus. Double labeling with antibodies to the 5-HT_{5A} receptor and the Ca²⁺-binding protein, parvalbumin, revealed 5-HT_{5A}Rlike+ localization in the myelin sheath of dorsal and ventromedial funiculi fibers. In preparations after long-term stimulation of the ventral roots through suction electrodes when labeling motor neurons with biocytin, a bright 5-HT_{5A}Rlike+ signal was detected in the myelin of motor axons, dorsal root fibers entering the brain in the region of the dorsal horn and individual fibers of the ventromedial funiculus. The participation of extrasynaptic 5-HT_{5A} receptors in the functioning of feedback circuits of lumbar motoneuron activity, with the possible participation of glial elements in these circuits, is discussed.

Key words: spinal motoneuron, serotonin innervation, 5-HT_{5A} receptor, miniature glycinergic activity, frog

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ МИОГЕНЕЗА У СЕГОЛЕТОК АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*Salmo salar* L.) В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ ПРИ ВЛИЯНИИ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ И КОРМЛЕНИЯ

© 2024 г. М. В. Кузнецова^{1,*}, М. А. Родин¹, Н. С. Шульгина¹,
М. Ю. Крупнова¹, А. Е. Курицын¹, С. А. Мурзина¹, Н. Н. Немова¹

¹ Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр
Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

* e-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Исследовали уровень экспрессии генов тяжелой и легкой цепи миозина (*myhc*, *mlc-2*), транскрипционных факторов регуляции миогенеза (*myf5*, *myog*, паралога *myod1*), паралога миостатина и инсулиноподобных факторов роста (*igf1* и *igf2*) в мышцах сеголеток лосося, искусственно выращиваемых при разных режимах освещения и кормления при постоянной температуре воды в регионе Северная Осетия-Алания. Совокупное действие режимов освещения и питания отражалось на экспрессии генов *myhc*, *mlc-2*, *myf5*, *myod1a*, *myod1b*, *myod1c*. Так особи, выращиваемые при постоянном режиме освещения, отличались более высокими уровнями экспрессии генов *myf5*, *myhc* и *mlc-2* по сравнению с рыбами при естественном освещении, что так же соответствовало их темпам роста. Экспрессия генов IGF по-разному изменялась на протяжении эксперимента: уровень экспрессии гена *igf1* увеличивался, а гена *igf2* — сначала увеличивался через месяц исследования, затем уменьшался. Результаты свидетельствуют о различиях в процессах регуляции миогенеза в зависимости от условий освещения и кормления.

Ключевые слова: фотопериод, режим кормления, атлантический лосось, уровень экспрессии генов мышечных белков

DOI: 10.31857/S0044452924010047, EDN: ZFVLRG

ВВЕДЕНИЕ

Постэмбриональный рост мышц у рыб, в отличие от роста у птиц и млекопитающих, определяется не только гипертрофией — увеличением размера существующих мышечных волокон, но также включает гиперплазию — увеличение количества мышечных волокон за счет повторного образования новых миотуб [1]. Миогенез контролируется последовательной экспрессией специфических миогенных регуляторных факторов транскрипции (МРФ): *MyoD*, *Myf5*, миогенин (*MyoG*) и *MRF4* [1]. В процессе миогенеза ключевую ролью *MyoD* и *Myf5* являются спецификация и пролиферация миобластов, тогда как миогенин и *MRF4* отвечают за их дифференцировку [2]. Регуляция миогенеза у рыб транскрипционным фактором *MyoD* усложняется наличием паралогов. В результате тетраплоидизации генома в ходе эволюции ген *myod1* у лососевых представлен тремя функциональными паралогами: *myod1a*, *myod1b* и *myod1c*, которые

экспрессируются независимо друг от друга на разных стадиях развития и в различных типах волокон [3, 4]. Паралоги *MyoD* дифференцированно функционируют во время созревания миотуб, и это позволяет предположить, что *myod1b* и *myod1c* в первую очередь экспрессируются в пролиферирующих клетках, а *myod1a* — в дифференцирующихся клетках. Это свидетельствует об их субфункционализации после дубликации всего генома атлантического лосося [3].

Последовательная экспрессия МРФ приводит к экспрессии генов ряда структурных мышечных белков, в том числе миозина, основного компонента мышечных волокон. Показано, что уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*myhc*) отражает накопление мышечных белков и темпы роста некоторых видов рыб: форели *Oncorhynchus mykiss* [5], атлантического лосося *Salmo salar* [6], пятнистой зубатки *Anarhichas minor* [7], светлого судака *Sander vitreus* [8]. Также показано, что

корреляция темпов роста с уровнем экспрессии гена легкой цепи миозина *mlc-2* была выше у радужной форели [9] и камбалы *Senegalenses sole* [10].

Инсулиноподобные факторы роста (IGF-I и IGF-II) и связанные с ними сигнальные пути играют центральную роль в регуляции роста скелетных мышц у млекопитающих и рыб [11]. Циркулирующие IGF присутствуют в сыворотке крови и в основном секретируются печенью под контролем оси гипоталамус/гормон роста, однако оба гормона также синтезируются локально во многих тканях, включая скелетные мышцы в ответ на внешние и пищевые стимулы [3]. IGF-I и IGF-II способствуют гипертрофическому росту мышц, стимулируя пролиферацию и дифференцировку миогенных клеток, действуя на них аутокринно и паракринно [3, 11]. В отличие от IGF-I, роль IGF-II в метаболизме и росте рыб до конца не изучена. У млекопитающих ген *igf2* экспрессируется главным образом в течение эмбриогенеза, в то время как у рыб на ювенильных и взрослых стадиях жизненного цикла [12].

Рост мышц также контролируется миостатином (MSTN), относящимся к суперсемейству трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), который функционирует как негативный регулятор развития и роста скелетных мышц [13]. MSTN ингибирует пролиферацию и дифференцировку мышечных клеток у млекопитающих [13]. Однако, согласно недавним исследованиям, механизм действия MSTN на рост у рыб, вероятно, отличается от механизма у млекопитающих. MSTN кодируется двумя генами у большинства костистых рыб и четырьмя у лососевых рыб и, как было обнаружено, экспрессируется в мышцах и других тканях. Следовательно, он может выполнять различные функции [13, 14]. У лососевых MSTN представлен генами *mstn 1a*, *mstn 1b*, *mstn 2a* и *mstn 2b* (который является псевдогеном). Исследования на лососевых рыбах показали, что механизмы регуляции роста мышц MSTN зависят от типа мышц, стадии развития и условий питания [14–16].

Определение уровня экспрессии генов МРФ, *igf*, *mstn 1*, миозина в мышцах для описания процессов роста и регуляции миогенеза часто используются в исследованиях влияния температуры, состава корма и режима питания, голодания и последующего восстановления питания на рост лососевых и других видов рыб [10, 17, 18].

Свет — жизненно важный абиотический фактор, который оказывает существенное воздействие на развитие и рост рыб. Прямо или косвенно он влияет на плавательную активность, пищевое поведение, миграцию и размножение рыб, а у лососевых и на наступление периода смолтификации, посредством влияния на эндогенные ритмы и уровни циркулирующих гормонов роста [19–21]. В аква-

культуре удлинение светового дня используется для увеличения скорости роста рыб [22–24]. Удлиненные фотопериоды могут оказывать положительное воздействие на пищевое поведение и рост рыб посредством стимуляции гипоталамо-гипофизарной оси в их мозге, что приводит к увеличению выработки и секреции гормона роста и инсулиноподобного фактора роста [25, 26]. В ответ на изменение продолжительности дня концентрация гормонов и факторов роста меняется, что влияет на регуляцию миогенеза и пролиферацию миогенных клеток [26, 27].

Ранее, в исследованиях влияния фотопериода на молодь лосося при заводском выращивании в условиях северных широт было показано, что постоянное освещение способствовало ускорению роста особей, что сопровождалось изменением уровня экспрессии генов мышечных белков [28–30]. Но продолжительность периода интенсивного роста была ограничена сезонным понижением температуры. В условиях южных регионов появляется возможность выращивания молоди лосося при температуре воды в диапазоне 8–18°C, в отсутствие зимних периодов низких температур, что позволяет рыбе питаться и расти круглый год. Однако отсутствует период белых ночей, характерный для северных широт. Исходя из этого, был поставлен эксперимент по влиянию постоянного освещения на рост и развитие сеголеток лосося *Salmo salar* L. (0+) в условиях аквакультуры в южном регионе России (Республика Северная Осетия-Алания).

Изучение экспрессии основных регуляторных факторов миогенеза и генов, контролирующих рост мышц, а также их паралога в мышцах рыб, выращенных в условиях вариабельности внешних факторов (фотопериода и рациона кормления), позволит получить новые данные о молекулярных механизмах, лежащих в основе роста рыб. Целью данной работы было изучение уровня экспрессии генов миогенеза у сеголеток атлантического лосося в процессе роста, выращиваемых в условиях постоянной температуры воды при воздействии двух режимов фотопериода (постоянного и естественного) в сочетании с разным режимом кормления.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование влияния разных режимов освещения на рост и развитие сеголеток лосося проводили на предприятии ООО “Остров аквакультура” (Республика Северная Осетия-Алания).

Эксперимент подробно расписан в работе Мурзиной с соавт. [31]. Сеголетки лосося (выклев 10–15 марта 2022 г., производитель Benchmark Genetics, Исландия) содержались в выростных

лотках объемом 2.5–2.7 м³, (изначально в количестве 4900 особей/лоток) в условиях непрерывного освещения с августа до начала эксперимента (сентябрь). Кормление проводилось каждые два часа в круглосуточном режиме. С начала сентября сеголеток поделили на три экспериментальные группы по 2 лотка (при средней массе рыб 2.9 грамма в каждом лотке):

- группа № 1 (“24С КК”) – постоянный режим освещения (24С:0Т), круглосуточное кормление (КК);

- группа № 2 (“ЕстФ КД”) – естественный фотопериод (ЕстФ), кормление в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре), через каждые два часа (КД);

- группа № 3 (“24С КД”) – постоянный режим освещения (24С), кормление в светлое время суток так же, как у рыб из группы № 2 (КД).

Лотки с постоянным освещением были оборудованы LED лампами 36W, 6500K. Освещение над поверхностью воды для групп рыб № 1 и № 3 при освещении лампами в темное время суток составило 450–650 lx. Использовали коммерческий корм; расчет объема корма проводили согласно нормам с учетом биомассы. Температура воды была постоянной – 12.5°C. Отход молоди рыб на конец эксперимента составил 24%, 33% и 19% особей в группах “24С КК”, “ЕстФ КД” и “24С КД”, соответственно. Для исследования отбирали сеголеток лосося 6 сентября (до эксперимента), 6 октября и 9 ноября; из каждой группы было взято до 15 особей из лотка. Средние масса и длина особей, взятых для анализа, представлены в таблице 1 [32].

Экспрессия исследуемых генов

Тотальная РНК была выделена из образцов белых скелетных мышц рыб с использованием набора “RNA-extract” (Евроген, Россия). Затем суммарную РНК обрабатывали ДНКазой (Силекс, Россия). Целостность и качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометрически при коэффициенте поглощения 260/280 нм (NanoPhotometer C40-Touch, Implen, Германия). РНК подвергали обратной транскрипции с использованием MMLV-обратной транскриптазы (Евроген, Россия). В дальнейшем

синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Анализ проводили с использованием системы CFX96 Touch system (BioRad, США). Праймеры для гена тяжелой цепи миозина (*myhc*), легкой цепи миозина (*mlc-2*), референсного гена (фактора элонгации-1 (*ef1a*)), генов миогенных регуляторных факторов (миогенина (*myog*), паралога *myod1* (*myod1a*, *myod1b*, *myod1c*), *myf5*, *igf1* и *igf2*, а также паралога миостатина (*mstn1a* и *mstn1b*), подбирали с помощью программы Nucleotide BLAST. Последовательно праймеров приведены в таблице 2. Амплификацию 2 мкл кДНК проводили с использованием 5 мкл набора “5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I” (Евроген, Россия). Протокол ПЦР был следующим: денатурация ДНК – 5 минут при 95°C; повторяющиеся циклы (42): денатурация ДНК – 20 с при 95°C, отжиг праймеров – 30 с при 60°C и элонгация – 30 с при 72°C. Каждый образец был загружен в триплетах. Специфичность реакции ПЦР проверяли по кривым плавления, полученным в соответствии с протоколом диссоциации от 65°C до 97°C. Относительные уровни экспрессии исследуемых генов определяли методом порогового цикла (Ct) и нормализовали по уровню экспрессии референсного гена фактора элонгации (*ef1a*) с использованием метода 2^{-ΔCt} [33]. Данные выражали в единицах относительной экспрессии исследуемого гена (у.ед.).

Исследование выполнено на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

Статистический анализ

Полученные данные были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики. Данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилкса. В связи с отсутствием нормальности распределения статистически значимые различия определяли с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test), апостериорные сравнения между группами проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение. Различия считали статистически

Таблица 1. Средняя масса рыб, используемых для анализа

Группа	6 сентября		6 октября		9 ноября	
	Масса, г	Длина, см	Масса, г	Длина, см	Масса, г	Длина, см
“24С КК”			5.59 ± 0.30	8.01 ± 0.43	11.87 ± 1.74	10.88 ± 0.53
“ЕстФ КД”	3.85 ± 0.45	7.42 ± 0.27	5.92 ± 0.58	8.12 ± 0.23	9.19 ± 1.37	9.19 ± 0.47
“24С КД”			6.11 ± 0.91	8.05 ± 0.40	11.93 ± 1.33	10.13 ± 0.39

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации в ПЦР-РВ

Ген	Последовательность 5'-3'	Размер ампликона, п. о.	Номер в GenBank
<i>ef1a</i>	F: TTGCTGGTGGTGTGTTGGTGAG R: AAACGCTTCTGGCTGTAGGG	154	AF321836.1
<i>myog</i>	F: GTGGAGATCCTGAGGAGTGC R: CTCACCTCGACGACGAGACC	147	DQ452070
<i>myod1a</i>	F: TGGACTGCCTATCAAAACATCC R: TCTCACTCGCTATGGAACC	123	AJ557148
<i>myod1b</i>	F: ATTTTCGTTCCCTGTACCTCTG R: ATGTGTTCTGCTTTCGTTGTAATGG	152	AJ557150
<i>myod1c</i>	F: ACGGCGAAAACTACTACCCTTC R: TAGCTGCTTCGTCTTGCGGA	133	DQ366709.1
<i>myf5</i>	F: ACGCCATCCAGTACATCGAG R: AGTCAACCATGCTGTCGGAG	132	DQ452070
<i>myhc</i>	F: TCTCATCCATAGACGCCATC R: AGTTGACTGCCAAGAAGAGG	159	DN164736
<i>mlc-2</i>	F: TCAACTTCACCGTCTTCCTCAC R: GCCCACAGGTTCTTCATCTCC	190	NM_001123716.1
<i>mstn1a</i>	F: GATTACACGCCATCAAGTCC R: CTCCATCCTTATTGTCATCTCC	159	AJ344158
<i>mstn1b</i>	F: TCTGAGTTTTATGGTTGCTTTCCG R: TTGTGACTTGATGGCGTGTAATC	151	NM_001123634.1
<i>igf1</i>	F: ACAGAGCGTAGGACAGCACAG R: CCACAGAGGCACAGGTAAGG	169	NM_001123623.1
<i>igf2</i>	F: GGAAAACACAAGAATGAAGGTCAA R: CCACCAGCTCTCCTCCACATA	128	NM_001123647.1

Примечание. Последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров (5'-3'), п. о. — пары оснований; *ef1a* — фактор элонгации 1a (референсный ген); *myf5* — фактор миогенеза 5; *myod1* — фактор детерминации миообластов 1; *myog* — миогенин; *myhc* — тяжелая цепь миозина; *mstn* — миоостатин; *igf* — инсулиноподобный фактор роста.

значимыми при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде бокс-плотов с обозначением медиан, верхнего и нижнего квартилей, а также усов, обозначающих минимум и максимум.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные, представленные на рис. 1a, свидетельствуют о том, что уровень экспрессии гена *myhc* был наименьшим в группе “ЕстФ КД” по сравнению с группами круглосуточного освещения: в октябре — по сравнению со значением в группах “24С КК” и “24С КД”, в ноябре — по сравнению с группой “24С КК”. Уровень экспрессии гена *myhc* увеличивался к ноябрю в мышцах рыб из всех исследуемых групп: в “24С КК” — по сравнению с первым и вторым месяцем исследования, в “ЕстФ КД” — по сравнению с предыдущим месяцем, в “24С КД” — по сравнению с первым месяцем исследования (рис. 1a).

Уровень экспрессии гена *mlc-2* был наиболее низким в ноябре в группе “ЕстФ КД” по сравнению с группами круглосуточного освещения: в ок-

тябре с группами круглосуточного освещения “24С КК” и “24С КД” (рис. 1b). При этом следует отметить, что значения данного показателя в группах с круглосуточным освещением в ноябре увеличивались по сравнению с предыдущим месяцем.

Установлены различия в экспрессии генов миогенных регуляторных факторов (МРФ). В ноябре уровень экспрессии гена *myf5* был наименьшим в группе “ЕстФ КД” по сравнению с группами круглосуточного освещения (рис. 1c). Значение показателя увеличивалось к ноябрю только в группах с дополнительным освещением. Уровень экспрессии гена *myog* был выше в группе “24С КД” по сравнению с “24С КК” в ноябре (рис. 1d). За период исследования динамика показателя наблюдалась только в группе “24С КК”: в октябре значение увеличивалось по сравнению с предыдущим месяцем, а в ноябре — уменьшалось.

Наиболее высокие значения экспрессии генов всех трёх паралогов *myod1* установлены в группе “24С КД” в ноябре (рис. 2). При этом межгруппо-

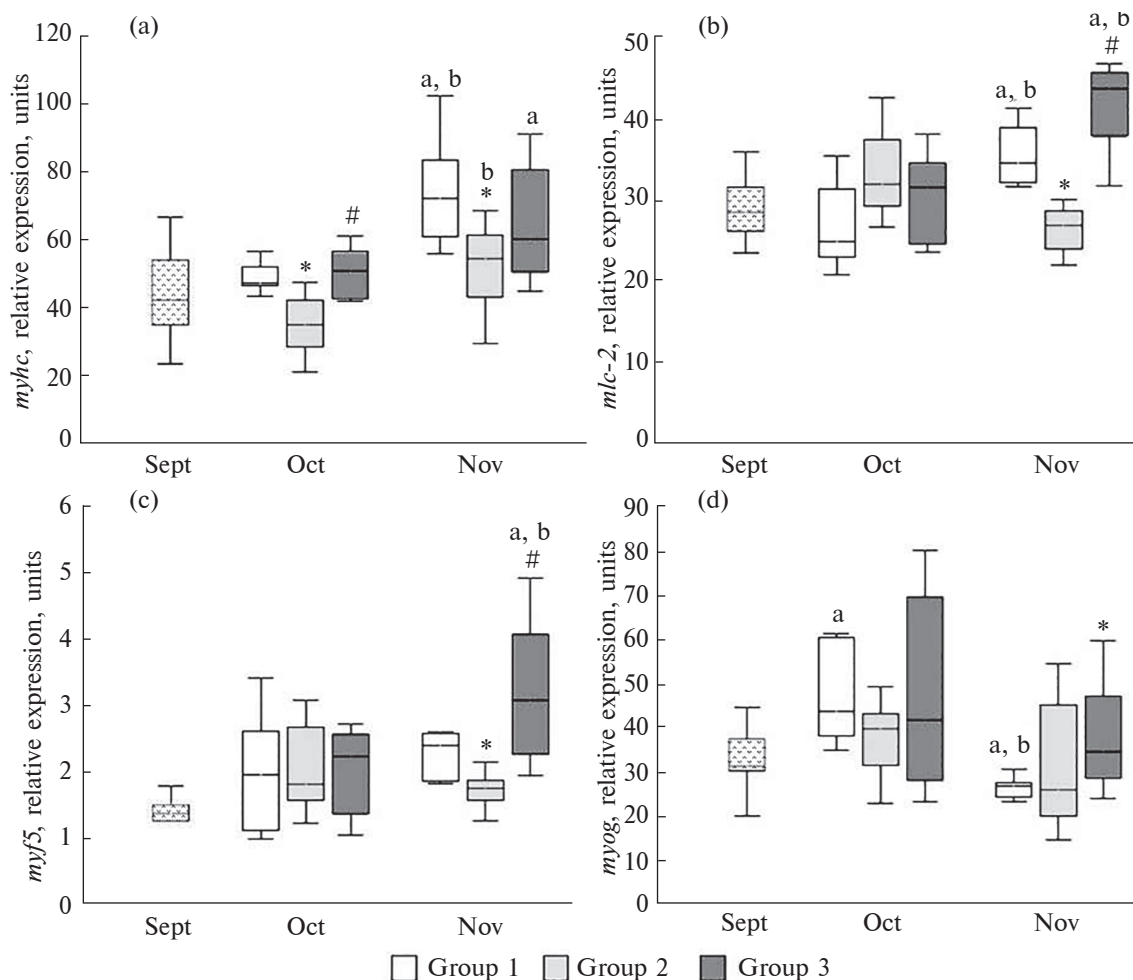


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии генов (у. ед.) *myhc* (a), *mlc-2* (b), *myf5* (c), *myog* (d) в белых мышцах атлантического лосося, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления на протяжении периода исследования: сентябрь – значения до эксперимента; группа 1 – “24С КК” – режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; группа 2 – “ЕстФ КД” естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; группа 3 – “24С КД” – режим освещения постоянный, кормление в светлое время суток. Различия достоверны при $p < 0.05$ (критерий Краскела–Уоллиса, критерий Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение): * – в сравнении с группой 1, # – в сравнении с группой 2, ^a – по сравнению со значениями в сентябре, ^b – по сравнению со значениями в октябре в соответствующей группе.

вые различия для генов *myod1a* и *myod1b* выявлены по отношению к двум другим группам, а у *myod1c* только к группе “24С КК”. Динамика экспрессии генов паралога *myod1* в разных экспериментальных группах имела различный характер (рис. 2). В группе “24С КК” наблюдалось увеличение уровня экспрессии в октябре (*myod1a*, *myod1c*) и снижение в ноябре (*myod1a*, *myod1b*). В группе “ЕстФ КД” уровень экспрессии *myod1a* и *myod1b* в ноябре снижался по сравнению с предыдущим месяцем, а уровень *myod1c* повышался. В группе “24С КД” уровень экспрессии *myod1a* и *myod1c* увеличивался к ноябрю.

Согласно представленным данным уровень экспрессии генов миостатина отличался как между группами, так и между месяцами (рис. 3). В ноябре выявлен рост экспрессии *mstn1a* во всех груп-

пах, при этом в группе “ЕстФ КД” он был ниже по сравнению с группой “24С КК” (рис. 3a). Различий в уровне экспрессии гена *mstn1b* между группами не было установлено, однако выявлено увеличение данного показателя в группе “24С КД” к ноябрю (рис. 3b).

Среди генов *igf* зафиксирована межгрупповая разница только у *igf2* (рис. 4b), согласно которой уровень экспрессии гена *igf2* в мышцах рыб в октябре был ниже в группе “ЕстФ КД” по сравнению с группой “24С КК”. Также следует отметить, что экспрессия генов *igf* по-разному изменялась на протяжении эксперимента (рис. 4). Уровень экспрессии гена *igf1* увеличивался постепенно к ноябрю, а гена *igf2* – сначала увеличивался, затем уменьшался в ноябре, одинаково во всех исследуемых группах.

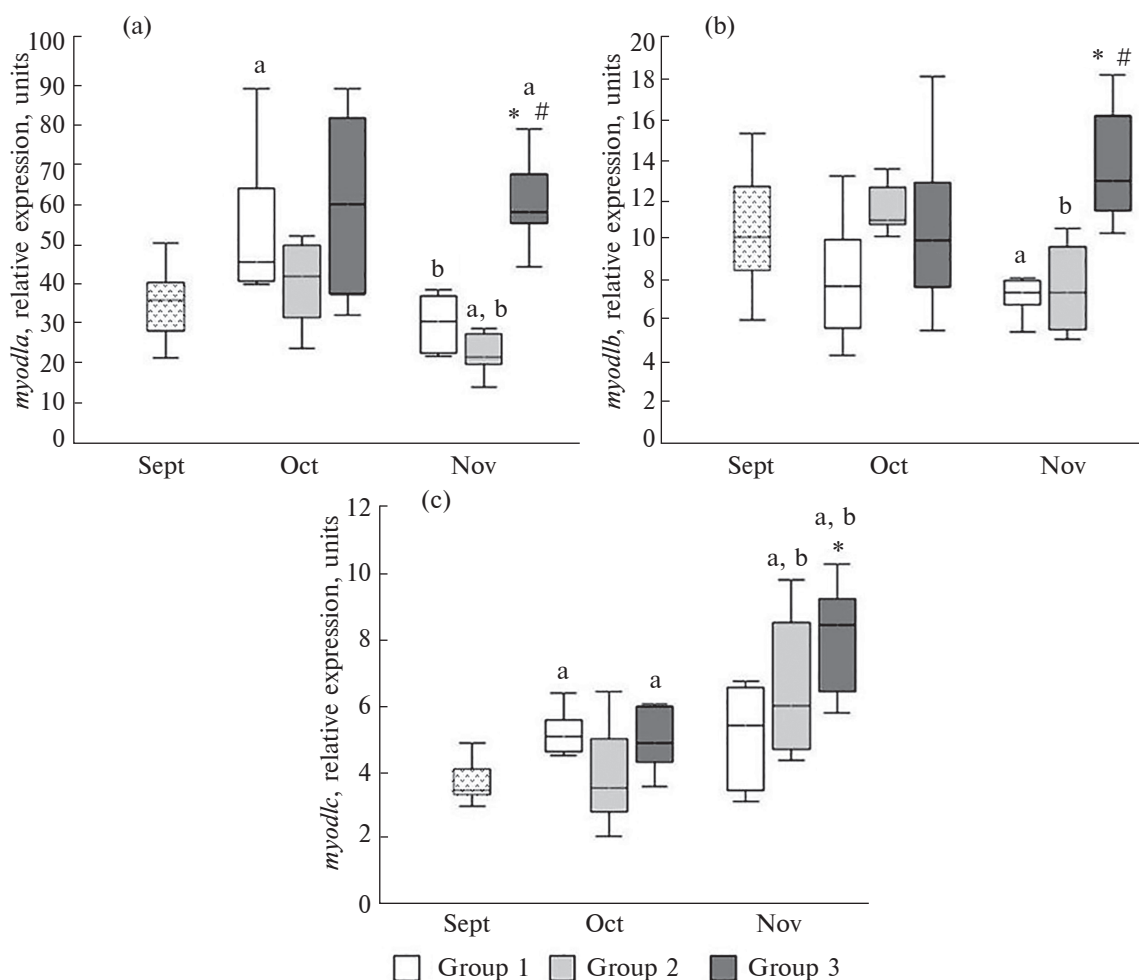


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов (у. ед) *myodla* (a), *myodlb* (b), *myodlc* (c) в белых мышцах атлантического лосося, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления на протяжении периода исследования: сентябрь – значения до эксперимента; группа 1 – “24С КК” – режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; группа 2 – “ЕстФ КД” естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; группа 3 – “24С КД” – режим освещения постоянный, кормление в светлое время суток. Различия достоверны при $p < 0.05$ (критерий Краскела–Уоллиса, критерий Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение): * – в сравнении с группой 1, # – в сравнении с группой 2, ^a – по сравнению со значениями в сентябре, ^b – по сравнению со значениями в октябре в соответствующей группе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлены различия между исследуемыми группами рыб по уровням экспрессии генов миозина и МРФ, которые позволяют предположить влияние режимов освещения и кормления на процессы роста мышц. Установлены различия между экспериментальными группами по экспрессии *myhc* уже через месяц после начала исследования. Уровень экспрессии гена *myhc* был наименьшим в группе “ЕстФ КД” по сравнению с группами круглосуточного освещения (“24С КД” и “24С КК”) и в октябре, и ноябре. В ноябре так же установлен низкий уровень экспрессии *mlc-2* у рыб в группе с естественным освещением. Уровни экспрессии генов *myhc* и *mlc-2* могут быть использованы как показатели, отражающие процессы синтеза белка и его накопления и темпы прироста мышечной массы в целом [6, 9, 16]. Относительно низкие значения

данных показателей соответствуют более низким темпам роста рыб, выращиваемых при естественном освещении: средний прирост массы на группу за весь период исследования составил 14.1 ± 0.1 г, 12.2 ± 0.2 г, 13.1 ± 0.2 г у рыб с режимами “24С КК”, “ЕстФ КД” и “24С КД” соответственно [32]. Различия в уровне экспрессии гена *myhc* в первый месяц исследования согласуются с данными по активности ЦО у сеголетков в этом же эксперименте [32]. Уровень активности ЦО в мышцах особей был выше у особей из групп с постоянным освещением (“24С КД” и “24С КК”) по сравнению с группой “ЕстФ КД”. Таким образом, возможно, что доступность корма и высокий уровень аэробного обмена позволяют рыбам, выращиваемым при постоянном освещении, использовать энергию не только для поддержания основного обмена веществ, но и в процессах биосинтеза в мышцах, которые требуют большого количества АТФ. Ранее нами

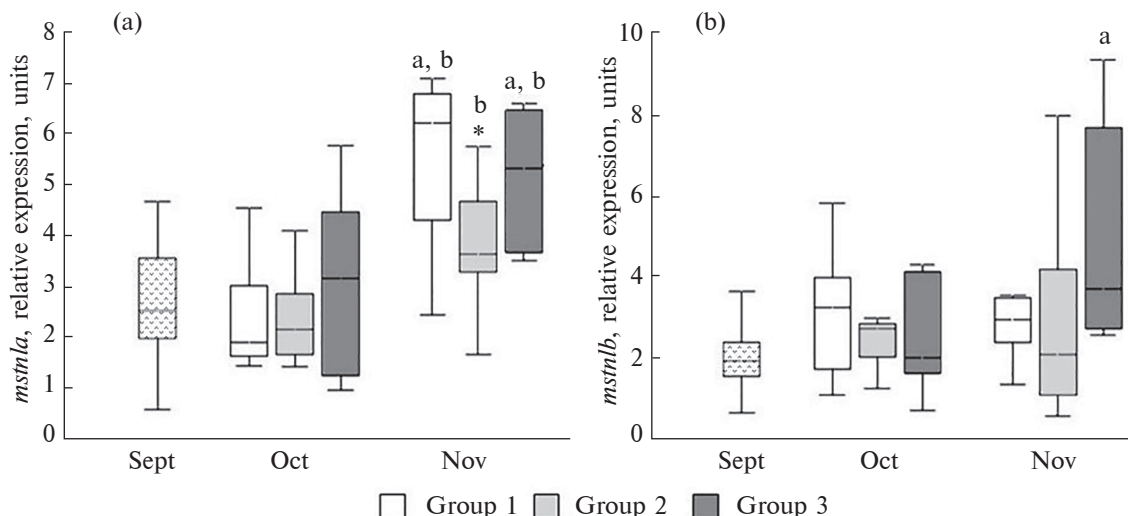


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов (у. ед) *mstn1a* (a), *mstn1b* (b) в белых мышцах атлантического лосося, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления на протяжении периода исследования: сентябрь — значения до эксперимента; группа 1 — “24С КК” — режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; группа 2 — “ЕстФ КД” — естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; группа 3 — “24С КД” — режим освещения постоянный, кормление в светлое время суток. Различия достоверны при $p < 0.05$ (критерий Краскела—Уоллиса, критерий Манна—Уитни с поправкой на множественное сравнение): * — в сравнении с группой 1, ^a — по сравнению со значениями в сентябре, ^b — по сравнению со значениями в октябре в соответствующей группе.

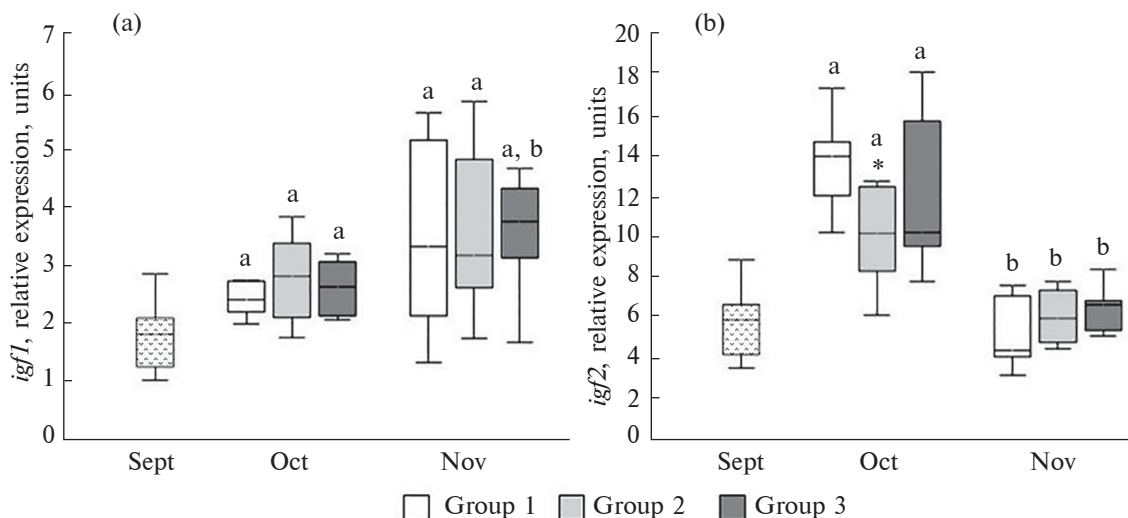


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов (у. ед) *igf1* (a), *igf2* (b) в белых мышцах атлантического лосося, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления на протяжении периода исследования: сентябрь — значения до эксперимента; группа 1 — “24С КК” — режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; группа 2 — “ЕстФ КД” — естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; группа 3 — “24С КД” — режим освещения постоянный, кормление в светлое время суток. Различия достоверны при $p < 0.05$ (критерий Краскела—Уоллиса, критерий Манна—Уитни с поправкой на множественное сравнение): * — в сравнении с группой 1, ^a — по сравнению со значениями в сентябре, ^b — по сравнению со значениями в октябре в соответствующей группе.

было показано на сеголетках и двухлетках лосося, выращиваемых в условиях рыбоводного завода на Северо-западе России, что рыбы из групп с дополнительным освещением отличались от групп без дополнительного освещения более высоким уровнем экспрессии гена *myhc*, что так же соответствовало темпам роста этих рыб [28–30].

Постэмбриональный мышечный рост у рыб осуществляется за счет процессов гиперплазии

и гипертрофии под контролем специфических миогенных регуляторных факторов — MyoD1, Myf5, миогенина (MyoG). Ранее было показано, что уровень экспрессии генов, регулирующих миогенез (*myod*, *myf5*, *myog* и *mrf4*), коррелирует с механизмами роста мышц во время развития рыб [15, 34]. Так, на ранних стадиях мышечного роста увеличение уровней экспрессии *myod* и *myf5* в недифференцированных миогенных клетках-предшественниках

(МКП) напрямую связано с их интенсивной пролиферацией и последующей клеточной гиперплазией (образованием миотуб и их дифференцировкой в новые мышечные волокна) [15]. Гены *myog* и *mrf4* экспрессируются позже и связаны с терминальной дифференцировкой и слиянием миобластов с существующими миофибриллами в процессе гипертрофии мышечных волокон [15]. Согласно результатам исследования, для группы “24С КК” через месяц после начала исследования установлено увеличение экспрессии *myog*, *myod1a* и *myod1c*, также и для группы “24С КД” установлено повышение уровня *myod1c*, для группы “ЕстФ КД” значения этих показателей по сравнению с первым месяцем не изменялись. Полученные нами результаты указывают на влияние продолжительности освещения на различия в регуляции процессов миогенеза уже через месяц применения разных режимов фотопериода.

Высоким значениям экспрессии *myhc* и *mlc-2* в мышцах рыб в группах с круглосуточным освещением “24С КК” и “24С КД” по сравнению с таковыми значениями у особей из группы “ЕстФ КД” с естественным освещением в ноябре соответствовал высокий уровень экспрессии *myf5*. Кроме того, для рыб “24С КК” и “24С КД” уровень экспрессии *myf5* в ноябре повышался. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным для двухлеток атлантического лосося, согласно которым уровни экспрессии *myf5* и *myhc*, были выше наряду с темпами роста у рыб, выращиваемых в заводских условиях при круглосуточном освещении в отличие от растущих без дополнительного освещения [29]. Ранее в исследовании, проведенном на молоди атлантической трески, было показано, что экспрессия гена *myf5* и темпы роста были достоверно выше у рыб в группе с круглосуточным освещением по сравнению с рыбами, которые росли при естественном режиме фотопериода [35].

Уровни экспрессии генов *myog*, а также паралогов *myod1* были самыми высокими в мышцах рыб из группы “24С КД” в ноябре: по уровню экспрессии *myod1a* и *myod1b* значения были отличны от двух других групп, а по экспрессии *myog* и *myod1c* отличия наблюдались только с группой “24С КК”. При этом обращает на себя внимание различия в характере изменений экспрессии генов. Уровень экспрессии *myod1a* и *myod1b* уменьшался в ноябре у рыб “ЕстФ КД” и “24С КК”, а у рыб из третьей группы уровень не изменялся. Кроме того, уровень экспрессии *myog* в группе “24С КК” к ноябрю уменьшался. Возможно, имеет значение совокупное влияние освещения и рациона питания. Ранее было показано влияние состава питания на экспрессию МРФ [10, 17], что позволяет предположить, что в данном случае различия в процессах регуляции миогенеза могли

быть связаны с различиями в общем метаболизме рыб. Так, согласно липидному анализу, наблюдались различия по показателям липидного обмена между рыбами из разных групп в данном эксперименте [31], а именно по маркерным показателям смолтификации, которые количественно были более выражены у рыб в группах “24С КК” и “ЕстФ КД” по сравнению с “24С КД”. При этом эффект совокупного и устойчивого действия фотопериода и кормления, стимулирующий подготовку к смолтификации сеголеток атлантического лосося, выращиваемых в условиях аквакультуры, достигался при их сочетании в круглосуточном режиме [31]. Так же ранее было показано, что смолты дикого атлантического лосося отличаются от пестряток не только по уровню энергетического и липидного обмена, но и по экспрессии генов МРФ, а именно низким уровнем транскриптов *myod1a*, *myod1b* и *myog* [36].

Обращает на себя внимание различие в характере экспрессии паралогов *myod1* как между экспериментальными группами, так и на протяжении исследования. Это указывает на функциональные различия между *myod1a*, *myod1b* и *myod1c*, по-видимому, связанные с изменением регуляции миогенеза у рыб под воздействием разных режимов освещения и рациона питания.

По уровню экспрессии гена *mstn1* различия наблюдались также на второй месяц исследования. Уровень экспрессии *mstn1a* был наименьшим в мышцах рыб в группе “ЕстФ КД” несмотря на то, что значения показателя повышались во всех группах ко второму месяцу исследования. Это соответствовало уровню экспрессии *myhc*, *mlc-2* и *myf5*. Миостатин — негативный регулятор развития мышц позвоночных, ингибирующий пролиферацию и дифференцировку миобластов [37, 38]. Вероятно, MSTN экспрессируется в ответ на высокие уровни МРФ, регулируя интенсивность процессов гиперплазии и гипертрофии мышечных волокон для предотвращения бесконтрольного роста мышц [15, 16]. Что касается экспрессии второго паралога *mstn1b*, то существенных различий по данному показателю между группами и на протяжении исследования установлено не было. Это указывает на функциональные особенности паралогов в данных экспериментальных условиях (фотопериод, режим кормления, постоянная температура).

Различий по уровню экспрессии *igf1* в мышцах рыб между группами не наблюдалось. Значения этого показателя повышались за период исследования во всех группах рыб, что согласуется с активным ростом рыб и увеличением их массы. По уровню экспрессии *igf2* различия установлены в первый месяц исследования: несмотря на то, что значения показателя повышались в октябре во всех группах, в группе с естественным освещением

ем они были наименьшими с достоверной разницей по отношению к группе “24С КК”. К ноябрю уровень экспрессии *igf2* снижался до уровня в сентябре у рыб во всех экспериментальных группах. Таким образом, наблюдаются различия в процессе регуляции экспрессии *igf1* и *igf2*. Возможно, это связано с различиями их ролей в регуляции роста. Инсулиноподобный фактор роста-II имеет высокую структурную гомологию с IGF-I и экспрессия генов обоих митогенов, по-видимому, регулируется гормоном роста [39]. Оба IGF также действуют через один и тот же рецептор, что позволяет предположить, что они выполняют перекрывающиеся физиологические функции у рыб [12, 40]. В нескольких исследованиях было показано, что IGF-I и IGF-II имеют значение (функционалируют) на разных стадиях миогенеза [41]. Так, на клеточной культуре миоцитов дорады *Sparus aurata* показано, что после инкубации с IGF-II увеличивалась экспрессия *myod2* и *myf5*, генов, включенных в пролиферацию, а IGF-I вызывал повышение *mrf4* и *myog*, включенных в поздние стадии развития, соответствующие дифференциации клеток [41, 42]. Так же *igf2* и *igf1* по-разному экспрессируются в мышцах рыб во время голодания и насыщения [43, 44]. Во время восстановления питания после голодания у атлантического лосося наблюдалось снижение экспрессии *igf2* в мышцах, тогда как экспрессия *igf1* увеличивалась и соответствовала повышению экспрессии *mhc-2*, *myhc* и *myog* и дальнейшему приросту массы тела [43]. Снижение мРНК *igf2* и увеличение экспрессии *igf1* в мышцах также совпало с периодом увеличения удельного темпа роста тилапии при восстановлении питания [45]. Это говорит о том, что снижение выработки IGF-II в мышцах может играть определенную роль в компенсаторном росте. Эти результаты позволили предположить, что экспрессия *igf1* и *igf2* по-разному регулируется в мышцах при изменении пищевого статуса рыбы [45]. Так же и в нашей работе на второй месяц исследования увеличение уровня экспрессии *igf1* и снижение *igf2* в мышцах рыб из всех экспериментальных групп соответствовало повышению уровня экспрессии гена *myhc*. Полученные результаты позволяют предположить разную роль IGF-I и IGF-II в период активного роста, и в целом в онтогенезе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, различия в режимах освещения и питания отражались на экспрессии генов МРФ, а, следовательно, и процессах регуляции миогенеза. Выявленные различия в экспрессии генов *myog* и паралога *myod1* между группами с круглосуточным освещением, но разным режимом питания (круглосуточно и в дневное время) позволи-

ли предположить различия в процессах регуляции миогенеза, вызванные изменением времени питания. Установлено, что *igf1* и *igf2* имеют разный характер экспрессии в период интенсивного роста лосося, что предполагает различия их ролей в регуляции процесса роста рыб в онтогенезе. Поскольку экспрессия *myod1a*, *myod1b* и *myod1c* изменялась по-разному между экспериментальными группами и за период исследования, можно предположить, что паралоги одного и того же гена имеют функциональные различия в регуляции миогенеза в зависимости от режимов освещения и питания.

Представленные в настоящей работе данные расширяют современные знания о молекулярных механизмах регуляции мышечного роста, а также закономерностях роста у рыб при влиянии факторов среды.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубочайшую благодарность главному рыбоводу предприятия М. Горбунову за курирование эксперимента, проведение необходимых рыбохозяйственных мероприятий, сбор биоматериала, компетентные консультации и рекомендации в ходе реализации исследования. Исследование было выполнено на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Обсуждение результатов исследования (М.В.К., М.А.Р., Н.С.Ш., С.А.М., А.Е.К., Н.Н.Н.), написание и подготовка публикации (М.В.К., М.А.Р., Н.С.Ш., С.А.М., Н.Н.Н.); пробоподготовка и проведение лабораторного анализа образцов (М.А.Р., М.Ю.К.), анализ и статистическая обработка полученных данных (М.А.Р.), постановка и ведение эксперимента (А.Е.К.), руководитель проекта (Н.Н.Н.).

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 биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН, протокол № 01 от 11.09.2023 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 19–14–00081–П “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watabe S (2001) Myogenic regulatory factors. In Fish Physiology-Muscle Development and Growth. Johnston IA Ed. Academic Press 18: 19–41.
2. Rescan PY (2001) Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. Comp Biochem Physiol B130(1): 1–12.
[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00412-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00412-2)
3. Bower NI, Johnston IA (2010) Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells. Am J Phys Regul Integr Comp Phys 298: 1615–1626.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00114.2010>
4. Macqueen DJ, Johnston IA (2006) A novel salmonid *myoD* gene is distinctly regulated during development and probably arose by duplication after the genome tetraploidization. FEBS Lett 580(21): 4996–5002.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.016>
5. Overturf K, Hardy RW (2001) Myosin expression levels in trout muscle: a new method for monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition. Aquaculture Research 32(4): 315–322.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00582.x>
6. Hevroy EM, Jordal A-EO, Hordvik I, Espe M, Hemre G-I, Olsvik PA (2006) Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 252: 453–461.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.003>
7. Imsland AK, Le Francois NR, Lammare SG, Ditlecadet D, Sigurosson S, Foss A (2006) Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for monitoring growth rates. Can J Fish Aquat Sci 63: 1959–1967.
<https://doi.org/10.1139/f06-091>
8. Dhillon RS, Esbaugh AJ, Wang YS, Tufts BL (2009) Characterization and expression of a myosin heavy-chain isoform in juvenile walleye *Sander vitreus*. J Fish Biol 75: 1048–1062.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02376.x>
9. Alami-Durante H, Cluzeaud M, Bazin D, Schrama JW, Saravanan S, Geurden I (2019) Muscle growth mechanisms in response to isoenergetic changes in dietary non-protein energy source at low and high protein levels in juvenile rainbow trout. Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol 230: 91–99.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.009>
10. Campos C, Valente LMP, Borges P, Bizuayehu T, Fernandes JMO (2010) Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). J Exp Biol 213: 200–209.
<https://doi.org/10.1242/jeb.033126>
11. Johnston IA (2006) Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. J Exp Biol 209(12): 2249–2264.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02153>
12. Reinecke M, Björnsson BT, Dickhoff WW, McCormick SD, Navarro I, Power DM, Gutiérrez J (2005) Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. Gen Compar Endocrinol 142(1–2): 20–24.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.01.016>
13. Gabillard JC, Biga PR, Rescan PY, Seiliez I (2013) Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. Gen Comp Endocrinol 194: 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.012>
14. Ostbye T-K, Galloway TF, Nielsen C, Gabestad I, Bardal T, Andersen O (2001) The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. Eur J Biochem 268:5249–5257.
<https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02456.x>
15. Johansen KA, Overturf K (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Biotechnol 7(6): 576–587.
<https://doi.org/10.1007/s10126-004-5133-3>
16. Johansen KA, Overturf K (2006) Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. Comp Biochem Physiol Part B144: 119–127.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.001>
17. Valente LM, Cabral EM, Sousa V, Cunha LM, Fernandes JM (2016) Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. Aquaculture 453: 77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.034>
18. Weber GM, Ma H, Birkett J, Cleveland BM (2022) Effects of feeding level and sexual maturation on expression of genes regulating growth mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 551: 737917.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737917>
19. Björnsson BT, Thorarensen H, Hirano T, Ogasawara T, Kristinsson JB (1989) Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypothyroidism regulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. Aquaculture 82(1–4): 77–91.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90397-9)
20. Boeuf G, Le Bail PY (1999) Does light have an influence on fish growth? Aquaculture 177(1–4): 129–152.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00074-5)
21. Migaud H, Davie A, Taylor JF (2010) Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. J Fish Biol 76(1): 27–68.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02500.x>
22. Taylor JF, North BP, Porter MJR, Bromage NR, Migaud H (2006) Photoperiod can be used to enhance growth and improve feeding efficiency in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 256(1–4): 216–234.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.027>
23. Sonmez AY, Hisar O, Hisar SA, Alak G, Aras MS, Yanik T (2009) The effects of different photoperiod regimes on growth, feed conversion rate and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. J Anim Vet Adv 8(4): 760–763.
<https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.21.10.2700>

24. Villamizar N, Blanco-Vives B, Migaud H, Davie A, Carboni S, Sanchez-Vazquez FJ (2011) Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. *Aquaculture* 315(1–2): 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.036>
25. Björnsson BT (1997) The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 9–24. <https://doi.org/10.1023/a:1007712413908>
26. Taylor JF, Migaud H, Porter MJR, Bromage NR (2005) Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-I levels in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 142(1–2): 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.006>
27. Johnston IA, Manthri S, Smart A, Campbell P, Nickell D, Alderson R (2003) Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J Exp Biol* 206(19): 3425–3435. <https://doi.org/10.1242/jeb.00577>
28. Churova MV, Shulgina NS, Kuritsyn AE, Krupnova MY, Nemova NN (2020) Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes. *Comp Biochem Physiol Part B* 239: 110330. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110330>
29. Shulgina NS, Churova MV, Murzina SA, Krupnova MY, Nemova NN (2021) The Effect of Continuous Light on Growth and Muscle-Specific Gene Expression in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Yearlings. *Life* 11(4): 328. <https://doi.org/10.3390/life11040328>
30. Shulgina NS, Kuznetsova MV, Nemova NN (2022) The effect of different lighting regimes on some molecular-genetic parameters of juvenile atlantic salmon's (*Salmo salar*) muscle growth under artificial reproduction conditions. *Russ J Dev Biol* 53(6): 472–489. <https://doi.org/10.1134/S106236042206008X>
31. Murzina SA, Provotorov DS, Voronin VP, Kuznetsova MV, Kuritsyn AE, Nemova NN (2023) Parameters of Lipid Metabolism in Underyearlings of the Atlantic Salmon *Salmo salar* Reared under Different Regimes of the Photoperiod and Feeding Modes in Aquaculture in the Southern Region of Russia. *Biol Bull* 50(2): 121–134. <https://doi.org/10.1134/S1062359022700121>
32. Kuznetsova MV, Rodin MA, Shulgina NS, Krupnova MY, Kuritsyn AE, Murzina SA, Nemova NN (2023) The Influence of Different Lighting and Feeding Regimes on the Activity of Metabolic Enzymes in Farmed Atlantic Salmon Fingerlings. *Russ J Dev Biol* 54(2): 147–155. <https://doi.org/10.1134/S1062360423020030>
33. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
34. Almeida FLA, Carvalho RF, Pinhal D, Padovani CR, Martins C, Dal Pai-Silva M (2008) Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron* 39: 1306–1311. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.02.011>
35. Nagasawa K, Giannetto A, Fernandes JM (2012) Photoperiod influences growth and mll (mixed-lineage leukaemia) expression in Atlantic cod. *PLoS One* 7(5): e36908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036908>
36. Churova MV, Meshcheryakova OV, Veselov AE, Efremov DA, Nemova NN (2017) Activity of metabolic enzymes and muscle-specific gene expression in parr and smolts Atlantic salmon *Salmo Salar* L. of different age groups. *Fish Physiol Biochem* 43: 1117–1130. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0357-0>
37. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275(51): 40235–40243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004356200>
38. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating *MyoD* expression. *J Biol Chem* 277(51): 49831–49840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204291200>
39. Vong QP, Chan KM, Cheng CH (2003) Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) *igf1* and *igf2* mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. *J Endocrinol* 178(3): 513–521. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1780513>
40. Fox BK, Breves JP, Hirano T, Grau EG (2009) Effects of short- and long-term fasting on plasma and stomach ghrelin, and the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Domest Anim Endocrinol* 37(1): 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.01.001>
41. Vélez EJ, Lutfi E, Azizi Sh, Montserrat N, Riera Codina M, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J (2016) Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comp Biochem Physiol B* 199: 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.12.003>
42. Jiménez-Amilburu V, Salmerón C, Codina M, Navarro I, Capilla E, Gutiérrez J (2013) Insulin-like growth factors effects on the expression of myogenic regulatory factors in gilthead sea bream muscle cells. *Gen Comp Endocrinol* 188: 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.033>
43. Bower NI, Li X, Taylor R, Johnston IA (2008) Switching to fast growth: the insulin-like growth factor (IGF) system in skeletal muscle of Atlantic salmon. *J Exp Biol* 211: 3859–3870. <https://doi.org/10.1242/jeb.024117>
44. Gabillard JC, Kamangar BB, Montserrat N (2006) Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol* 191: 15–24. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06869>
45. Fox BK, Breves JP, Davis LK, Pierce AL, Hirano T, Grau EG (2010) Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: importance of muscle expression of *igf1* and *igf2* mRNA in the tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 166: 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.11.012>

EXPRESSION OF MUSCLE-SPECIFIC GENES IN ATLANTIC SALMON FINGERLINGS (*SALMO SALAR* L.) IN THE CONDITIONS OF AQUACULTURE UNDER THE INFLUENCE OF DIFFERENT LIGHTING AND FEEDING REGIMES

M. V. Kuznetsova^{a, #}, M. A. Rodin^a, N. S. Shulgina^a, M. Yu. Krupnova^a,
A. E. Kuritsyn^a, S. A. Murzina^a, and N. N. Nemova^a

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

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

The expression level of myosin heavy and light chains genes (*myhc*, *mlc-2*), transcription myogenic regulation factors (*myf5*, *myog*, *myod1* paralogs), myostatin paralogs and insulin-like growth factors (*igf1* and *igf2*) in the muscles of salmon fingerlings artificially grown under different lighting and feeding conditions at a constant water temperature was studied in the region of North Ossetia-Alania. The combined effect of lighting and feeding modes was reflected in the expression of the genes *myhc*, *mlc-2*, *myod1a*, *myf5*, *myod1b*, *myod1c*. Thus, individuals reared under constant lighting conditions were distinguished by higher levels of expression of the *myf5*, *myhc* and *mlc-2* genes compared to fish in natural light, which also corresponded to their higher growth rates. The expression of IGF genes varied in different ways throughout the experiment: the expression level of the *igf1* gene increased, and the *igf2* gene first increased after a month of study, then decreased on the second month. The results indicate differences in the processes of myogenesis regulation depending on lighting and feeding conditions.

Keywords: photoperiod, feeding regime, Atlantic salmon, expression of muscle-specific genes

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ИНСУЛИНА КРЫСАМ С ИШЕМИЕЙ И РЕПЕРФУЗИЕЙ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА УМЕНЬШАЕТ ИНТЕНСИВНОСТЬ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В ГИППОКАМПЕ И ЛОБНОЙ КОРЕ МОЗГА, ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. И. О. Захарова¹, Л. В. Баюнова¹, Д. К. Аврова¹, Н. Ф. Аврова^{1,*}

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

*E-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Найдено, что ишемия и последующая трехдневная реперфузия переднего мозга приводят к увеличению уровня маркера аутофагии LC3B-II, уровня глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и активации каспазы-3 в гиппокампе и лобной коре мозга крыс. При этом интраназальное введение крысам с ишемией и реперфузией мозга 0.5 МЕ инсулина (до ишемии и ежедневно при реперфузии) достоверно и значительно снижает уровень LC3B-II и активность каспазы-3 в изучаемых структурах. Это показывает способность инсулина ингибировать активацию аутофагии и апоптоза в переднем мозге при его ишемии и реперфузии. Не удалось выявить достоверного снижения уровня GFAP в этих районах мозга под влиянием введения животным инсулина. Показано, что интраназальное введение инсулина активирует протеинкиназу Akt (активирующую комплекс mTORC1, ингибирующий процессы аутофагии) и ингибирует протеинкиназу AMPK (инициирующую процессы аутофагии) в гиппокампе и коре мозга крыс, что, очевидно, лежит в основе его способности снижать аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов. Данные о модуляции инсулином активности протеинкиназ Akt и AMPK в опытах *in vivo* согласуются с результатами исследования возможного механизма нейропротекторного действия инсулина, проведенными нами ранее *in vitro* на нейронах коры мозга в состоянии окислительного стресса.

Ключевые слова: ишемия и реперфузия переднего мозга, аутофагия, апоптоз, интраназальное введение инсулина, протеинкиназы

DOI: 10.31857/S0044452924010053, **EDN:** ZFNXTY

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения от cerebroваскулярных заболеваний в мире ежегодно умирают миллионы людей [1]. Как показал анализ систематических исследований, проведенных в 1990–2019 гг. в 204 странах, выполненный в рамках “The Global Burden of Diseases Study”, инсульт мозга является одной из основных причин смерти людей в мире, по суммарному показателю как причина смерти и инвалидности он занимает в мире третье место. За период с 1990 по 2019 г. число инсультов в мире значительно увеличилось, причем он уносит больше жизней в развивающихся странах, чем в развитых государствах [2]. При этом в развитых странах ишемические поражения мозга чаще приводят к длительной и тяжелой инвалидности людей [3]. Одним из патологических состояний, значительно повышающих риск возникновения инсультов мозга, является болезнь

малых сосудов мозга (cerebral small vessel disease), вызывающая поражение ткани мозга и нарушение когнитивных функций [4–5]. Изучению ее проявлений и патогенеза, возможных подходов к лечению и профилактике этой болезни в настоящее время уделяется большое внимание [4–6].

Инсулин представляет собой не только гормон, но и один из наиболее важных нейротрофических факторов и перспективных для клинического применения нейропротекторов. Наиболее эффективными способами доставки инсулина при исследовании его влияния на процессы, протекающие в мозге, является интраназальное и интрацеребровентрикулярное (ICV) введение. При этих способах введения инсулин доставляется в мозг, не проходя через гематоэнцефалический барьер [7–8]. При этом интраназальное введение инсулина не является травматичным. Оно может быть применено для лечения больных. Клинические испытания интраназального введения инсулина при болезни

Альцгеймера были достаточно успешными (см., например, [9–10]), начаты его испытания при болезни Паркинсона [11] и других нейродегенеративных патологиях. Защитный эффект инсулина был также показан на животных с моделями нейродегенеративных заболеваний [12–13].

Но работ по изучению нейропротекторного эффекта интраназального введения инсулина при ишемических поражениях мозга пока крайне мало [14–15]. Существенным пробелом в понимании механизма нейропротекторного действия инсулина являлось до недавнего времени полное отсутствие данных о способности инсулина при каких бы то ни было способах его введения предотвращать аутофагическую гибель нейронов мозга при ишемических воздействиях и последующей реперфузии. При этом по современным представлениям гибель нейронов от чрезмерной активации аутофагии играет важнейшую роль в поражении мозга от ишемических воздействий и последующей реперфузии. От наших знаний о способах предотвращения гибели нервных клеток мозга при активации аутофагии в большой мере зависит успешность разработки подходов к лечению разных форм ишемического поражения мозга, прежде всего инсульта головного мозга [16–18].

Неоспоримо, что аутофагии принадлежит важнейшая роль в поддержании клеточного гомеостаза и, следовательно, она выполняет защитные функции. Но, как оказалось, активация аутофагии может не только способствовать повышению жизнеспособности клеток при патологических воздействиях на мозг, но и часто приводит к их гибели. Так, во многих работах показано, что при ишемии и реперфузии мозга, которая сопровождается активацией аутофагических и апоптотических процессов, происходит гибель нейронов как от активации аутофагии, так и от активации апоптоза [16, 19–24]. Объективности ради, следует отметить, что в ряде современных публикаций можно найти и примеры того, что увеличение интенсивности аутофагии в мозге при ишемических воздействиях может приводить к повышению жизнеспособности нейронов и улучшению функций мозга [25–27]. Но, по-видимому, при достаточной силе ишемического воздействия на мозг активация аутофагии, как правило, приводит к гибели нейронов. В этой связи актуальным является выявление соединений, обладающих нейропротекторными свойствами, способных снижать или предотвращать аутофагическую гибель нейронов и других клеток мозга при ишемических и других патологических воздействиях на мозг. Особый интерес, очевидно, представляют те из них, которые могут найти применение в клинической практике. К таким нейропротекторам, несомненно, относится инсулин.

Нами недавно было впервые показано, что интраназальное введение инсулина практически полностью предотвращает гибель нейронов в СА1 районе гиппокампа при двухсосудистой ишемии и последующей реперфузии мозга. При этом в проведенном исследовании получены свидетельства того, что основными причинами смерти нейронов являлась их аутофагическая и апоптотическая гибель, что позволило нам прийти к выводу о способности инсулина при его интраназальном введении предотвращать и аутофагическую, и апоптотическую гибель нейронов [28]. В опытах *in vitro* на изолированных нейронах коры мозга нами было показано, что инсулин способен достоверно и значительно снижать активацию процессов аутофагии и апоптоза, происходящую под влиянием окислительного стресса [29]. Выявлены те сигнальные пути, модуляция которых инсулином может лежать в основе его антиаутофагического и антиапоптотического воздействия [29]. Но необходимо было также показать способность инсулина не только *in vitro*, но и *in vivo* снижать уровень маркеров аутофагии и апоптоза и, соответственно, интенсивность этих процессов в гиппокампе и других структурах переднего мозга, а также способность этого нейропротектора модулировать активность протеинкиназ, которые оказывают влияние на степень аутофагической и апоптотической гибели нейронов мозга. Именно этим вопросам посвящена настоящая статья.

Целью проведенной работы является изучение способности инсулина, ингибиторов аутофагии (3-метиладенина) и апоптоза (Ac-DEVD-CHO) уменьшать уровень одного из основных маркеров аутофагии LC3B-II и астроглиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в гиппокампе и коре мозга крыс, увеличенных при ишемии и реперфузии переднего мозга; в цели работы входит также изучение способности инсулина снижать активность каспазы-3 и модулировать в этих структурах активность протеинкиназ, от которых в наибольшей мере может зависеть предотвращение им аутофагической и апоптотической гибели нейронов мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и материалы. Для интраназальных введений использовался бычий инсулин (I5500, Sigma, США), для интрацеребровентрикулярных введений — ингибитор аутофагии 3-метиладенин (M9281, “Sigma”, США), ингибитор каспаз Ac-DEVD-CHO (BD Pharmingen, “BD Biosciences”, США). Животных наркотизировали хлоралгидратом (#15307, “Sigma-Aldrich”, США). Для катеризации бедренной артерии применялся катетер (1.0×0.6×210 мм, 23G) от компании “SciCat”

(Россия). Материал шовный хирургический стерильный (нерассасывающиеся лавсановые нити MP1,5 USP4–0, ООО “Линтекс”, Россия) накладывался для скрепления мягких тканей в области бедра и шеи. Антитела и другие реактивы, использовавшиеся для иммуноблоттинга, приведены в соответствующем разделе.

Интраназальное введение инсулина. Опыты проводили на самцах крыс линии Вистар массой тела 270–330 г. Инсулин (“Sigma”, США) в дозе 0.5 МЕ на крысу вводили интраназально за 1 ч до окклюзии каротидных артерий и гипотензии, а затем ежедневно в течение 3 дней на стадии реперфузии. Для этого в каждую ноздрю животного вводили по 10 мкл раствора, содержащего 1 мг инсулина в 1 мл цитратного буфера, что соответствует 0.5 МЕ инсулина. Цитратный буфер готовили как смесь равных объемов растворов 100 мМ лимонной кислоты и 100 мМ цитрата натрия, pH 4.4.

Операция по введению ингибиторов апоптоза и аутофагии в боковой (I) желудочек мозга крыс. Для того, чтобы определить, как влияет активация процессов аутофагии и апоптоза на жизнеспособность нейронов при двухсосудистой ишемии переднего мозга с гипотензией и последующей реперфузией, крысам интрацеребровентрикулярно вводили ингибиторы аутофагии и апоптоза. Для того, чтобы уравнивать возможные последствия такого введения всем остальным группам животных вводили интрацеребровентрикулярно стерильный фосфатный буфер, использовавшийся для растворения ингибиторов.

После наркотизации крыс хлоралгидратом, вводимым внутримышечно в дозе 400 мг/кг веса крыс, животных помещали в стереотаксис. Для трепанации черепа использовался стоматологический бор в области, расположенной над I желудочком мозга (координаты: AP = –0.92 мм, L = 1.5 мм, V = 3.5 мм относительно брегмы) в соответствии со стереотаксическим атласом [30]. Крысам вводили интрацеребровентрикулярно 20 мкг 3-метиладенина (3-MA) или 10 мкг Ac-DEVD-CHO, в виде растворов в фосфатном буфере объемом 4.5 мкл или аналогичный объем фосфатного буфера за 30 минут до ишемического воздействия с помощью шприца (“Hamilton”, США).

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией. Двухсосудистую ишемию переднего мозга вызывали у наркотизированных хлоралгидратом крыс путем пережатия на 10 мин каротидных артерий в сочетании с гипотензией — снижением артериального давления до 50 мм ртутного столба путем отбора крови в шприц с гепарином, как это описано ранее [31]. Реперфузию переднего мозга проводили, разжимая каротидные артерии и возвращая в кровяное русло кровь с гепарином, отобранную шприцом

на стадии ишемии [32]. В качестве контрольных животных использовали ложно-оперированных крыс. Животным после завершения ишемии обрабатывали раны стрептоцидом и накладывали швы. Послеоперационный уход за животными осуществлялся в течение 3 дней при содержании на стандартном рационе.

Определение активности каспазы-3. Измерение активности проводили с помощью набора от компании “Abcam” (#ab39401, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение методом иммуноблоттинга уровня маркера аутофагии LC3B-II, GFAP и уровень ингибирующего фосфорилирования IRS-2 по Ser⁷³¹, на активность Akt и AMPK-альфа, а также общего уровня этих протеинкиназ в гиппокампе и лобной коре. Образцы гиппокампа и лобной коры гомогенизировали в соотношении 1:20 в лизисном буфере следующего состава: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25% дезоксихолат натрия, 0.5% Triton X-100, 15 mM NaF, 10 mM глицерофосфата натрия, 10 mM пироглицилат натрия, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM фенилметилсульфонил фторид (PMSF), 0.02% NaN₃, протеазный ингибиторный коктейль (“Roche”, Швейцария). Крупные клеточные фрагменты и неразрушенные клетки осаждали центрифугированием при 500g в течение 10 мин (4°C). Концентрацию белка в пробах определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта [33]. Для разделения белков использовали гели, содержащие 9% или 13% акриламида в зависимости от молекулярной массы анализируемого белка. Пробы загружали в количестве 30 мкг белка на лунку. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 80 V, по окончании которого белки переносили на PVDF мембрану (0.22 мкм, “Bio-Rad”, США). Неспецифическое связывание блокировали, как было описано ранее [33]. Уровень маркера аутофагии определяли с помощью специфического антитела к LC3B-II (1:1000, #2775, “Cell Signaling Technology”, США). Уровень маркерного белка астроцитов GFAP оценивалась с помощью моноклонального мышиного IgG2a к KTVEMRDGEVIK участку белка. Антитело к GFAP получено в дар от федерального центра Мозга и Нейротехнологий (Москва, Россия). Антитела для определения уровней фосфорилирования pAkt (Ser⁴⁷³) (1:1000, #4058), pAMPK-alpha (Thr¹⁷²) (1:1000, #2535) были приобретены у компании “Cell Signaling Technology” (США), для pIRS-2 (Ser⁷³¹) (1 мкг/мл, #ab3690) — от “Abcam” (Великобритания). Специфические антитела к общей Akt (1:1000, #4691), AMPK-alpha (1:1000, #2793), IRS-2 (1:1000, #3089) от “Cell Signaling Technology” (США) использовались для оценки содержания данных белков и выявления изменений в уровне их экспрессии. Мембраны инкубировались с первич-

ными антителами в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. После 3-х кратной промывки в 0.1% Tween 20, приготовленном на TBST (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl), мембраны обрабатывались в течение 1 ч при комнатной температуре анти-мышинными (#7076) или анти-кроличьими (#7074) вторичными антителами IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) ("Cell Signaling Technology", США) в 5% обезжиренном молоке на TBST. Для нормализации данных после стриппинга на мембранах выявлялся GAPDH с помощью антитела (1:3000, #T0004) от компании «Affinity Biosciences» (Китай). Для визуализации белков сигнал HRP усиливали с помощью Novex ECL ("Invitrogen", США). Сигнал хемилюминесценции фиксировали на фотопленку. Изображения сканировали на сканере CanoScan 8800F. Оптическую плотность затемненных участков измеряли с помощью программы Bio7 (США).

Статистическая обработка. Статистическую достоверность различий определяли, используя t критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Все данные представлены как среднее арифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm \text{SEM}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе изучено влияние двух-сосудистой ишемии мозга крыс и последующей трехдневной реперфузии на уровень одного из основных маркеров аутофагии LC3B-II. Показано достоверное увеличение уровня LC3B-II, представляющего собой липидированную форму LC3B (в отличие от растворимой формы LC3B-I), как в гиппокампе, так и в лобной коре мозга (рис. 1). На рисунке приведены данные, полученные как при расчете соотношения LC3B-II/LC3B-I, так и LC3B-II, нормализованного к GAPDH. При обоих способах расчета полученных результатов как ICV введение крысам ингибитора аутофагии 3-МА (20 мкг на крысу до ишемического воздействия на мозг), так и интраназальное введение 0.5 МЕ инсулина (до ишемического воздействия на мозг и затем ежедневно в течение трех суток реперфузии) достоверно снижали уровень этого маркера аутофагии LC3B-II до его значения у ложно-оперированных животных, т. е. имела место полная нормализация этого показателя.

Для оценки влияния интраназального введения инсулина на интенсивность апоптоза определяли активность каспазы-3 в мозге крыс с ишемией и реперфузией и ложно-оперированных животных. При воздействии ишемии переднего мозга и последующей трехдневной реперфузии (рис. 2) активность каспазы-3 достоверно возрастала как в гиппокампе, так и в лобной коре мозга

($p < 0.02$). Но, если крысам вводили интраназально инсулин, то каспазная активность в гиппокампе снижалась практически до контрольных величин, т. е. до ее уровня в том же районе мозга ложно-оперированных животных ($p < 0.02$). В лобной коре мозга, подвергнутой ишемии и реперфузии, снижение каспазной активности под влиянием введенного инсулина также было достоверным, но различие было менее выраженным, чем в гиппокампе ($p < 0.05$). У ложно-оперированных крыс эффект интраназально введенного инсулина на активность каспазы-3 не был достоверным в изученных структурах мозга (рис. 2).

Об активации астроглии при ишемии и реперфузии переднего мозга судили, определяя методом иммуноблоттинга уровень глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в гиппокампе и в лобной коре мозга. Как видно из результатов, представленных на рис. 3, ишемия и реперфузия увеличивали уровень GFAP в гиппокампе и в лобной коре мозга ($p < 0.02$). В гиппокампе ни введение инсулина, ни введение крысам, подвергнутым ишемии и реперфузии, ингибитора аутофагии 3-МА или ингибитора апоптоза Ac-DEVD-CHO не снижали достоверно уровень GFAP, однако при их действии он переставал достоверно отличаться от контроля.

В коре мозга крыс высокий уровень GFAP, намного превышающий контрольные значения у ложно-оперированных крыс, был характерен не только для ишемических животных, которым не вводили какие-либо протекторы, но сохранялся и у крыс, которым вводили интраназально инсулин или интрацеребровентрикулярно (ICV) ингибиторы аутофагии или апоптоза. У ложно-оперированных животных инсулин не только не снижал уровень GFAP в лобной коре мозга, но и достоверно повышал его, как и ингибитор апоптоза.

Одной из целей предпринятого исследования было подтвердить в опытах *in vivo* основные результаты по изучению механизма действия инсулина, полученные *in vitro* на нейронах коры мозга. Мы изучили влияние ишемии и реперфузии, а также интраназального введения инсулина крысам на активность протеинкиназ Akt и АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK) в мозге. При этом в опытах, проведенных ранее *in vitro* [29] сигнальные системы, принимающие участие в реализации нейропротекторного действия инсулина, были изучены более детально, о чем речь пойдет в Обсуждении.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, ишемия и реперфузия на ранних этапах воздействия активировали протеинкиназу Akt как в гиппокампе, так и в лобной коре мозга. При этом инсулин, введенный интраназально до начала ишемического воздействия, еще больше увеличивал активность Akt, его эффект был хорошо выраженным и достоверным.

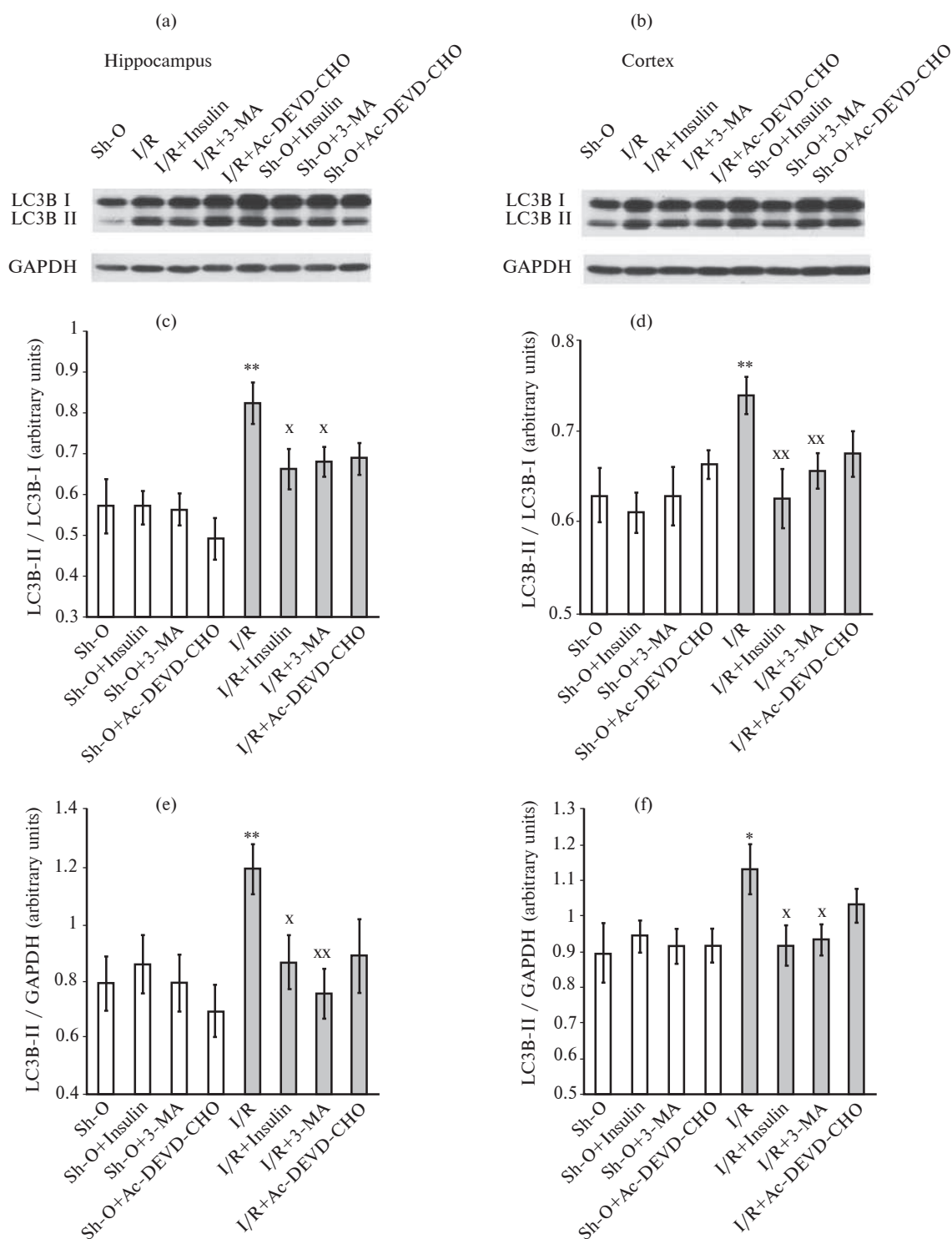


Рис. 1. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-метиладенина и Ас-DEVD-CHO, соответственно) на уровень маркера аутофагии LC3B-II в гиппокампе и лобной коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. (a), (c) и (e) – уровень LC3B-II в гиппокампе, (b), (d) и (f) – уровень LC3B-II в лобной коре мозга. (a) и (b) – иммуноблоты, (c), (d), (e) и (f) – результаты денситометрии в расчете на LC3B-I (c) и (d) или на GAPDH (e) и (f) показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 проведенных опытов. Сокращения на рисунке: Sh-O – ложно-оперированные крысы, I/R – крысы, подвергнутые ишемии и реперфузии, 3-MA – 3-метиладенин. Крыс подвергали двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией в течение 3 суток. Ингибиторы аутофагии и апоптоза вводили крысам интрацеребровентрикулярно (ICV) до ишемического воздействия, а 0.5 МЕ инсулина вводили интраназально до ишемического воздействия и затем ежедневно во время 3 суток реперфузии. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента: * и ** – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга у ложно-оперированных животных: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$, x и xx – по сравнению с данными у крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга: x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

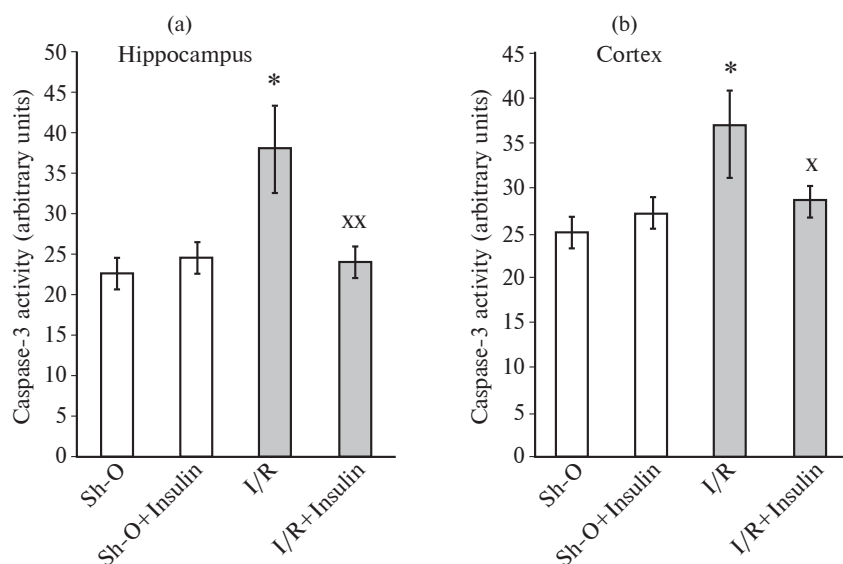


Рис. 2. Влияние введения инсулина на активность каспазы-3 в гиппокампе и лобной коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 опытов. (a) – активность каспазы-3 в гиппокампе, (b) – активность каспазы-3 в лобной коре мозга. Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1. Различия достоверны по t критерию Стьюдента: * – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс, $p < 0.02$, x и xx – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга, x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

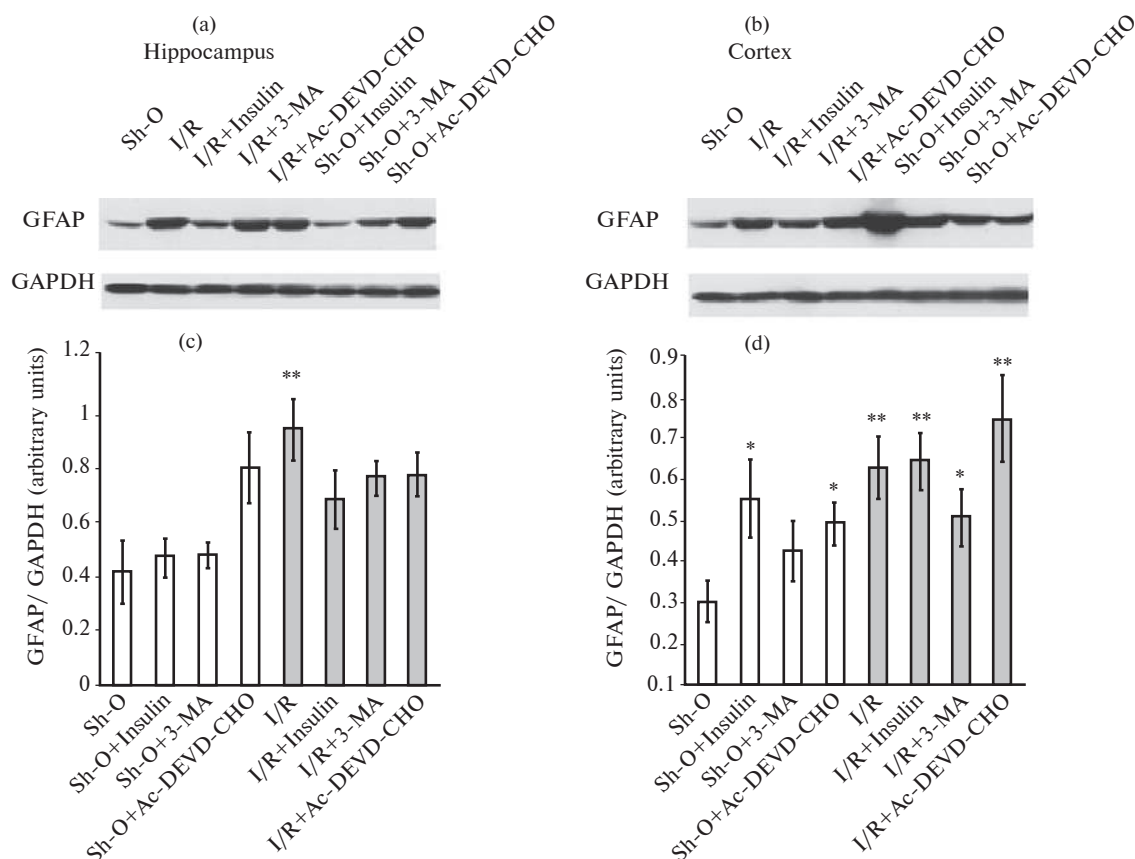


Рис. 3. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-MA и ac-DEVD-CHO, соответственно) на уровень глиального кислого фибриллярного белка (GFAP) в гиппокампе и коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 6–8 опытов. (a) и (c) – уровень GFAP в гиппокампе, (b) и (d) – уровень GFAP в лобной коре, (a) и (b) – иммуноблоты, (c) и (d) – результаты денситометрии представлены как GFAP/GAPDH. Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1. Различия достоверны по t критерию Стьюдента по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$.

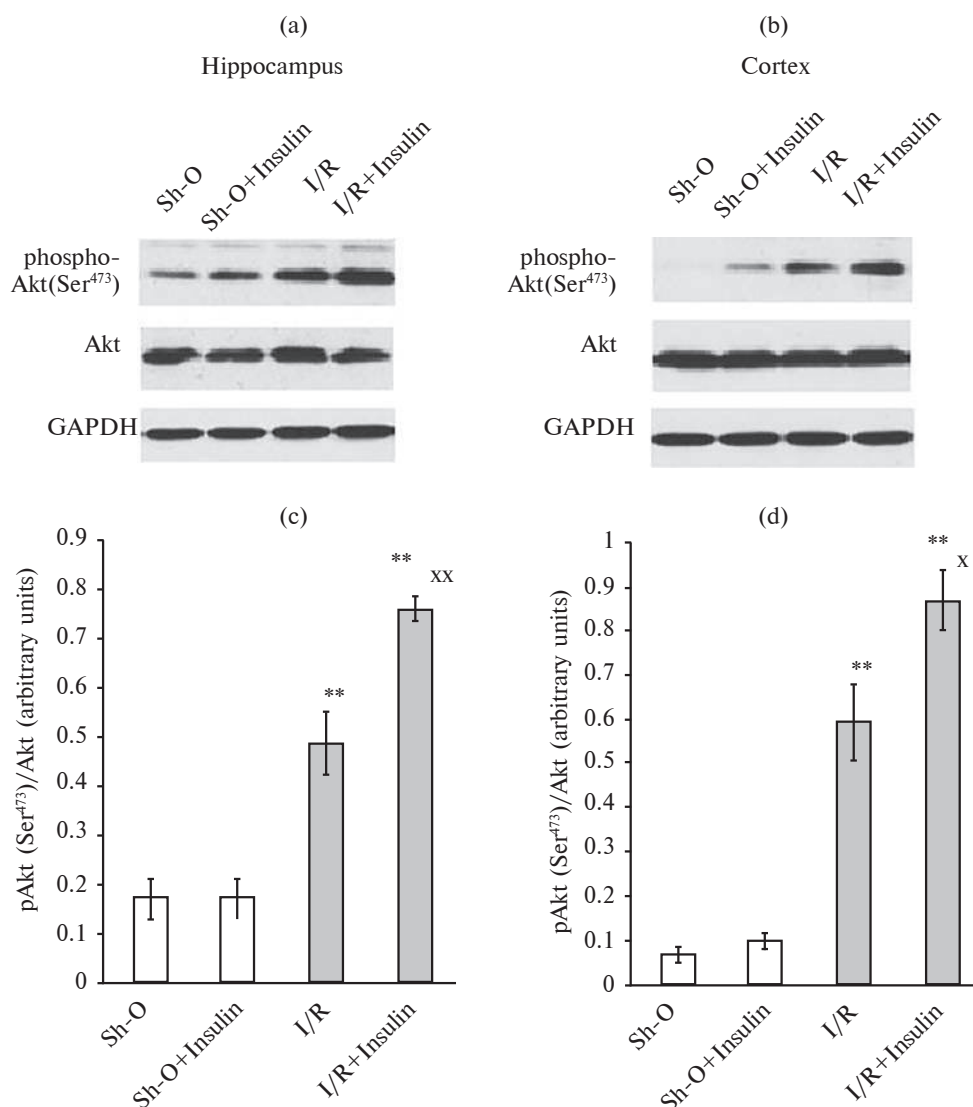


Рис. 4. Влияние введения инсулина на активность протеинкиназы В (Akt) в гиппокампе и лобной коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 5–7 опытов. (a) и (c) – активность протеинкиназы Akt в гиппокампе, (b) и (d) – активность протеинкиназы Akt в лобной коре, (a) и (b) – иммуноблотты, (c) и (d) – результаты денситометрии представлены как pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt. Сокращения на рисунке: Sh-O – ложно-оперированные крысы, I/R – крысы с ишемией и реперфузией мозга. Крыс подвергали двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией в течение 2 часов. 0.5 МЕ инсулина вводили интраназально за 1 ч до ишемического воздействия. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента: * и ** – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$, x и xx – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга, x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

Нам не удалось выявить достоверного эффекта инсулина на активность другой изученной протеинкиназы – AMPK на этом раннем сроке реперфузии (через 2 ч после ее начала). Но было показано, что инсулин достоверно снижает активность этой протеинкиназы у ишемических крыс в гиппокампе и в лобной коре мозга через 3 дня после начала реперфузии (рис. 5). В этом случае инсулин вводился не только до ишемического воздействия на мозг, но и ежедневно в период реперфузии. При этом в гиппокампе интраназально вводимый инсулин вызывал также достоверное снижение активности AMPK у ложно-оперированных животных (рис. 5).

Мы изучили, как влияют ишемия и реперфузия, инсулин, ингибитор аутофагии (3-MA) и ингибитор апоптоза (Ac-DEVD-CHO) на уровень фосфорилирования субстрата рецептора инсулина-2 (IRS-2) по Ser⁷³¹ в гиппокампе и в лобной коре мозга. Фосфорилирование IRS по сериновым остаткам играет важную роль в регуляции эффектов инсулина. Так, показано, что оно может значительно снижать уровень форм IRS-1 и IRS-2, фосфорилированных по тирозину, и, соответственно, инсулиновый сигналинг [34]. Результаты представлены на рис. 6. Как видно из этих данных, в условиях наших опытов ни ишемия и репер-

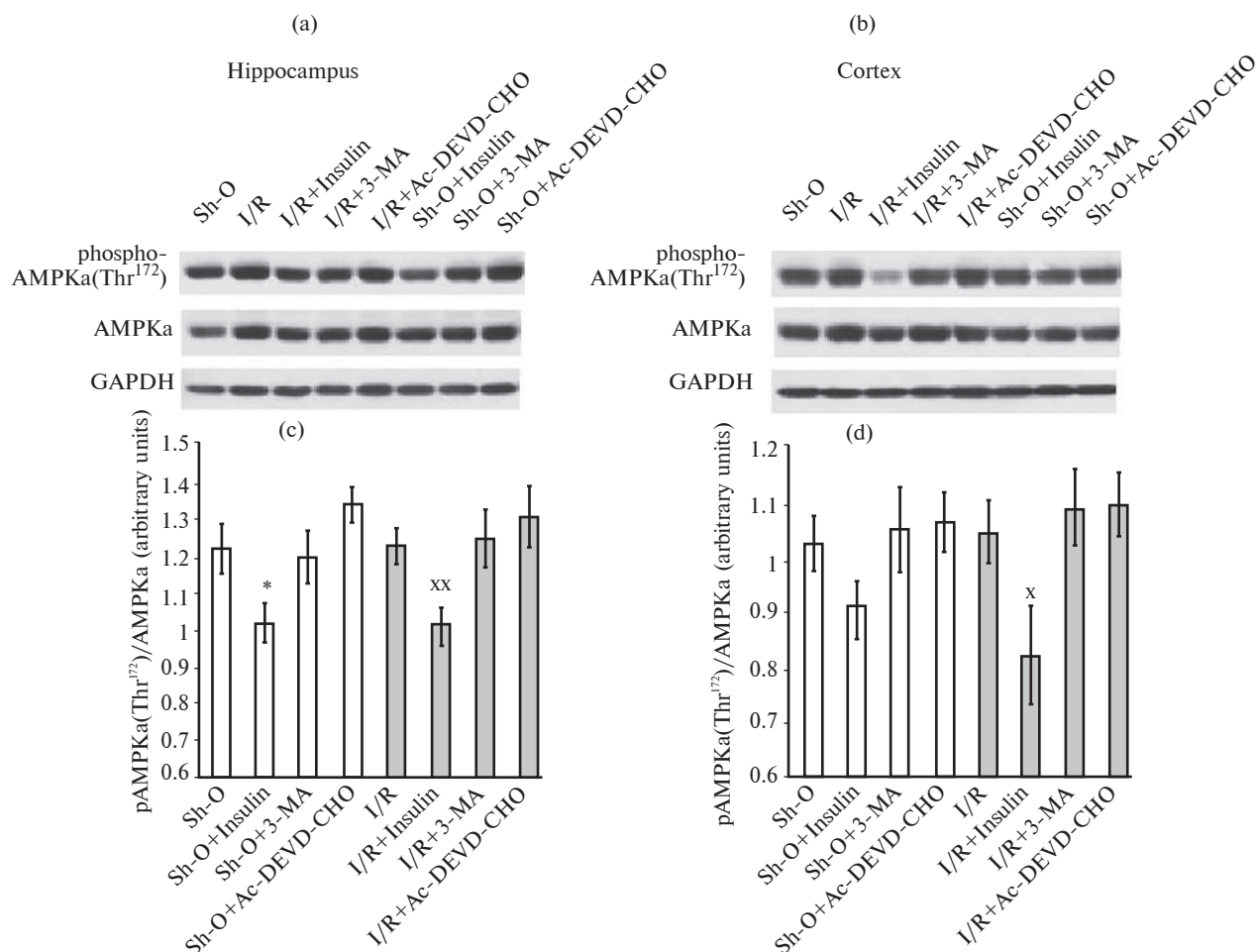


Рис. 5. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-МА и Ас-DEVD-СНО, соответственно) на активность AMPK в гиппокампе и коре мозга при ишемии и реперфузии переднего мозга крыс. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 опытов. (а) и (с) – активность протеинкиназы AMPK в гиппокампе, (b) и (d) – активность протеинкиназы AMPK в лобной коре, (а) и (b) – иммуноблотты, (с) и (d) – результаты денситометрии представлены как рAMPK- α (Thr¹⁷²)/AMPK- α . Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента: * – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга ложно-оперированных крыс, $p < 0.05$, x и xx – по сравнению с данными, полученными в том же районе мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга, x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

фузия, ни инсулин, ни ингибиторы аутофагии (3-МА) и апоптоза (Ас-DEVD-СНО) не оказывали достоверного эффекта на фосфорилирование IRS-2 по Ser⁷³¹ в гиппокампе. В лобной коре мозга также не были выявлены достоверные изменения фосфорилирования IRS-2 по Ser⁷³¹ под влиянием интраназально введенного инсулина или ингибиторов аутофагии и апоптоза у крыс, подвергшихся ишемии и реперфузии.

Таким образом, в настоящей работе показано, что инсулин, введенный интраназально крысам с глобальной ишемией и реперфузией переднего мозга, снижает активацию процессов аутофагии и апоптоза в гиппокампе и лобной коре мозга, о чем судили по изменению уровня маркеров этих процессов, а также модулирует активность протеинкиназ, способных регулировать интенсивность этих процессов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По современным представлениям для достижения серьезных успехов в разработке подходов к лечению ишемических поражений мозга необходимо понимание механизмов как аутофагической, так и апоптотической гибели нервных и других клеток мозга для последующей регуляции этих процессов [5, 16–17]. Во многих работах последних лет показана гибель нейронов от активации аутофагии. В тоже время для ряда нейропротекторов было найдено, что они способствуют увеличению жизнеспособности нейронов мозга при этой патологии благодаря предотвращению их аутофагической гибели [16, 19–24].

Хотя инсулин считается одним из наиболее перспективных нейропротекторов, чему, в частности, способствовали его удачные клинические испыта-

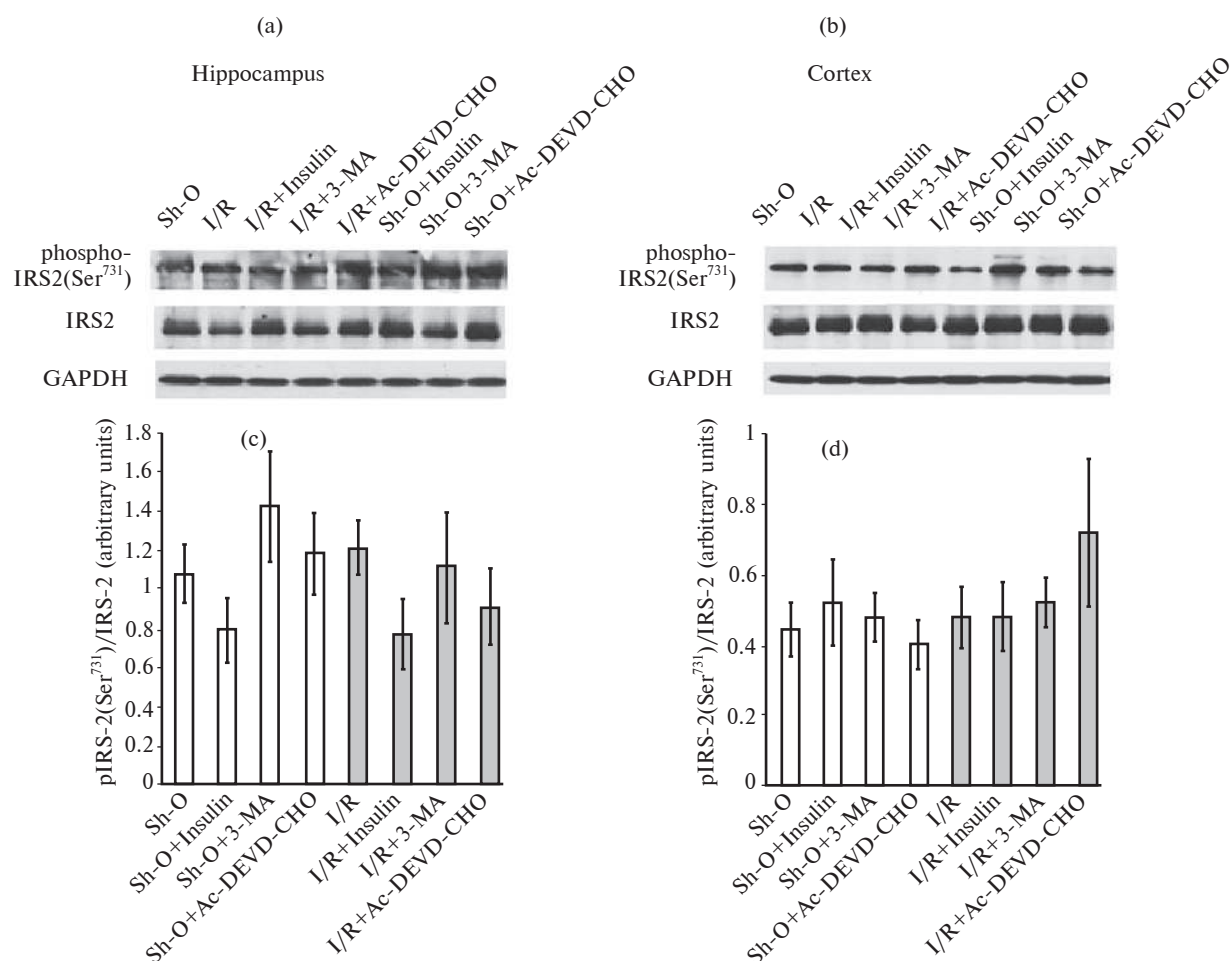


Рис. 6. Влияние введения инсулина и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-MA и ас-DEVD-CHO, соответственно) на уровень pIRS-2 (Ser⁷³¹) в гиппокампе и коре мозга при ишемии переднего мозга крыс и реперфузии. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM из 7–8 опытов. (a) и (c) – уровень pIRS-2 (Ser⁷³¹) в гиппокампе, (b) и (d) – уровень pIRS-2 (Ser⁷³¹) в лобной коре мозга, (a) и (b) – иммуноблотты, (c) и (d) – результаты денситометрии представлены как отношение pIRS-2 (Ser⁷³¹)/pIRS-2. Расшифровка сокращений на рисунке и другая информация приведены в легенде к рис. 1.

ния при болезни Альцгеймера, один из пробелов в понимании механизма его действия заключался в отсутствии данных о том, способен ли он снижать интенсивность процессов аутофагии, которые активируются при ишемии и реперфузии мозга, а также предотвращать аутофагическую гибель нейронов при этих патологических воздействиях.

В настоящей работе было показано, что уровень одного из основных маркеров аутофагии LC3B-II и активность каспазы-3 достоверно увеличиваются под влиянием ишемии и реперфузии в гиппокампе и в лобной коре мозга (рис. 1 и 2). Увеличение образования LC3B-II происходит благодаря тому, что цитозольная форма LC3 (LC3-I) при активации аутофагии переходит в липидированную форму LC3-II, которая играет важную роль в образовании аутофагосомальной мембраны [35–37]. При этом найдено, что интраназальное введение крысам инсулина значительно и достоверно снижает уровень LC3B-II и активность каспазы-3 в гиппокампе и в лобной коре мозга крыс при гло-

бальной ишемии и последующем восстановлении кровоснабжения переднего мозга (рис. 1 и 2). Это свидетельствует о способности инсулина подавлять, наряду с апоптозом, процессы аутофагии, активированные при ишемии и реперфузии мозга. Совокупность данных, полученных ранее [28–29] и в настоящей работе, однозначно свидетельствуют о способности инсулина ингибировать процессы аутофагии в ткани мозга и предотвращать или уменьшать гибель нейронов мозга, вызванную активацией аутофагии при ишемии и реперфузии мозга. В этом отношении инсулин теперь дополняет список тех нейропротекторов, которые способны повышать жизнеспособность нейронов при ишемии и реперфузии мозга, подавляя аутофагическую гибель нейронов [16, 19–24].

Полученные данные о способности инсулина подавлять процессы аутофагии в структурах переднего мозга согласуются с результатами опытов, полученных ранее *in vitro* [29]. Была продемонстрирована способность инсулина изменять до

контрольных значений уровень маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62 в нейронах коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса, являющегося одной из важнейших причин гибели нейронов при ишемии и последующей реперфузии мозга. Было показано, что при действии перекиси водорода на нейроны коры мозга в культуре уровень такого маркера аутофагии, как LC3B-II значительно возрастает, а уровень маркера аутофагии, SQSTM1/p62, подвергающегося деградации при активации аутофагии, достоверно снижается [29]. В случае преинкубации клеток с инсулином уровень LC3B-II, напротив, достоверно и сильно снижается, а уровень SQSTM1/p62 увеличивается. Нормализация уровней этих двух маркеров аутофагии инсулином говорит о том, что он подавляет активацию аутофагии в условиях окислительного стресса [29].

Ранее способность инсулина ингибировать процессы аутофагии была показана в экстра-невральных клетках и органах — в хондроцитах [38] и в сердце мышей с экспериментальным диабетом [39]. Недавно к этим работам прибавилась статья, показавшая, что интраназальное введение инсулина способно оказывать нейропротекторный эффект и подавлять аутофагическую гибель нейронов при травме головного или спинного мозга [40].

Что касается апоптотической гибели нейронов, то наши данные о том, что она снижается при введении инсулина крысам с ишемией и реперфузией мозга (рис. 4) согласуются с результатами других авторов об эффектах инсулина и его миметиков [41–42].

В последнее время существенное внимание уделяется и тем изменениям, которые при ишемии и реперфузии мозга претерпевают не только нейроны, но и глиальные клетки мозга [43–44]. Мы пытались установить, способен ли инсулин и ингибиторы аутофагии и апоптоза воздействовать на процессы, в которые вовлечены при ишемии и реперфузии астроглиальные клетки. Нами обнаружено увеличение уровня GFAP в гиппокампе и в лобной коре мозга при двухсосудистой ишемии и последующей трехдневной реперфузией переднего мозга. Увеличение уровня GFAP является показателем активации астроглии при ишемии и реперфузии переднего мозга и одним из проявлений воспалительных процессов [43]. При большой силе повреждающего воздействия этот показатель может рассматриваться как показатель глиоза и образования глиальных шрамов (glial scar) в ткани мозга, которые препятствуют восстановлению функций этого органа (см., например, [43]). Следует отметить, что, наряду с этим, активация астроглии в ткани мозга, усиливающая ее фагоцитарные функции, может способствовать нормализации патологических процессов и повышать жизнеспособность нейронов.

При этом в отдельных случаях небольшое повышение уровня GFAP может иметь место не только под влиянием ишемии и реперфузии, но и под влиянием нейропротектора и при этом может сочетаться с улучшением неврологических показателей и функционального состояния организма, с большей сохранностью нейронов [44]. В этом случае повышение уровня GFAP может иметь место под влиянием нейропротектора, может сочетаться с улучшением неврологических показателей и функционального состояния организма, с большей сохранностью нейронов. [44]. Само собой разумеется, что такой эффект возможен только в том случае, если активация астроглии не приводит к необратимому глиозу.

Учитывая все эти сведения, представляло бы большой интерес выявить влияние инсулина на увеличение уровня GFAP и активацию астроглии при ишемии и реперфузии мозга в условиях наших опытов. В гиппокампе и лобной коре мозга нам не удалось показать достоверного изменения уровня GFAP в изученных структурах мозга ни под влиянием инсулина, ни под влиянием ингибиторов аутофагии и апоптоза у крыс, подвергнутых ишемии и реперфузии (рис. 3). Однако при введении инсулина уровень GFAP в гиппокампе этих крыс снижался настолько, что переставал отличаться от его уровня в этом районе мозга ложно-оперированных крыс. Возможно, что при измененных условиях ишемического или реперфузионного воздействия, например, при меньшем времени реперфузии, которое в проведенных нами опытах составляла 3 суток, удастся выявить эффект инсулина на содержание GFAP в этом районе мозга. Для лобной коры оказалось характерным значительное увеличение уровня GFAP по сравнению с его уровнем в лобной коре мозга ложно-оперированных крыс как при ишемии и реперфузии, так и при этом воздействии, сопровождающимся введением инсулина или ингибиторов аутофагии и апоптоза (рис. 3).

В регуляции действия инсулина важную роль играют субстраты инсулинового рецептора (IRS). В ткани мозга они представлены преимущественно двумя формами — IRS-1 и IRS-2. Всего же насчитывается 6 форм белков IRS. Они подвергаются фосфорилированию по тирозиновым остаткам, что приводит к изменению их функциональной активности, в частности, к усилению ими инсулинового сигналинга [45–46]. К числу важных функций этих соединений относится также их способность ингибировать эффекты инсулина, в ткани мозга IRS-1 и IRS-2 осуществляют это ингибирование главным образом при их фосфорилировании по сериновым остаткам [46–47]. Этому фосфорилированию IRS-1 и IRS-2, судя по имеющимся данным, принадлежит важная роль в развитии резистентности к инсулину [47], т. к. фосфорилирование этих

белков по сериновым остаткам может уменьшать их тирозинное фосфорилирование и, соответственно, инсулиновый сигналинг. Показано, что фосфорилирование IRS-2 по Ser⁷³¹ значительно увеличивается в нервной ткани, в том числе в ганглиях дорсальных корешков, при диабете [47], что вносит вклад в развитие резистентности к инсулину при этой болезни. Мы не выявили достоверных изменений в степени фосфорилирования IRS-2 по Ser⁷³¹ ни под влиянием инсулина, ни под влиянием ингибиторов аутофагии и апоптоза (рис. 6). Но, если бы мы обнаружили достоверное повышение этого фосфорилирования под влиянием инсулина при ишемии и реперфузии в нашей работе, то можно было бы предполагать, что этот метаболический эффект инсулина вносит вклад в развитие резистентности к нему в условиях наших опытов.

Одной из целей нашего исследования было изучение влияния инсулина в опытах *in vivo* на активность протеинкиназ, регулирующих интенсивность процессов аутофагии и апоптоза. Протеинкиназа AMPK, как следует из ее названия, активируется при накоплении аденозинмонофосфата (AMP) [48]. Эта протеинкиназа активируется также другими стрессорными факторами, такими как образующиеся свободные радикалы, увеличенная концентрация ионов кальция в цитозоле и другими. Протеинкиназа AMPK при ее активации фосфорилирует по Ser³¹⁷ и Ser⁷⁷⁷ протеинкиназу ULK-1 [49], входящую в состав комплекса, инициирующего и активирующего аутофагию. Это приводит к активации как ULK-1, так и самого комплекса и запускает аутофагические процессы в клетках.

Нами показано, что интраназальное введение инсулина крысам, подвергнутым ишемии и реперфузии мозга, ингибирует активность AMPK в гиппокампе и лобной коре мозга крыс (рис. 5). При высоком энергетическом уровне содержание AMP и, соответственно, активность AMPK относительно низки, а комплекс mTORC1 гиперактивирован [50–52]. Напротив, при неблагоприятных воздействиях на нервные клетки происходит активация AMPK и запуск аутофагических процессов [50–51]. Ингибирование активности AMPK инсулином при его введении крысам с глобальной ишемией и реперфузией мозга, показанное в настоящей работе, несомненно вносит большой вклад в его способность ингибировать процессы аутофагии и предотвращать или снижать аутофагическую гибель нейронов мозга.

Другой протеинкиназой, активно участвующей в регуляции процессов аутофагии у млекопитающих, является протеинкиназа B (Akt). Она активирует mTOR комплекс 1 (mTORC1), обладающий протеинкиназной активностью и ингибирующий процессы аутофагии. mTORC1 осуществляет ингибирующее фосфорилирование по Ser⁷⁵⁷ проте-

инкиназы ULK-1 [49, 51], которая, как указывалось, входит в состав комплекса, инициирующего и активирующего аутофагию. При этом ингибирующем фосфорилировании ULK-1 этот комплекс также подвергается ингибированию [49, 51].

Нами показано, что введенный крысам инсулин вызывает значительную активацию протеинкиназы B (Akt) (рис. 4). Активация инсулином протеинкиназы Akt при его введении крысам с ишемией и реперфузией переднего мозга вносит, очевидно, большой вклад в предотвращение инсулином не только апоптотической, но и аутофагической гибели нейронов при этой патологии.

Интересно отметить, что под влиянием AMPK активация аутофагии происходит также благодаря инактивирующему влиянию этой протеинкиназы на mTOR сигнальный путь. При этом AMPK может ингибировать mTORC1, непосредственно воздействуя на него, а также наряду с этим эффектом эта протеинкиназа может фосфорилировать и активировать TSC1/2, который способен непрямым путем инактивировать mTORC1 [50].

Что касается антиапоптотического эффекта инсулина при его введении крысам, подвергнутым ишемии и реперфузии, то он в наибольшей мере обусловлен активацией инсулином протеинкиназы B или Akt. Это объясняется способностью Akt при ее активации фосфорилировать по Ser⁹ и инактивировать GSK-3beta, а также увеличивать синтез антиапоптотического белка Bcl-2. Активация GSK-3beta играет важнейшую роль в нарушении функций митохондрий, приводит к увеличению отношения Bax/Bcl-2 (про- к антиапоптотическому белку) и падению мембранного потенциала митохондрий (см., например, [53]). А инактивация GSK-3beta инсулином способствует нормализации метаболизма и предотвращению апоптотической гибели нейронов.

Данные о способности инсулина активировать протеинкиназу Akt и ингибировать протеинкиназу AMPK при ишемии и реперфузии мозга согласуются с ранее полученными результатами о механизме нейропротекторного эффекта инсулина при действии на нейроны коры мозга в состоянии окислительного стресса (который является также одной из основных причин гибели нейронов при ишемии и реперфузии мозга) в опытах *in vitro* [29]. В этих исследованиях нами были получены свидетельства того, что антиапоптотический и антиаутофагический эффекты инсулина на нейроны коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса связаны со значительным снижением им активности протеинкиназы AMPK, активацией протеинкиназы Akt, инактивацией протеинкиназы GSK-3beta благодаря ее фосфорилированию по Ser⁹ и с уменьшением отношения про- к антиапоптотическому белку митохондрий (Bax/Bcl-2) [29].

Таким образом, в настоящей работе показано, что интраназально введенный инсулин способен достоверно уменьшать интенсивность аутофагических процессов, ингибировать протеинкиназу АМРК-альфа, инициирующую аутофагические процессы и активировать протеинкиназу Акт, ингибирующую аутофагию, в таких структурах как гиппокамп и лобная кора мозга крыс с ишемией и реперфузией переднего мозга. Подтверждена способность инсулина снижать интенсивность апоптотических процессов в ткани мозга при ишемическом воздействии на него и последующей реперфузии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № I-6 от 26.01.2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22–25–00415.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. GBD2019 Stroke Collaborator (2021). Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol* 20 (10):795–820. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0)
2. Kuriakose D, Xiao Z (2020) Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives. *Int J Mol Sci* 21 (20): 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
3. Barthels D, Das H (2020) Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochim Biophys Acta. Mol Basis Dis* 1866 (4): 165260. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.012>
4. Cannistraro RJ, Badi M, Eidelman BH, Dickson DW, Middlebrooks EH, Meschia JF (2019) CNS small vessel disease: A clinical review. *Neurology*: 92 (24) 1146–1156. <http://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007654>
5. Han F, Zhang DD, Zhai FF, Xue J, Zhang JT, Yan S, Zhou LX, Ni J, Yao M, Yang M, Li ML, Jin ZY, Dai Q, Zhang SY, Cui LY, Zhu YC (2021) Association between large artery stenosis, cerebral small vessel disease and risk of ischemic stroke. *Sci China Life Sci*: 64 (9) 1473–1480. <http://doi.org/10.1007/s11427-020-849-x>
6. Markus HS, de Leeuw FE (2023) Cerebral small vessel disease: Recent advances and future directions. *Int J Stroke*: 18 (1) 4–14. <http://doi.org/10.1177/17474930221144911>
7. Fan LW, Carter K, Beatt A, Pang Y (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
8. Tashima T (2020) Shortcut approaches to substance delivery into the brain based on intranasal administration using nanodelivery strategies for insulin. *Molecules* 25 (21): 5188. <https://doi.org/10.3390/molecules25215188>
9. Craft S, Claxton A, Baker LD, Hanson AJ, Collerton B, Trittschuh EH, Dahl D, Caulder E, Neth B, Montine TJ, Jung Y, Maldjian J, Whitlow C, Friedman S (2017) Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: A pilot clinical trial. *J Alzheimers Dis* 57: 1325–1334. <https://doi.org/10.3233/JAD-1612566>
10. Avgerinos KI, Kalaitzidis G, Malli A, Kalaitzoglou D, Myserlis PG, Lioutas VA (2018) Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment. A systematic review. *J Neurol* 265: 1497–1510. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8768-0>
11. Novak P, Maldonado DAP, Novak V (2019) Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy: A double-blinded placebo-controlled pilot study. *PLoS One* 14: e0214364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214364>
12. Guo Z, Chen Y, Mao YF, Zheng T, Jiang Y, Yan Y, Yin X, Zhang B (2017) Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Sci Rep* 7: 45971. <https://doi.org/10.1038/srep45971>
13. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS (2016) Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology. *Mol Neurobiol* 53 (7): 4548–4562. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9384-y>
14. Zorina II, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova NF (2018) Insulin administration prevents accumulation of conjugated dienes and trienes and inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat cerebral cortex during two-vessel forebrain ischemia and reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 54 (3): 246–249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214364>
15. Zorina II, Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2019) Features of the changes in lipid peroxidation and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain of the aged rats in the conditions of two-vessel cerebral ischemia/reperfusion. *Adv Gerontol*. 32 (6): 941–947.

16. Nabavi SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima DK, Ahmed T, Shahid M (2019) Novel therapeutic strategies for stroke: the role of autophagy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 56(3): 182–199. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1575333>
17. Campbell BCV, Khatri P (2020) Stroke. *Lancet* 396 (10244): 149–142. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31179-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31179-X)
18. He C, Xu Y, Sun J, Li L, Zhang JH, Wang Y (2022) Autophagy and apoptosis in acute brain injuries: From mechanism to treatment. *Antioxid Redox Signal*. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0094>
19. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X (2014) N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci* 34: 2967–2978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1948-13.2014>
20. Wang M, Li Y-J, Ding Y, Zhang H-N, Sun T, Zhang K, Yang L, Guo Y-Y, Liu S-B, Zhao M-G, Qu Y-M (2016) Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 53: 932–943. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9062-5>
21. Li L, Tian J, Long MK-W, Chen Y, Lu J, Zhou C, Wang T (2016) Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy. *PLoS One* 11: e0144219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144219>
22. Li X, Wang M, Qin C, Fan W-H, Tian D-S, Liu J-L (2017) Fingolimod suppresses neuronal autophagy through the mTOR/p70S6K pathway and alleviates ischemic brain damage in mice. *PloS One* 12: e0188748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188748>
23. Hu Y, Zhou H, Zhang H, Sui Y, Zhang Z, Zou Y, Li K, Zhao Y, Xie J, Zhang L (2022) The neuroprotective effect of dexmedetomidine and its mechanism. *Front Pharmacol* 13: 965661. eCollection 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965661>
24. Zhang H, Wang X, Chen W, Yang Y, Wang Y, Wan H, Zhu Z (2023) Danhong injection alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy through miRNA-132–3p/ATG12 signal axis. *J Ethnopharmacol* 300:115724. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115724>
25. Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, John R, Barrett JR, Kirks R, Grace H, Kondrikova G, Johnson MH, Hess DC, Schoenlein PV, Hoda MN, Hill WD (2014) Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Transl Stroke Med* 6: 8. eCollection. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-6-8>
26. Liu X, Tian F, Wang S, Wang F, Xiong L (2018) Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury. *Rejuvenation Res* 215: 405–415. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1999>
27. Carloni S, Balduini W (2020) Simvastatin preconditioning confers neuroprotection against hypoxia-ischemia induced brain damage in neonatal rats via autophagy and silent information regulator 1 (SIRT1) activation. *Exp Neurol* 324: 113117. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113117>
28. Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova DK, Ilyasov IO, Avrova NF (2023) Intranasal insulin decreases autophagic and apoptotic death of neurons in the rat hippocampal CA1 region and frontal cortex under forebrain ischemia-reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 59 (1): 45–56. <https://doi.org/10.1134/S0022093023010040>
29. Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova DK, Avrova NF (2023) Neuroprotective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress is mediated by autophagy and apoptosis inhibition in vitro. *J Evol Biochem Phys* 59 (5): 1536–1550. <https://doi.org/10.1134/S0022093023050071>
30. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. Acad. Press. San Diego Calif. USA 1–237.
31. Молчанова СМ, Москвин АН, Захарова ИО, Юрлова ЛА, Носова ИЮ, Аврова НФ (2005) Влияние двухсосудистой ишемии переднего мозга и введения индометацина и квинакрин на активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы в разных областях мозга крыс. *Ж эвол биохим физиол* 41(1): 33–38. [Molchanova SM, Moskvina AN, Zakharova IO, Iurlova LA, Nosova IU, Avrova NF (2005) Na, K-ATPase activity in different brain regions in cerebral ischemia and influence of quinacrine and indomethacin administration. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 41(1):33–38. (In Russ)]
32. Sanderson TH, Wider JM (2013) 2-Vessel occlusion/hypotension: A rat model of global brain ischemia. *J Vis Exp* 76: e50173. <https://doi.org/10.3791/50173>
33. Zakharova IO, Sokolova TV, Vlasova YA, Bayunova LV, Rychkova MP, Avrova NF (2017) α-Tocopherol at nanomolar concentration protects cortical neurons against oxidative stress. *Int J Mol Sci* 18: 216. <https://doi.org/10.3390/ijms18010216>
34. Zick Y (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance *Sci STKE* 268: pe4. <https://doi.org/10.1126/stke.2682005pe4>
35. Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12):2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
36. Fritzen AM, Frøsig C, Jeppesen J, Jensen TE, Lundsgaard AM, Serup AK, Schjerling P, Proud CG, Richter EA, Kiens B (2016) Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. *Cell Signal* 28(6):663–674. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.03.005>
37. Bansal M, Moharir SC, Swarup G (2018) Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Commun Integr Biol* 11 (2): 1–4. <https://doi.org/10.1080/19420889.2018.1467189>

38. *Ribeiro M, López de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Caramés B* (2016) Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 24:731–739.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.017>
39. *Pires KM, Torres NS, Buffolo M, Gunville R, Schaaf C, Davis K, Selzman CH, Gottlieb RA, Boudina S* (2019) Suppression of cardiac autophagy by hyperinsulinemia in insulin receptor-deficient hearts is mediated by insulin-like growth factor receptor signaling. *Antioxid Redox Signal* 31(6):444–457.
<https://doi.org/10.1089/ars.2018.7640>
40. *Ding X, Zhang L, Zhang X, Qin Y, Yu K, Yang X* (2023) Intranasal insulin alleviates traumatic brain injury by inhibiting autophagy and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Neuroscience* 29:23–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.08.009>
41. *Sanderson TH, Kumar R, Murariu-Dobrin AC, Page AB, Krause GS, Sullivan JM* (2009) Insulin activates the PI3K-Akt survival pathway in vulnerable neurons following global brain ischemia. *Neurol Res* 31(9):947–958.
<https://doi.org/10.1179/174313209X382449>
42. *Russo V, Candeloro P, Malara N, Perozziello G, Iannone M, Scicchitano M, Mollace R, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C* (2019) Key role of cytochrome C for apoptosis detection using Raman microimaging in an animal model of brain ischemia with insulin treatment. *Appl Spectrosc* 73 (10): 1208–1217.
<https://doi.org/10.1177/0003702819858671>
43. *Zhu Y-M, Gao X, Ni Y, Li W, Ken TA, Qiao S-G, Wang C, Xiao-Xuan Xu X-X, Hui-Ling Zhang H-L* (2017) Sevoflurane postconditioning attenuates reactive astrogliosis and glial scar formation after ischemia-reperfusion brain injury. *Neuroscience* 356:125–141.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.004>
44. *Zhang R, Pei H, Ru L, Li H, Liu G* (2013) Bone morphogenetic protein 7 upregulates the expression of nestin and glial fibrillary acidic protein in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biomed Rep* 1(6): 895–900.
<https://doi.org/10.3892/br.2013.164>
45. *Yamada M, Ohnishi H, Sano SA, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H* (1997) Insulin receptor substrate IRS-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 272(48):30334–30339.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30334>
46. *Grote CW, Morris JK, Ryals JM, Geiger PC, Wright DE* (2011). Insulin receptor substrate 2 expression and involvement in neuronal insulin resistance in diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res* 2011: 212571.
<https://doi.org/10.1155/2011/212571>
47. *Boura-Halfon S, Zick T* (2009) Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(4): E581–591.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90437.2008>
48. *Li Y, Chen Y* (2019) AMPK and autophagy. *Adv Exp Med Biol* 1206: 85–108.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_4
49. *Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L* (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13 (2):132–141.
<https://doi.org/10.1038/ncb2152>
50. *Parzych KR, Klionsky DJ* (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signals* 20(3):460–473.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
51. *Yoon MS* (2017) The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling, nutrients. 9 (11): 1176.
<https://doi.org/10.3390/nu9111176>
52. *Sharma A, Anand SK, Singh N, Dwivedi UN, Kakkar P* (2023) AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis. *Exp Cell Res* 428(1):113614.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113614>
53. *Yang K, Chen Z, Gao J, Shi W, Li L, Jiang S, Hu H, Liu Z, Xu D, Wu L* (2017) The key roles of GSK-3 β in regulating mitochondrial activity. *Cell Physiol Biochem* 44:1445–1459.
<https://doi.org/10.1159/000485580>

INTRANASAL ADMINISTRATION OF INSULIN TO RATS WITH FOREBRAIN ISCHEMIA AND REPERFUSION DECREASES THE INTENSITY OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN HIPPOCAMPUS AND FRONTAL BRAIN CORTEX, POSSIBLE MECHANISM OF UNSULIN ACTION

I. O. Zakharova^a, L. V. Bayunova^a, D. K. Avrova^a, N. F. Avrova^{a,*}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia*

^{*}*E-mail: avrova@iephb.ru*

Rat forebrain ischemia and subsequent three-day reperfusion were found to result in an increase in the levels of autophagy marker LC3B-II and glial fibrillary acidic protein (GFAP) and activation of caspase-3 in the hippocampus and frontal cortex. At the same time, intranasal administration of 0.5 IU insulin to rats with forebrain ischemia and reperfusion (before ischemia and daily during reperfusion) markedly and significantly diminished the level of LC3B-II and caspase-3 activity in the hippocampus and frontal cortex. It demonstrates the ability of

insulin to inhibit the activation of autophagy and apoptosis in forebrain structures during ischemia and reperfusion. It was not possible to find out a significant decrease in the level of GFAP in these brain structures under the influence of insulin administration to animals. Intranasal administration of insulin has been found to activate the protein kinase Akt (which activates the mTORC1 complex, known to inhibit autophagy processes) and to inhibit the protein kinase AMPK (initiating autophagy processes) in the hippocampus and cerebral cortex of rats with forebrain ischemia and reperfusion. These effects of insulin apparently underly its ability to diminish the autophagic and apoptotic neuronal death. The data on the modulation by insulin, administered intranasally to rats with forebrain ischemia and reperfusion, of Akt and AMPK activities are in agreement with more detailed studies of the possible mechanism of the neuroprotective action of insulin, which we previously made *in vitro* on cortical neurons under oxidative stress conditions.

Key words: forebrain ischemia and reperfusion, autophagy, apoptosis, intranasal administration of insulin, protein kinases

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПИДНОГО ЭКСТРАКТА МОРСКОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *CODIUM FRAGILE* (SURINGAR) HARIOT ДЛЯ РЕПАРАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЫШЕЙ ПРИ СТРЕССОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2024 г. С. Е. Фоменко^{1,*}, Н. Ф. Кушнерова¹, В. Г. Спрыгин¹

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия

*e-mail: fomenko29@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Кодиум ломкий — *Codium fragile* (Suringar) Hariot — морская зеленая водоросль, относящаяся к семейству Codiaceae, является одним из массовых видов макрофитов Дальневосточного Региона РФ. Содержание липидов в талломе кодиума достигает 13.92 ± 0.22 мг в пересчете на г сухой ткани, из которых основную часть составляют нейтральные липиды и гликолипиды (40–44%), на долю фосфолипидов приходится 16%. Количество полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в липидном экстракте кодиума составляет свыше 50% от общей суммы, среди которых преобладают ПНЖК семейства ω -3 (36.2%) и ω -6 (17.8%). Изучено влияние липидного экстракта *C. fragile* и препарата сравнения Омега-3 на биохимические и физиологические показатели эритроцитов мышей, подвергнутых стрессовому воздействию (вертикальная фиксация за дорсальную шейную складку). Под действием стресса эритроциты претерпевают определенные изменения, как в отношении размерных характеристик, так и фосфолипидной составляющей мембран, что приводит к изменению проницаемости и лабильности, осложняется их циркуляция по капиллярному руслу. Эндогенная система антиоксидантной защиты организма мышей при стрессе испытывает значительное напряжение, о чем свидетельствует увеличение уровня малонового диальдегида при одновременном снижении активности супероксиддисмутазы и величины антирадикальной активности в плазме крови. Введение липидного экстракта *C. fragile* в условиях стресса сопровождалось восстановлением содержания липидов в мембранах эритроцитов, уменьшением количества лизофосфолипидов, а также нормализацией соотношения сфингомиелин/фосфатидилхолин, что способствовало восстановлению размерных параметров эритроцитов, их осмотической резистентности и показателей антиоксидантной системы крови. Выраженный мембранопротекторный эффект липидного экстракта *C. fragile* обусловлен наличием в его составе широкого спектра нейтральных и полярных липидов, содержащих ПНЖК семейства ω -3 и ω -6, что обеспечивает более высокую эффективность водорослевого экстракта при стрессе по сравнению с эталонным препаратом “Омега-3”.

Ключевые слова: липидный экстракт, *Codium fragile*, Омега-3, стресс, эритроциты, фосфолипиды, мыши

DOI: 10.31857/S0044452924010067, **EDN:** ZFMPXC

ВВЕДЕНИЕ

Морские водоросли являются ценным источником биологически активных соединений и функциональных пищевых продуктов, оказывающих благотворное влияние на здоровье. В многочисленных исследованиях сообщается, что морские водоросли обладают важными биологическими свойствами, такими как противовоспалительные, антиоксидантные, противомикробные, противоопухолевые и др. [1–3]. Настоящее исследование посвящено изучению *Codium fragile* (Suringar) Hariot — кодиум ломкий, одного из массовых видов зеленых водорослей. *C. fragile* относится к семейству

Codiaceae и является признанным космополитом, так как широко распространился в районах с умеренным климатом по всему земному шару [4] из своего родного ареала Азиатско-Тихоокеанского региона (Китай, Тайвань, Япония, Корея, Россия). В прибрежной акватории залива Петра Великого Японского моря кодиум растет в защищенных и полузащищенных бухтах у нижней границы литорали до глубины 3 м на скалистых, каменистых и илисто-песчаных грунтах [5]. В больших количествах развивается летом и осенью.

В Азии морские водоросли употреблялись в пищу с незапамятных времен. В современной Японии и Корее *C. fragile* часто используется в качестве

ингредиента для приготовления пищи, а также как восточное лекарство для лечения кишечных и урологических расстройств [6]. Данные литературы по химическому составу *C. fragile* существенно отличаются, что может быть связано с климатическими условиями региона, временем года, географией сосредоточения водорослей. Согласно исследованиям авторов [7], в составе *C. fragile* выявлено наличие значительных количеств углеводов (20.47%), белков (6.13%) и липидов (2.53%), а также отмечено высокое содержания полифенолов, флавоноидов, минеральных элементов (Mg, Ca, Fe, Cu, Zn). Ввиду наличия столь значительного количества углеводов в составе кодиума, большинство исследований посвящены выделению полисахаридов и изучению их биологической активности. Сульфатированные полисахариды, выделенные из кодиума, находят широкое применение для профилактики и лечения дислипидемии и ожирения [8], а также как иммуномодулирующие и противовоспалительные средства [9, 10].

В тоже время, не менее ценными составляющими морских водорослей являются липиды. В предыдущих наших исследованиях [11] изучение химического состава экстрактов, выделенных из разных видов морских макрофитов, относящихся к разным таксономическим группам, выявило явные различия в составе и содержании липидов, их жирных кислот, что обуславливает существенные отличия в биологической активности исследованных водорослевых экстрактов.

В работе Goecke и соавт. [12] отмечено, что липидные экстракты, полученные из разных видов рода *Codium* sp., проявляют антибактериальную, противовирусную, противогрибковую и цитотоксическую активность. И за эту активность отвечают различные представители обширного класса липидов: стеролы, жирные кислоты, гликолипиды и фосфолипиды, терпены и др. [13]. Благодаря способности морских водорослей продуцировать полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) С:18 и С:20, они привлекли к себе большое внимание исследователей всего мира [14]. Помимо того, что незаменимые жирные кислоты имеют высокую пищевую ценность, они являются важными составляющими фосфолипидных фракций клеточных мембран, участвуют в синтезе ряда гормонов, а также выполняют важную роль в процессах клеточной активности и генной экспрессии. Длинноцепочечные жирные кислоты морского происхождения могут снизить риск развития тромбозов, атеросклеротических бляшек в кровеносных сосудах, уменьшить содержание триглицеридов, холестерина в крови и уровень артериального давления [15], а также обладают гипохолестеринемическим, иммуностимулирующим и антиоксидантным действи-

ем, согласно исследованиям Sanhueza и соавт. [16] и Komal и соавт. [17].

Значительное содержание ПНЖК семейства ω -3 и ω -6, которые являются основными составляющими полярной фракций липидного комплекса *C. fragile* [18], по-видимому, обуславливает его высокую фармакологическую активность. Из опубликованных данных С. Хотимченко [19] следует, что содержание липидов в талломе кодиума, произрастающего в Дальневосточных морях, может достигать 4.4–5.3 мг/г сырого веса. При этом, одной из важных частей липидной составляющей кодиума являются фосфолипиды, относящиеся к категории структурообразующих и функциональных компонентов биомембран. Однако, изучение липидного экстракта *C. fragile*, как возможного мембранопротектора при стрессовом воздействии на организм, до настоящего времени не получило должного развития.

В качестве модели стресса в лабораторных исследованиях на мелких мышевидных грызунах применяют вертикальную фиксацию за дорсальную шейную складку [20]. Независимо от природы стресса (физический, иммобилизационный, холодовой, эмоциональный) организм реагирует неизменным набором биохимических и физиологических реакций, таких как гиперемия и гипертрофия коры надпочечников, дегградация тимико-лимфатической системы, появление изъязвлений в желудочно-кишечном тракте. Эти изменения в организме были названы “классической триадой стресса по Г. Селье”. Действие стресс-факторов (стрессоров) приводит к выбросу в кровь, так называемых гормонов стресса (кортикостероидов, катехоламинов), которые регулируют все обменные процессы в организме. Помимо этого, интенсивный стресс приводит к увеличению образования реактивных кислородных радикалов, что сопровождается пероксидацией липидов клеточных мембран [21]. В результате происходит образование полярных гидроперекисей липидов и разбалансировка в соотношении фосфолипидных фракций мембран, что приводит к изменению их проницаемости и возможным повреждениям [22]. Необходимо отметить, что первой мишенью действия стрессоров на организм являются эритроциты. Липидная составляющая эритроцитарных мембран представляет собой один из важных компонентов, характеризующий состояние клеточных мембран в органах и тканях всего организма при патологии [23]. При этом мембраны эритроцитов являются классической моделью для исследования защитного действия препаратов, так как они единственные из плазматических мембран, которые можно выделить в “чистом” виде, не загрязненных мембранами других клеток или клеточных органелл.

Цель работы — исследование состава липидного экстракта, выделенного из таллома морской зеленой водоросли *C. fragile*, и его воздействия на мембраны эритроцитов мышей в условиях острого стресса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все экземпляры водорослей *C. fragile* собирали вручную в летние месяцы в заливе Петра Великого Японского моря на глубине не более 2 м. Выборка водорослей составляла 100 талломов. Предварительная обработка собранного материала проводилась на базе научно-исследовательской станции. Для максимального очищения талломов от песка, зообентоса и разных загрязнений водоросли промывали в морской воде, затем в пресной воде. Далее очищенные экземпляры макрофитов погружали в кипящую воду на 2 мин для ингибирования активности ферментов, после чего отжимали и высушивали в естественных условиях до остаточной влажности ~30–40%. Высушенные образцы водорослей измельчали на лабораторной мельнице и хранили при температуре -20°C для проведения всех последующих аналитических процедур. Экстракцию липидов из высушенного сырья проводили в соответствии с методом, предложенным Bligh и Dyer [24]. Для этого один килограмм измельченного порошка водорослей экстрагировали 1.5 л смеси хлороформ: метанол (1:2 по объему) и оставляли на ночь. Для разделения фаз к смеси приливали 500 мл хлороформа и дистиллированной воды, затем смесь аккуратно перемешивали. Верхний водно-метанольный слой отделяли и удаляли, нижний хлороформенный слой, содержащий липидную фракцию, концентрировали на вакуумном испарителе (Type 349/2, Unipan, Польша) при температуре не выше 37°C . Содержание общих липидов в экстракте определяли взвешиванием высушенных до постоянного веса аликвот экстракта в 5-ти повторностях.

Хроматографическое распределение липидов проводили методом микротонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках с нанесенным слоем силикагеля марки “КСК” (ООО “Лабхимос”, Россия). Для разделения растительных гликолипидов использовали систему растворителей ацетон: бензол: вода в соотношении 91:30:8 (по объему) [25]. Гликолипиды выявляли на хроматограммах, используя антроновый реактив [26]. Определение количества общих фосфолипидов в водорослевом экстракте проводили по методу Vaskovsky и соавт. [27]. Для разделения фосфолипидов по фракциям использовали методом двумерной ТСХ системе растворителей: в первом направлении — смесь хлороформа: метанола: 28% аммиака в соотношении 65:35:5 (по объему), во

втором — смесь хлороформа: ацетона: метанола: ледяной уксусной кислоты: воды в соотношении 50:20:10:10:5 (по объему). Разделенные на хроматограммах фракции фосфолипидов обнаруживали 10% раствором серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием пластинок на закрытой электрической плите. Содержание индивидуальных фракций фосфолипидов рассчитывали в процентах от их общей суммы.

Хроматографическое распределение нейтральных липидов проводили методом одномерной ТСХ [28] в системе растворителей гексан: серный эфир: ледяная уксусная кислота в соотношении 80:20:1 об/об или 90:10:1 об/об. Пробы после хроматографирования обнаруживали парами йода. Содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы нейтральных липидов.

Состав жирных кислот в липидном экстракте водорослей анализировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Для этого получали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) путем переэтерификации липидов по методу Caggeau и Dubacq [29]. Полученные МЭЖК очищали с помощью ТСХ, используя в системе бензол, затем элюировали с силикагеля гексаном и выделенный элюат упаривали. МЭЖК перерастворяли в определенном объеме гексана и анализировали методом ГЖХ на хроматографе “ЛХМ-2000” (ОАО “Хроматограф”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Жирные кислоты идентифицировали сравнением времени удерживания (R_t) со стандартами и значениям “углеродных чисел” [30]. Результаты рассчитывали в процентах от общей суммы жирных кислот.

В эксперименте по моделированию стрессового воздействия использовали 40 беспородных белых мышей-самцов 8-недельного возраста массой тела 25–30 г. В период адаптации в течение 7 дней животные содержались в условиях вивария при комнатной температуре $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (в клетках по 5 особей) на базовом рационе питания, со свободным доступом к воде. Затем мышей разделили произвольно на контрольных (10 особей) и опытных (30 особей). Животные опытных групп подвергались стресс-вертикальной фиксации за дорсальную шейную складку на 24 ч. Непосредственно перед проведением эксперимента 10 мышей получали экстракт кодиума, 10 — препарат Омега-3, и 10 — физиологический раствор, спустя 6 ч препараты вводились повторно. Для создания одинаковых условий животным контрольной группы и группы “стресс” вводили эквивалентное количество 0.9% раствора NaCl. Введение физиологического раствора не оказывает влияние на результаты эксперимента, но при этом исключает погрешности исследования, так как любое внешнее раздражение является стрессом для организма.

Стандартизацию липидного экстракта кодиума проводили по сумме общих липидов. Животным одной из опытных групп вводили аптечный препарат Omega-3/Fish Oils (Now Foods, США), который использовали в качестве эталонного препарата сравнения. Препарат Омега-3 представляет концентрат натурального рыбьего жира, полученного из анчоусов. В 1 г препарата Омега-3 содержится 0.25 г насыщенных жирных кислот, 0.25 г мононенасыщенных жирных кислот и 0.5 г полиненасыщенных жирных кислот, представленных эйкозапентаеновой (180 мг) и докозагексаеновой (120 мг) кислотами. Липидный экстракт кодиума и липидный комплекс Омега-3 вводили в дозе 1 г/кг веса животного. Выбор использованной дозы основан на данных Новгородцевой и соавт. [31], а также собственных исследований. В результате были сформированы следующие группы: 1-я группа — контроль; 2-я группа — стресс (вертикальная фиксация) + физ. раствор; 3-я группа — стресс + липидный экстракт кодиума; 4-я группа стресс + Омега-3.

По окончании эксперимента животные подвергались декапитации под легким эфирным наркозом с соблюдением принципов и международных рекомендаций, изложенных в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (European Convention, 1986).

После отделения плазмы из крови, взятой с гепарином, эритроцитарную фракцию трижды отмывали охлажденным до +4°C изотоническим раствором натрия хлорида с последующим центрифугированием, каждый раз удаляя надосадочную жидкость. Для определения размерных параметров — средний объем (СОЭр) и средний диаметр эритроцитов (СДЭ) использовали автоматический гематологический анализатор “Abacus” производства австрийской компании “Diatron”. Для оценки физико-химических свойств эритроцитов использовали метод определения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) к различным воздействиям, в данном случае к изменению концентрации NaCl [32].

Липидный экстракт из эритроцитарной фракции получали традиционным способом [24]. Для разделения фосфолипидов по фракциям и их количественного определения использовали методом двумерной ТСХ, описание которого приведено выше. Содержание отдельных фракций фосфолипидов рассчитывали в процентах от их общей суммы.

Для оценки потенциала антиоксидантной защиты организма использовали следующие показатели: величину антирадикальной активности (АРА), активность супероксиддисмутазы (СОД), содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови. Все биохимические исследования проводили на

спектрофотометре “Shimadzu UV-2550” (Shimadzu, Япония).

Определение антирадикальной активности проводили методом, предложенным Bartosz и соавт. [33]. В термостатированную кювету помещали 10 мкл образца плазмы, 2.6 мл 0.1 М раствора фосфатного буфера, 90 мкл 5mM раствора ABTS, с последующим инкубированием в течении 5 мин при 37°C. Реакцию запускают добавлением 300 мкл 200 мМ раствора АВАР (2,2'-азобис(2-амидопропан) гидрохлорид) (Sigma, США) и регистрируют реакцию при $\lambda=414$ нм. Термическая декомпозиция АВАР сопровождается образованием алкил-пероксильных радикалов, которые окисляя ABTS, вызывают цветное окрашивание. В качестве стандарта сравнения использовали тролокс (водорастворимый аналог витамина Е). Антирадикальную активность выражали в мкМ тролокса на мл плазмы.

Активность СОД (КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически при 340 нм по методу Paoletti и соавт. [34]. Метод основан на фиксировании снижения оптической плотности при окислении НАДН, вызванного супероксид-анионом. Реакционная смесь содержала 80 мМ Трис-НСl буферного раствора (pH 7.4), 100 мкМ НАДН, 80 мкМ/40 мкМ ЭДТА/MnCl₂ и 0.1 мл плазмы. После инкубирования смеси при 25°C, запускали реакцию добавлением 0.1 мл 10 мМ меркаптоэтанола. Снижение поглощения оптической плотности регистрировали в течение 10 мин. Активность СОД выражали в условных единицах.

Для определения содержания МДА использовали метод [35], основанный на способности образующихся в биологических образцах низкомолекулярных альдегидов взаимодействовать с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного комплекса, имеющего максимум поглощения при $\lambda=535$ нм. Исходную смесь, содержащую 1 мл плазмы, 2 мл смеси реагентов (15% раствор трихлоруксусной кислоты, 0.375% раствор тиобарбитуровой кислоты, 0.25% раствор соляной кислоты), тщательно перемешивали, затем нагревали на водяной бане в течение 15 мин с последующим центрифугированием при 1000g для удаления осадка. Оптическую плотность определяли против холостой пробы, содержащей все ингредиенты кроме образца плазмы. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/мл плазмы.

Все биохимические исследования (контрольной и опытных групп) проводились не менее чем в трех повторностях. Полученные количественные данные выражали как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Обработку полученных данных проводили с помощью статистического пакета InStat 3.0 (GraphPad Software Inc. США). Статистическую значимость различий средних величин определя-

ли по непараметрическому критерию сравнения, применив тест Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна (Dunn's Multiple Comparisons Test) при сравнении нескольких групп. Различия считали статистически достоверными при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование состава липидного экстракта, выделенного из зеленой водоросли *C. fragile* показало, что общее содержание липидов составляло 13.92 ± 0.22 мг в пересчете на г сухой ткани. При этом 44% от общей суммы липидов составляли гликолипиды (6.12 мг/г сухой ткани) и 40% — нейтральные липиды (5.57 мг/г сухой ткани), на долю фосфолипидов приходилось 16% (2.23 мг/г сухой ткани). В составе фосфолипидов и гликолипидов присутствуют незаменимые ПНЖК, которые наряду с другими биологически активными соединениями определяют ценность морских организмов.

На рис. 1 представлено содержание нейтральных липидов и фосфолипидов по фракциям в липидном экстракте *C. fragile*. Среди нейтральных липидов преобладали триацилглицерины ($41.55 \pm 2.15\%$) и стеринны ($15.16 \pm 0.74\%$), содержание остальных минорных фракций составляло

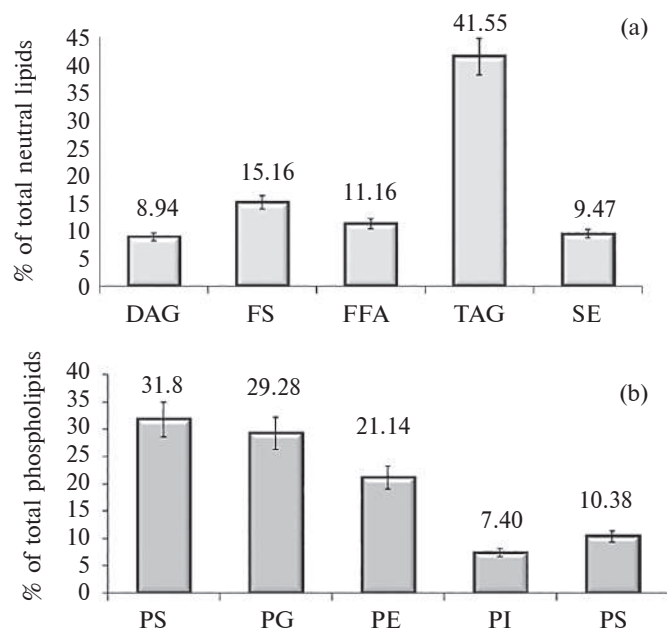


Рис. 1. Содержание фракций нейтральных липидов (a) и фосфолипидов (b) в липидном экстракте зеленой водоросли *Codium fragile*. DAG — диацилглицерины, FS — свободные стеринны, FFA — свободные жирные кислоты, TAG — триацилглицерины, SE — эфиры стериннов, PC — фосфатидилхолин, PG — фосфатидилглицерин, PE — фосфатидилэтанолламин, PI — фосфатидилинозит, PS — фосфатидилсерин.

в среднем 9–11%, в их числе диацилглицерины, эфиры стериннов и свободные жирные кислоты. Среди выделенных полярных фракций были идентифицированы пять фосфолипидов: фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилэтанолламин (ФЭ), фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидилсерин (ФС). При этом, основные фосфолипиды (ФХ, ФГ, ФЭ), относящиеся к структурообразующим и функциональным компонентам биологических мембран, отличались относительно высоким содержанием по сравнению с другими фосфолипидами. Их количество находилось в пределах 21–31% от общей суммы фосфолипидов. Полученные количественные показатели липидного состава кодиума согласуются с данными, представленными ранее в исследованиях Хотимченко [19].

Морские зеленые водоросли близки по составу жирных кислот с наземными растениями, однако по содержанию отдельных кислот могут сильно отличаться от них. Изучение жирно-кислотного состава *C. fragile* (табл. 1) показало, что содержание ПНЖК превалировало среди других идентифицированных жирных кислот и составляло 54% от их общей суммы. При этом доля насыщенных жирных кислот (НЖК) в липидном экстракте составляло 34% и мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) — 12%. Из НЖК основной по содержанию являлась пальмитиновая кислота (16:0), ее количество в липидном экстракте кодиума составляло более 28%. Среди МНЖК наибольшее количество (10.72%) приходилось на олеиновую кислоту (18:1 ω -9). Из ПНЖК, преобладающими по содержанию, являлись α -линоленовая (18:3 ω -3) (19.7%) и гексадекатриеновая (16:3 ω -3) (12.2%). При этом в зеленых водорослях содержание олеиновой и α -линоленовой кислот значительно превышает их количество в наземных растениях.

Следует отметить, что водоросли отдела Chlorophyta, в их числе *C. fragile*, отличаются присутствием значительных количеств C_{16} и C_{18} ПНЖК. Для водорослей семейства Codiaceae рода *Codium sp.* характерно высокое содержание ПНЖК 16:3, что является таксономическим признаком этого рода [12]. При этом водоросли рода *Codium sp.* способны синтезировать также длинноцепочечные C_{20} и C_{22} ПНЖК. Полученные результаты по содержанию жирных кислот в липидной фракции *C. fragile* согласуются с данными, приведенными в отечественных и зарубежных литературных источниках [12, 14, 19].

Следующая стадия экспериментального исследования состояла в изучении влияния липидного экстракта кодиума и препарата сравнения Омега-3 на биохимические и физиологические показатели эритроцитов мышей в условиях стресса.

Таблица 1. Жирно-кислотный состав липидной фракции таллома *Codium fragile* Suringar (Hariot) 1889

Жирные кислоты (в % от суммы всех фракций)	
Миристиновая кислота (14:0)	1.7±0.02
Пальмитиновая кислота (16:0)	28.38±1.45
Стеариновая кислота (18:0)	0.9±0.03
Пальмитолеиновая кислота (16:1 ω-7)	1.6±0.01
Олеиновая кислота (18:1 ω-9)	10.72±0.46
16:2 ω-6	2.6±0.12
Линолевая кислота (18:2 ω-6)	9.0±0.36
Гексадекатриеновая кислота (16:3 ω-3)	12.2±0.56
α-Линоленовая кислота (18:3 ω-3)	19.7±0.64
Арахидоновая кислота (20:4 ω-6)	6.2±0.23
Эйкозопентаеновая кислота (20:5 ω-3)	4.3±0.32
Бегеновая кислота (22:0)	2.7±0.04
Σ НЖК	33.68
Σ МНЖК	12.32
Σ ПНЖК	54.0

Примечание. НЖК — насыщенные жирные кислоты, МНЖК — моновенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты.

Под действием стресс-вертикальной фиксации во 2-й группе подопытных животных были выявлены существенные различия, как в отношении размерных параметров эритроцитов, так и их осмотической резистентности по сравнению с контрольной группой (табл. 2). При этом СДЭ превысил показатели контроля на 25% ($p < 0.001$), а СОЭр достоверно увеличился в 2 раза.

Количественное определение степени гемолиза эритроцитов у животных, подвергнутых стрессовому воздействию, показало уменьшение диапазона осмотической устойчивости эритроцитов. У стрессированных животных разрушение красных клеток крови начиналось раньше — при concentra-

ции $\text{NaCl} = 0.50 \pm 0.02\%$ (в контрольной группе при $\text{NaCl} = 0.45 \pm 0.01\%$), полный гемолиз отмечался уже при концентрации $\text{NaCl} = 0.45 \pm 0.02\%$ (в контрольной группе при $\text{NaCl} = 0.35 \pm 0.01\%$). Следовательно, под действием стресса отмечалось снижение осмотической резистентности, то есть начало появления гемолизированных эритроцитов происходит при более высокой, чем в норме концентрации хлорида натрия. Полный гемолиз эритроцитов у стрессированных животных был выявлен при концентрации NaCl на 29% ($p < 0.001$) выше таковой в контрольной группе.

Влияние стресса также отразилось на содержании отдельных фракций фосфолипидов, которые играют важную роль в структурно-функциональной целостности мембран эритроцитов. Из приведенных данных в табл. 3 следует, что стрессовое воздействие вызывает достоверное снижение количества ФХ и ФЭ в среднем на 14%, при этом отмечалось увеличение концентрации их лизоформ: лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 33% ($p < 0.05$) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) на 24% ($p < 0.05$), что может быть обусловлено активацией фосфолипаз под действием реактивных оксигенных радикалов, образующихся в значительном количестве при стрессе [36]. Избыток образующихся лизофосфолипидов под действием эндогенных фосфолипаз оказывает мембранолитическое действие, что приводит к нарушению упорядоченной структуры мембран, в результате возрастает их проницаемость, нарушается целостность мембранного матрикса с дальнейшей его деградацией [37].

Существенное влияние на структурно-функциональные свойства мембран оказывает содержание сфингомиелина (СМ), в составе которого содержатся преимущественно насыщенные жирные кислоты, поэтому СМ менее подвержен перекисидации. Отмеченное достоверное повышение уровня СМ на 20% ($p < 0.001$) при стрессе является защитно-приспособительной реакцией на уменьшение количества ФХ в мембране. Согласно исследованиям Shevchenko и Shishkina [38], сфингомиелин

Таблица 2. Влияние стресс-вертикальной фиксации на размерные характеристики и осмотическую резистентность эритроцитов мышей и их коррекция липидным экстрактом кодиума и Омега-3 ($M \pm m$)

Группы	1-я группа Контроль	2-я группа Стресс	3-я группа Стресс + кодиум	4-я группа Стресс + Омега-3
Средний диаметр эритроцитов (СДЭ, мкм)	6.50±0.12	8.21±0.18***	6.56±0.12 ³	7.00±0.14
Средний объем эритроцитов (СОЭр, мкм ³)	56.20±1.9	110.66±2.8***	56.46±1.86 ^{3, a}	70.08±2.50*
Осмотическая резистентность (% NaCl)	$\frac{0.45 \pm 0.01}{0.35 \pm 0.01}$	$\frac{0.50 \pm 0.02}{0.45 \pm 0.02^{**}}$	$\frac{0.40 \pm 0.02^1}{0.30 \pm 0.01^1}$	$\frac{0.40 \pm 0.01^1}{0.30 \pm 0.01^1}$

Примечание. Изменения статистически достоверны: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ — при сравнении с контролем; ¹ $p < 0.05$, ² $p < 0.01$, ³ $p < 0.001$ — со 2-й группой (стресс); ^a $p < 0.001$ — сравнение 3-й группы (кодиум) с 4-й группой (Омега-3).

Таблица 3. Влияние липидного экстракта кодиума и Омега-3 на содержание фосфолипидов в мембранах эритроцитов мышей при стрессе (% от суммы фракций, $M \pm m$)

Фосфолипиды	1-я группа Контроль	2-я группа Стресс	3-я группа Стресс + кодиум	4-я группа Стресс + Омега-3
Фосфатидилэтаноламин	24.55 ± 0.36	21.07 ± 0.69**	23.82 ± 0.39 ²	23.12 ± 0.16
Фосфатидилхолин	29.43 ± 0.62	25.22 ± 0.25***	27.93 ± 0.57 ¹	27.79 ± 0.39 ¹
Сфингомиелин	19.38 ± 0.31	23.22 ± 0.51***	19.90 ± 0.49 ²	20.16 ± 0.42 ¹
Лизофосфатидилэтаноламин	4.87 ± 0.27	6.05 ± 0.26*	4.53 ± 0.25 ^{2, a}	5.0 ± 0.17
Лизофосфатидилхолин	4.40 ± 0.53	5.87 ± 0.34*	4.71 ± 0.28	4.92 ± 0.17 ¹
Фосфатидилинозит	6.60 ± 0.15	7.40 ± 0.31*	6.57 ± 0.42	7.04 ± 0.23
Фосфатидилсерин	7.13 ± 0.20	7.62 ± 0.37	7.02 ± 0.44	7.71 ± 0.39
Фосфатидная кислота	3.64 ± 0.20	3.55 ± 0.16	5.52 ± 0.16*** ^{3, a}	4.26 ± 0.20
Сфингомиелин/ Фосфатидилхолин	0.66	0.92	0.71	0.72

Примечание. Изменения статистически достоверны: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ — при сравнении с контролем; ¹ $p < 0.05$, ² $p < 0.01$, ³ $p < 0.001$ — со 2-й группой (стресс); ^a $p < 0.05$ — сравнение 3-й группы (кодиум) с 4-й группой (Омега-3).

является важным компонентом стабильности мембраны и одной из основных фракций эритроцитов у грызунов разных видов. Рост доли СМ способствует увеличению микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов. Рассчитанный коэффициент СМ/ФХ был выше почти на 40% (табл. 2) по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о повышении жесткости мембраны эритроцитов и снижении их подвижности. Обращает на себя внимание также увеличение количества фосфатидилинозита (ФИ) на 12% ($p < 0.05$), который характеризуется высокой скоростью обмена по сравнению с другими фосфолипидами, при этом основная его часть расположена во внутреннем слое мембран. ФИ образует с белками сложный белково-липидный комплекс и обеспечивает передачу информации соединениям, управляющим физиологической активностью клетки, и сохраняя ее гомеостаз на молекулярном уровне [39]. При стресс-индуцированном воздействии потребность в передаче информации значительно возрастает, что, по-видимому, обуславливает повышение количества ФИ в мембране.

Из полученных данных следует, что в эритроцитах при стрессе происходят существенные изменения, как в отношении размерных характеристик, так и в соотношении фосфолипидных составляющих мембран, что вероятно отражается на их физико-химических свойствах, приводит к изменению проницаемости и лабильности, осложняется их циркуляция по капиллярному руслу.

Повышенная генерация свободных радикалов при стрессе [21] является одной из основных причин выявленных изменений в содержании мембранных фосфолипидов, которые наиболее

уязвимы к их действию, так как легко окисляются. Образующиеся радикалы кислорода взаимодействуют с ПНЖК фосфолипидов с образованием радикала жирной кислоты, что приводит к перекисному окислению липидов (ПОЛ) клеточных мембран и образованию окисленных фосфолипидов.

Накопление вторичных высокотоксичных продуктов ПОЛ свидетельствует об активации перекисного окисления жирных кислот фосфолипидов, что подтверждается увеличением количества МДА на 68% ($p < 0.001$) при одновременном снижении антирадикальной активности на 14% ($p < 0.05$) в плазме крови (рис. 2). Снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) на 40% ($p < 0.001$), одного из ключевых антиоксидантных ферментов, также свидетельствует о неконтролируемом усилении процессов липопероксидации и развитии оксидативного стресса.

При введении липидных комплексов кодиума и Омега-3 животным отмечалась тенденция к восстановлению нарушенных стрессом исследуемых размерных характеристик и осмотической устойчивости эритроцитов (табл. 2). Действие липидного экстракта кодиума сопровождалось сохранением размерных величин эритроцитов и отсутствием достоверных отличий от контрольных значений. В тоже время при сравнении с контролем аналогичных показателей у животных, получавших Омега-3, выявлено увеличение СОЭр на 25% ($p < 0.05$).

В отношении осмотической резистентности эритроцитов у животных обеих групп, получавших липидные препараты в условиях стресса, отмечено расширение границ устойчивости крас-

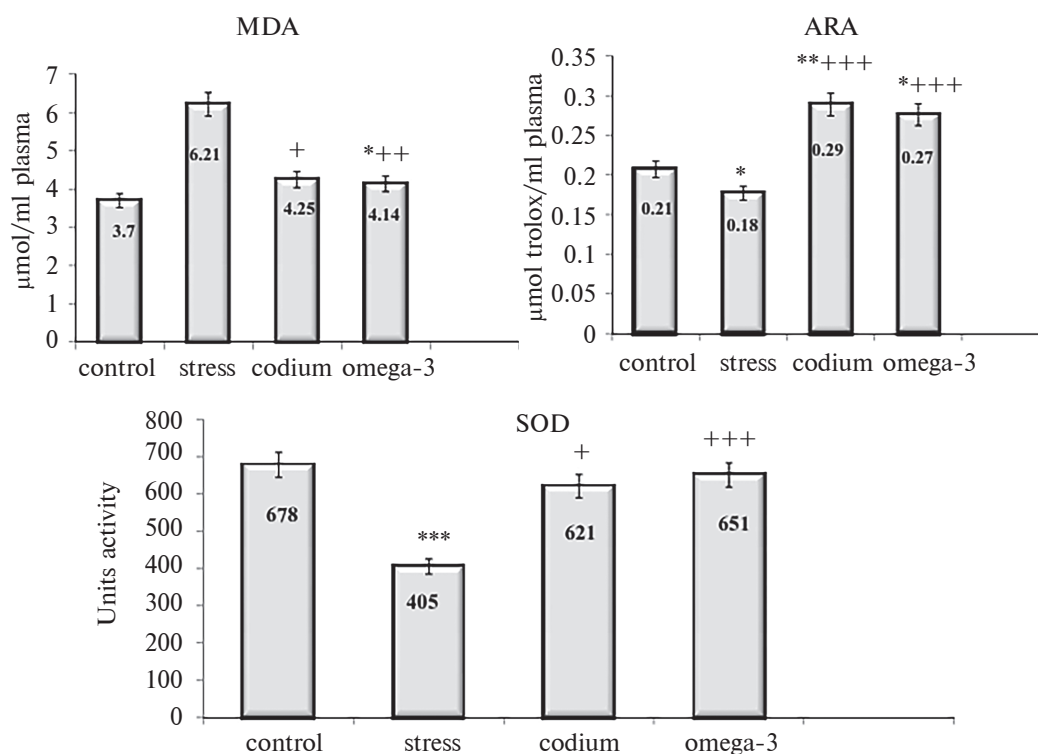


Рис. 2. Влияние липидного экстракта кодиума и Омега-3 на показатели антиоксидантной системы плазмы крови мышей при стрессе. MDA – малоновый диальдегид, ARA – антирадикальная активность, SOD – супероксиддисмутаза. Изменения статистически достоверны: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – при сравнении с контролем; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ – со 2-й группой (стресс).

ных клеток крови к гемолизирующему агенту. Так начало гемолиза у них происходило при концентрации $\text{NaCl} = 0.40 \pm 0.02\%$, а полный гемолиз – при $\text{NaCl} = 0.30 \pm 0.01\%$, что на 20% и 33% соответственно было ниже таковых концентраций во 2-й группе (стресс). Следовательно, липидный экстракт кодиума и Омега-3 способствовали восстановлению ОРЭ к снижению концентрации хлорида натрия в условиях стрессового воздействия.

При исследовании содержания основных фракций фосфолипидов в мембранах эритроцитов подопытных животных 3-й и 4-й групп, получавших липидные комплексы, не было выявлено достоверных отличий относительно контрольных значений (табл. 2). Сравнение данных показателей с аналогичными величинами во 2-й группе (стресс) показало увеличение количества основных структурных фосфолипидов мембран: ФХ в среднем на 11% ($p < 0.05$) и ФЭ на 13% ($p < 0.01$) и 10% соответственно. В отношении их лизофракций было выявлено снижение количества ЛФЭ на 25% ($p < 0.01$) в 3-й группе (кодиум) и ЛФХ на 16% ($p < 0.05$) в 4-й группе (Омега-3). Снижение количества лизофракций фосфолипидов, по-видимому, может свидетельствовать о падении активности фосфолипаз под действием липидных комплексов. В обеих группах мышей в мембранах эритроцитов достоверно снизилось содержание

СМ в среднем на 13–14%, что обусловило понижение коэффициента СМ/ФХ на 22–23% относительно 2-й группы (стресс). Также необходимо отметить значительное повышение уровня фосфатидной кислоты (ФК) на 55% ($p < 0.001$) в мембране эритроцитов мышей, получавших липидный экстракт кодиума. Данный факт имеет немаловажное значение для репарации поврежденных мембран эритроцитов под действием стресса, так как известно, что фосфатидная кислота является основой для синтеза многих фосфолипидов, в том числе ФХ и ФЭ. У мышей, получавших Омега-3, уровень ФК также повысился, но не столь значительно.

Полученные данные влияния липидных комплексов кодиума и Омега-3 на мембраны эритроцитов в условиях стресс-воздействия могут свидетельствовать о восстановлении липидных структур мембран, соответственно их проницаемости и лабильности, а также снижении повышенной жесткости.

Липидный экстракт кодиума и Омега-3 проявляли выраженное антиоксидантное действие, о чем свидетельствует достоверный рост показателей ARA на 63% и 56% соответственно относительно аналогичных значений в группе “стресс” (рис. 2). Также отмечалось восстановление активности СОД в плазме крови животных до уровня контроля на фоне достоверного снижения содер-

жания МДА в среднем на 32–33% по сравнению со 2-й группой (стресс), что свидетельствует об уменьшении активности процессов свободно-радикального окисления под действием липидных комплексов морского происхождения. Отмеченный эффект липидного экстракта кодиума и препарата сравнения Омега-3, по-видимому, вызван действием ПНЖК ω -3, способных активировать ферменты антиоксидантной защиты, в том числе СОД [40], тем самым предохраняя мембраны эритроцитов от повреждений. Согласно исследованиям Richard и соавт. [41] показано, что ПНЖК семейства ω -3, являются эффективными антиоксидантами направленного действия, способными “гасить” свободные радикалы.

Проведя сравнительный анализ действия липидного экстракта кодиума и Омега-3 в условиях стрессового воздействия животных, было выявлено, что оба липидных комплекса проявили выраженный защитный эффект в восстановлении размерных параметров эритроцитов, их осмотической устойчивости к гемолизу, а также показателей мембранных фосфолипидов и антиоксидантной системы. Однако по ряду показателей при расчете статистической достоверности между 3-й и 4-й группами животных были отмечены некоторые достоверные отличия. Так в 4-й группе мышей, получавших Омега-3 при стрессе, величина СОЭр достоверно отличалась от контрольных показателей и превышала на 24% ($p < 0.05$) соответствующие значения в 3-й группе животных, получавших липидный экстракт кодиума. В отношении фосфолипидных фракций мембран эритроцитов выявлено, что уровень ФК у животных 3-й группы (кодиум) на 30% ($p < 0.05$) превышал соответствующие показатели 4-й группы (Омега-3). При этом в содержании лизофракций мембранных фосфолипидов у мышей, получавших водорослевый экстракт, уровень ЛФЭ в эритроцитах мышей был достоверно ниже (на 10%) аналогичных значений у животных, получавших препарат сравнения Омега-3.

Таким образом, липидный экстракт кодиума в условиях стресс-индуцирующего воздействия проявлял большую эффективность по сравнению с Омега-3, как в отношении восстановления размерных показателей эритроцитов, так и фосфолипидной составляющей их мембран, что может быть обусловлено преимущественно различным составом исследуемых комплексов. Необходимо отметить, что препарат Омега-3 в качестве основных действующих веществ содержит полиненасыщенные жирные кислоты (эйкозапентаеновую и докозагексаеновую), а также насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты. В свою очередь, липидный экстракт кодиума характеризуется более разнообразным составом. В его состав входят пять

основных видов класса фосфолипидов, содержащих жирные кислоты с преимущественным преобладанием ПНЖК ω -3 (α -линоленовая, гексадекатриеновая, эйкозопентаеновая) и ω -6 (линолевая, арахидоновая), а также насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты. По-видимому, такой многокомпонентный состав липидного экстракта кодиума определяет более высокую биологическую активность, чем у Омега-3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование состава липидного экстракта *C. fragile* показало наличие неполярных и полярных фракций липидов, содержащих незаменимые жирные кислоты семейства ω -3 и ω -6. Из полученных данных по изучению структурных и физиологических характеристик эритроцитов мышей в условиях стрессового воздействия следует, что липидный экстракт *C. fragile* обладает мембранопротекторным действием. Эффект липидного экстракта кодиума в условиях стресса проявлялся в отсутствии макроцитоза эритроцитов, сохранении их осмотической устойчивости к гемолизирующему агенту, а также в восстановлении показателей мембранных фосфолипидов и антиоксидантной защиты организма. Входящие в состав *C. fragile* фосфолипиды, как основные структурообразующие и функциональные компоненты всех биомембран, по-видимому, обеспечивают мембранно-репарирующую функцию, встраиваясь в поврежденные мембраны эритроцитов. Преимущество защитного действия липидного экстракта кодиума перед препаратом Омега-3 обусловлено наличием в его составе широкого спектра липидной составляющей, а именно: гликолипидов, нейтральных липидов, фосфолипидов и полиненасыщенных жирных кислот с преобладанием семейств ω -3 и ω -6. Полученные данные свидетельствуют, что использование липидных комплексов, выделенных из морских водорослей, в частности из *C. fragile*, имеет большие перспективы для создания профилактических препаратов с мембранопротекторными свойствами.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С.Е.Ф. осуществляла планирование эксперимента, сбор данных, участвовала в обработке экспериментального материала и обсуждении полученных данных, написании статьи. Н.Ф.К. осуществляла планирование эксперимента, сбор данных, участвовала в обработке экспериментального материала и обсуждении экспериментальных данных. В.Г.С. осуществлял планирование эксперимента, участвовал в обработке экспериментального материала и обсуждении экспериментальных данных, осуществлял техническую поддержку при проведении экспериментов с животными.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ТОИ ДВО РАН по теме “Эколого-биогеохимические процессы в морских экосистемах: роль природных и антропогенных факторов” (0211–2021–0014). Регистрационный номер: 121–21500052–9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены Этическим комитетом Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН им. В.И. Ильичева (протокол № 21 от 10.11.2022 г.). Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perez MJ, Falque E, Dominguez H (2016) Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Mar Drugs* 14: 52. <https://doi.org/10.3390/md14030052>
2. Khalifa SAM, Elias N, Farag MA, Chen L, Saeed A, Hegaz MF, Moustafa MS, Abd El-Wahed A, Al-Mousawi SM, Musharraf SG (2019) Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer. *Mar Drugs* 17: 491. <https://doi.org/10.3390/md17090491>
3. Agatonovic-Kustrin S, Morton DW, Ristivojević P (2016) Assessment of antioxidant activity in Victorian marine algal extracts using high performance thin-layer chromatography and multivariate analysis. *J Chromatogr A* 1468: 228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.041>
4. Cherif W, Ktari L, Bour MEI, Boudabous A, Grignon-Dubois M (2016) *Codium fragile* subsp. *fragile* (Suringar) Hariot in Tunisia: morphological data and status of knowledge. *Algae* 31: 129. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.4.17>
5. Титлянов ЭА, Титлянова ТВ (2012) Морские растения стран Азиатско–Тихоокеанского региона, их использование и культивирование. Владивосток: Дальнаука. [Titlyanov EA, Titlyanova TV (2012) Marine plants of the countries of the Asia-Pacific region, their use and cultivation. Vladivostok: Dalnauka (In Russ)].
6. Ahn J, Kim MJ, Yoo A, Ahn J, Ha T, Jung C.H, Seo HD, Jang YJ (2021). Identifying *Codium fragile* extract components and their effects on muscle weight and exercise endurance. *Food Chemistry* 353: 129463. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129463>
7. Kolsi RBA, Salah HB, Hamza A, El feki A, Allouche N, El feki L, Belguith K (2017) Characterization and evaluating of antioxidant and antihypertensive properties of green alga (*Codium fragile*) from the coast of Sfax. *J Pharmacogn Phytochem* 6: 186.
8. Kolsi RBA, Jardak N, Hajkacem F, Chaaben R, Jribi I, Feki AE, Rebai T, Jamoussi K, Fki L, Belghith H, Belghith K (2017) Anti-obesity effect and protection of liver-kidney functions by *Codium fragile* sulphated polysaccharide on high fat diet induced obese rats. *Int J Biol Macromol* 102: 119. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.017>
9. Park H-B, Hwang J, Zhang W, Go S, Kim J, Choi I, You SG, Jin J-O (2020) Polysaccharide from *Codium fragile* Induces Anti-Cancer Immunity by Activating Natural Killer Cells. *Mar Drugs* 18: 626. <https://doi.org/10.3390/md18120626>
10. Lee C, Park GH, Ahn EM, Kim BA, Park CI, Jang JH (2013) Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in Ha-CaT cells and BALB/c mice. *Fitoterapia* 86: 54.
11. Fomenko SE, Kushnerova NF, Sprygin VG, Drugova ES, Lesnikova LN, Merzlyakov VY, Momot TV (2019) Lipid Composition, Content of Polyphenols, and Antiradical Activity in Some Representatives of Marine Algae. *Russ J Plant Physiol* 66: 942–949.
12. Goecke F, Hernandez V, Bittner M, Gonzalez M, Becerra J, Silva M (2010) Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Rev Biol Marin Oceanograf* 45: 325.
13. Caccamese S, Azzolina D, Furnari G, Cormaci M, Grasso S (1981) Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily. *Botanic Marin* 24: 365. <http://dx.doi.org/10.1515/botm.1981.24.7.365>
14. Dembitsky VM, Rezankova H, RezankaT, Hanus LO (2003) Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus *Codium*. *Biochem Systemat Ecol* 31: 1125. [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(03\)00043-7](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(03)00043-7)
15. Jump DB, Depner CM, Tripathy S, Lytle KA (2015) Potential for Dietary omega-3 Fatty Acids to Prevent Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Reduce the Risk of Primary Liver Cancer. *Adv Nutr* 6: 694–702. <https://doi.org/10.3945/an.115.009423>
16. Sanhueza J, Nieto SK, Valenzuela AB (2002) Conjugated linoleic acid: a trans isomer fatty acid potentially beneficial. *Revist Chilén Nutrición* 29: 98–105.
17. Komal F, Khan MK, Imran M, Ahmad MH, Anwar H, Ashfaq UA, Ahmad N, Masroor A, Ahmad RS, Nadeem M, Nisa MU (2020) Impact of different omega-3 fatty acid sources on lipid, hormonal, blood glucose, weight gain and histopathological damages profile in PCOS rat model. *J Transl Med* 18: 349. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02519-1>
18. Ortiz J, Uquiche E, Robert P, Romero N, Quiral V, Llantén C (2009) Functional and nutritional value of the Chilean

- seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. Eur J Lipid Sci Technol 111: 320. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800140>
19. Хотимченко СВ (2003) Липиды морских водорослей-макрофитов и трав. Структура, распределение, анализ. Владивосток: Дальнаука. [Khotimchenko SV (2003) Lipids of marine algae-macrophytes and herbs. Structure, distribution, analysis. Vladivostok: Dalnauka. (In Russ)].
 20. Кушнерова НФ, Спрыгин ВГ, Фоменко СЕ, Рахманин ЮА (2005) Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика. Гиг санитар 5: 17–21. [Kushnerova NF, Sprygin VG, Fomenko SE, Rakhmanin YuA (2005) Impact of stress on hepatic lipid and carbohydrate metabolism, prevention. Hyg Sanit 5: 17–21. (In Russ)].
 21. Sahin E, Gumüşlu S (2007) Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). Clin Exp Pharmacol Physiol 34: 425–431. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x>
 22. Kovacs P, Juranek I, Stankovicova T, Svec P (1996) Lipid peroxidation during acute stress. Pharmazie 51: 51–53.
 23. Морозова ВТ, Луговская СА, Почтарь МЕ (2007) Эритроциты: структура, функции, клинико-диагностическое значение. Клин лаб диагн 10: 21–35. [Morozova TV, Lugovskaya SA, Pochtars ME (2007) Red blood cells: structure, function, clinical and diagnostic value. Klin Lab Diagn 10: 21–35. (In Russ)].
 24. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911–917.
 25. Vaskovsky VE, Khotimchenko SV (1982) HPTLC of Polar Lipids of Algae and Other Plants J Chromatography 5: 635–636. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240051113>
 26. Van Gent CM, Roseleur OJ, Van Der Bijl P (1973) The detection of cerebrosides on thin-layer chromatograms with an anthrone spray reagent. J Chromatogr 85: 174–176.
 27. Vascovsky VE, Kostetsky EY, Vasendin IM (1975) Universal Reagent for Phospholipid Analysis J Chromatography 114: 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85249-8)
 28. Amenta JS (1964) A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. J Lipid Res 5: 270–272. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40251-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40251-2)
 29. Carreau JP, Dubacq JP (1978) Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. J Chromatogr 151: 384–390. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88356-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88356-9)
 30. Christie WW (1988) Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography A reappraisal. J Chromatogr 447: 305–314.
 31. Новгородцева ТП, Караман ЮК, Бивалькевич НВ, Жукова НВ (2010) Использование биологически активной добавки к пище на основе липидов морских гидробионтов в эксперименте на крысах. Вопр питан 79: 24–27. [Novgorodtseva TP, Karaman YuK, Bivalkevich NV, Zhukova NV (2010) The use of biologically active food supplements based on lipids of marine aquatic organisms in an experiment on rats. Probl Nutrition 79: 24–27. (In Russ)].
 32. Меньшиков ВВ (ред) (1987) Лаб мет исслед клин. М.: Медицина. [Menshikov VV (ed.) (1987) Lab Res Methe Clinic M.: Medicine. (In Russ)].
 33. Bartosz G, Janaszewska A, Ertel D, Bartosz M (1998) Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity. Biochem Mol Biol Int 46: 519–528. <https://doi.org/10.1080/15216549800204042>
 34. Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide-dismutase activity in tissue-extracts. Analyt Biochem 154: 536–541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
 35. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. N.Y.: Academic Press 52: 302–310.
 36. Adibhatla RM, Hatcher JF (2008) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipidperoxidation in CNS pathologies. BMB reports 41: 560–567. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.8.560>
 37. Cumming DS, Mchowat J, Schnellmann RG (2000) Phospholipase A2s in cell injury and death. J Pharmacol Experim Therapeutic 294: 793–799.
 38. Shevchenko OG, Shishkina LN (2011) Comparative analysis of phospholipid composition in blood erythrocytes of various species of mouse-like rodents. J Evol Biochem Physiol 47: 179–186. <https://doi.org/10.1134/s0022093011020071>
 39. Zabelinskii SA, Chebotareva MA, Shukolyukova EP, Krivchenko AI (2017) Phospholipids, fatty acids and hemoglobin in rat erythrocytes under stress conditions (swimming at low temperature). J Evol Biochem Physiol 53: 17–24. <https://doi.org/10.1134/s0022093017010021>
 40. Garrel C, Alessandri J-M, Guesnet P, Al-Gubory KH (2012) Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. Int J Biochem Cell Biol 44: 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.007>
 41. Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F (2008) Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. Pharmacol Res 57: 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.05.002>

EFFICACY OF LIPID EXTRACT OF MARINE GREEN ALGA *CODIUM FRAGILE* (SURINGAR) HARIOT FOR REPAIR OF MOUSE RED CELLS MEMBRANES UNDER STRESS EXPOSURE

S. E. Fomenko^{a, #}, N. F. Kushnerova^a, V. G. Sprygin^a

^a *Ilyichev Pacific Oceanological Institute FEB RAS, Vladivostok, Russia*

[#] *e-mail: fomenko29@mail.ru*

Codium fragile (Suringar) Hariot is a marine green alga belonging to the Codiaceae family, is one of the mass species of macrophytes in the Far East Region of the Russian Federation. The total lipid content was 13.92 ± 0.22 mg per g of dry tissue, of which 44% were glycolipids and 40% were neutral lipids, phospholipids accounted for 16%. The content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) was over 50% of the total fatty acids, of which PUFAs of the ω -3 family (36.2%) and ω -6 family (17.8%) predominated. Under of stress exposure (vertical fixation by dorsal neck fold) the effect of lipid extract of *C. fragile* and reference remedy Omega-3 on biochemical and physiological parameters of mice erythrocytes was studied. Under the impact of stress erythrocytes undergo certain changes, as in terms of dimensional characteristics so as in phospholipid pattern of membranes. This leads to changes in its permeability and lability, also made more complex their circulation through the capillary bed. The endogenous antioxidant defense system of mice under stress experiences a considerable strain, as evidenced by the increase in the level of malonic dialdehyde while reducing in the activity of superoxide dismutase and the level of anti-radical activity in blood plasma. The administration of the lipid extract of *C. fragile* under stress conditions was accompanied by the restoration of the lipid content in the erythrocyte membranes, a decrease in the amount of lysophospholipids, and the normalization of the sphingomyelin/phosphatidylcholine ratio, which contributed to the restoration of the dimensional parameters of erythrocytes, their osmotic resistance, and indices of the body's antioxidant system. The pronounced stress- and membrane-protective effect of the lipid extract of *C. fragile* is due to the presence in its composition of a wide range of neutral and polar lipids containing PUFAs of the ω -3 and ω -6 families, which ensures a higher efficiency of the algal extract under stress compared to the reference preparation "Omega-3".

Keywords: lipid extract, *Codium fragile*, omega-3, stress, erythrocytes, phospholipids, mice

УПРАВЛЕНИЕ ИММУННЫМ ОТВЕТОМ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ СПИННОГО МОЗГА *Danio Rerio* ПОСРЕДСТВОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПРОДУЦИРОВАННЫХ АКТИВИРОВАННЫМИ МОНОЦИТОПОДОБНЫМИ КЛЕТКАМИ

© 2024 г. Д. Б. Самбур¹, О. В. Калинина¹, А. Д. Акино¹, П. В. Тирикова¹, Е. Е. Королева¹, А. С. Трулев², А. А. Рубинштейн^{1,2}, Л. А. Мурашова¹, И. В. Кудрявцев^{1,2}, А. С. Головкин^{1,*}

¹ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

*e-mail: golovkin_a@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

Реакция иммунной системы на повреждение спинного мозга реализуется местным и системным воспалением с последующей репарацией и восстановлением функции поврежденных органов. Возможность управления провоспалительной активностью и стимуляция процессов регенерации является важным аспектом исследования. В качестве инструмента могут выступать внеклеточные везикулы (ВВ), продуцируемые активированными моноцитоподобными клетками, регулирующая деятельность которых может приводить к поляризации иммунного ответа в М1 или М2 направлении. Цель исследования — изучить системные эффекты внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками линии ТНР-1, при моделировании повреждения спинного мозга у рыб *Danio rerio*. Было показано, что интрацеломическое введение ВВ, полученных при стимуляции клеток фактором некроза опухоли (TNF), рыбам *Danio rerio* с травмой спинного мозга приводило к провоспалительному эффекту, проявлявшемуся увеличением экспрессии генов *il-6* и *tnf-α* в тканях мозга, и к менее выраженному изменению активности в тканях сердца, печени и почки. ВВ, полученные от неактивированных клеток, а также от клеток, активированных РМА (4-phorbol-12-myristate-13-acetate) такой активностью не обладали. Таким образом, продемонстрирована возможность посредством внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками, влиять на поляризацию иммунного ответа после смоделированной травмы спинного мозга у рыб *Danio rerio*.

Ключевые слова: *Danio rerio*, травма спинного мозга, внеклеточные везикулы, клетки ТНР-1, экспрессия генов, системное воспаление

DOI: 10.31857/S0044452924010072, **EDN:** ZFKZWG

ВВЕДЕНИЕ

Повреждение центральной нервной системы (ЦНС), черепно-мозговые травмы, травмы спинного мозга приводят к гибели нейронов и глии в очаге поражения и вызывают развитие воспалительной реакции [1]. На ранних этапах иммунного ответа вследствие нейротравмы происходит активация нейроглии (микроглии, астроциты и др.) [2–4], рекрутирование и инфильтрация периферических иммунных клеток (нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов) в очаг повреждения [2, 5], высвобождение DAMP (дистресс-ассоциированных молекулярных паттернов), таких как белки теплового шока (HSP), мочевая кислота, ДНК, РНК и др., которые, взаимодействуя с Toll-подобными и NOD-подобными рецепторами, способны за-

пускать и усиливать процессы системного воспаления, в том числе и нейровоспаления [2, 6]. Активация клеток нейроглии и периферических иммунных клеток приводит к секреции провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей альфа (TNF-α), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-1β (IL-1β)), которые представляют собой ранние эффекторы, вызывающие развитие посттравматического воспаления [7]. Несмотря на то, что формирование нейровоспаления направлено на устранение повреждения, неконтролируемый воспалительный каскад способен приводить к вторичным повреждениям ЦНС, что часто препятствует функциональному восстановлению нервной ткани [2, 8]. Регулирование воспалительных реакций на ранних стадиях поражения ЦНС может быть эффективным методом нейропротекции [8].

При изучении механизмов развития и возможностей регуляции системного воспаления особое значение уделяют внеклеточным везикулам, как одним из ключевых факторов межклеточной коммуникации и регуляции различных биологических процессов, начиная от поддержания гомеостаза до развития и прогрессирования многих патологических состояний, в том числе воспалительных [9]. Внеклеточные везикулы в своем составе эффективно переносят различные регуляторные молекулы, такие как малые некодирующие РНК, длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, ДНК, ферменты, липиды, гормоны, цитокины и другие [2, 10–14]. В совокупности термин “внеклеточные везикулы” включает в себя три группы частиц, отличающихся между собой размером и механизмом образования: экзосомы имеют самый маленький размер от 30 до 150 нм, микровезикулы от 100 до 1000 нм, и наиболее крупными являются апоптотические тельца (>1000 нм) [2, 6]. Экзосомы образуются внутриклеточно путем отпочкования мембраны эндосом, формируя мультивезикулярные тельца, при слиянии последних с плазматической мембраной экзосомы высвобождаются во внеклеточное пространство [6]. В свою очередь, микровезикулы и апоптотические тельца формируются в результате прямого выпячивания и отпочковывания плазматической мембраны клетки [15]. В пределах ЦНС внеклеточные везикулы секретируются всеми основными популяциями клеток, такими как нейроны, астроциты, микроглия и олигодендроциты [6]. В нервной ткани ВВ способны регулировать работу нейронов, синаптическую пластичность, оказывать эффект на формирование и поддержание миелинизации, нейропротекции, распространение и клиренс токсичных белковых агрегатов [6, 16]. Ранее на крысиной модели с повреждением спинного мозга (spinal cord injury (SCI)) был показан потенциал внеклеточных везикул, продуцируемых нейральными стволовыми клетками (neural stem cell-derived extracellular vesicles), уменьшать апоптоз нейронов, ингибировать нейровоспаление и способствовать функциональному восстановлению крыс с моделью SCI путем активации аутофагии [17].

В последние годы маленькая тропическая рыба *Danio rerio*, в силу простоты и экономичности разведения, высоким содержанием генов-ортологов с *Homo sapiens*, стала входить в группу лидеров наиболее востребованных модельных организмов для изучения как физиологически нормальных, так и патологических состояний организма человека [9]. Особенно ценной моделью рыбы *Danio rerio* представляются для изучения процессов, происходящих в центральной нервной системе, поскольку анатомическая организация мозга этих рыб и протекающие в нём нейрохимические процессы во многом схожи с таковыми у млекопита-

ющих [18]. Головной мозг рыб *Danio rerio* состоит из переднего, среднего и заднего мозга, подобно промежуточному мозгу, конечному мозгу и мозжечку млекопитающих. Сходство с млекопитающими обнаруживается также на клеточном уровне, так у рыб *Danio rerio* присутствуют такие типы клеток как астроциты, микроглия, олигодендроциты, клетки Пуркинье, миелин и мотонейроны. Более того в нервной ткани рыб содержатся и основные нейромедиаторы (ГАМК, серотонин, дофамин, ацетилхолин, гистамин и глутамат) [18, 19]. Например, на модели рыб *Danio rerio* были исследованы молекулярные механизмы нейровоспаления, лежащие в основе дефектов памяти, вызванных гипоксией, и показано, что глюкозамин (GlcN)-ассоциированный метаболический путь гексозамина может быть важной терапевтической мишенью при гипоксическом повреждении головного мозга [20]. Недавние исследования показали возможности использования рыб *Danio rerio* в качестве уникальной модели для изучения клеточных и молекулярных процессов регенерации нейронов после повреждения спинного мозга, в том числе пролиферации и миграции различных типов клеток в очаг повреждения, а также вовлечение в эти процессы клеток-предшественников. В свою очередь, это открывает перспективы для изучения новых подходов к терапии повреждений нервной ткани [21]. Ранее нами было показано, что интрацеломическое введение внеклеточных везикул, секретируемых моноцитоподобными клетками линии ТНР-1, оказывает системный эффект, проявляющийся изменением экспрессии генов провоспалительных *il-1 β* , *il-6*, *ifn- γ* , *tnf- α* , *mpx*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2* и противовоспалительного *il-10* цитокинов в тканях мозга, печени и сердца рыб *Danio rerio* [22].

Целью данного исследования было изучение системных эффектов внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками линии ТНР-1, при моделировании повреждения спинного мозга у рыб *Danio rerio*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий дизайн исследования

В данном исследовании использованы три типа внеклеточных везикул, продуцируемые нестимулированными клетками ТНР-1 и после активации фактором некроза опухоли (TNF) (Biolegend, Калифорния, США) в конечной концентрации 20 нг/мл или 4-форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) (Sigma Aldrich, Миссури, США) в конечной концентрации 50 нг/мл, которые были получены и подробно охарактеризованы ранее [23]. Кратко, комплексную характеристику образцов ВВ проводили согласно международным рекомендациям

MISEV2018 [24]: иммунофенотипирование выполняли методом высокочувствительной многоцветной проточной цитометрии на лазерном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Калифорния, США), размер и дисперсность оценивали методом динамического рассеяния света на приборе Nanolink SZ902M (Linkoptik, Китай), определение белкового состава (наличие CD9 и HSP70) осуществляли методом вестерн-блот (рис. 1a) [23].

Исследование эффектов внеклеточных везикул проводили на рыбах *Danio rerio* с моделью повреждения спинного мозга (рис. 1b). Образцы ВВ, ресуспендированные в DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия), вводили в целомическую полость рыбам через 24 ч после повреждения спинного мозга, и еще через сутки выводили из эксперимента. На всех этапах, начиная с 24 ч, проводили фиксирование случайно отобранных рыб из каждой группы в параформальдегиде и биобанкирование жизненно важных органов (мозг, сердце, печень и почку) (рис. 1b).

В дальнейшем осуществляли гистологическое исследование рыб *Danio rerio* (рис. 1c) и оценку уровня экспрессии генов, кодирующих провоспалительные и противовоспалительные цитокины, в жизненно важных органах рыб (рис. 1d).

Получение и характеристика внеклеточных везикул

Для получения образцов внеклеточных везикул использовали культуру опухолевых моноцитоподобных клеток линии THP-1 (“Российская коллекция клеточных культур института цитологии РАН”, Россия). Клетки THP-1 культивировали в питательной среде RPMI-1640 (“Биолот”, Россия) с добавлением L-глутамина (“Биолот”, Россия), 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Hyclone”, США) в CO_2 -инкубаторе (при 37°C и 5% CO_2) согласно стандартной методике, описанной ранее [23, 25]. Для активации клеток THP-1 200 мкл суспензии в концентрации 1×10^5 переносили в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt, Германия) и воздействовали следующими стимулами: 4-формил-12-миристал-13-ацетат (PMA) (Sigma Aldrich, Миссури, США) в концентрации 50 нг/мл, фактор некроза опухоли (TNF) (Biolegend, Калифорния, США) в концентрации 20 нг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали раствор DPBS (р-р Дульбекко без Ca и Mg, Биолот, Россия). Далее обработанные клетки THP-1 культивировали в течение 24 часов в стандартных условиях [23, 25]. По истечении суток внеклеточные везикулы получали методом последовательного центрифугирования, согласно методике, описанной ранее [22]. Кратко, суспензию клеток осаждали сначала в течение

20 минут при 330g, далее надосадочную жидкость дважды центрифугировали в течение 20 минут при 1500g и однократно при 3000g. Полученный надосадок пропускали через фильтр Millex с диаметром пор 800 нм (Merck-Millipore, Массачусетс, США), центрифугировали в течение 30 минут при 16000g и осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS без Ca и Mg (Биолот, Россия).

Размер и дисперсность полученных образцов внеклеточных везикул оценивали методом динамического рассеяния света на приборе Nanolink SZ902M (Linkoptik, Китай) при условиях, описанных нами ранее [22]. Внеклеточные везикулы охарактеризовали по следующим параметрам: размер объектов (peak size, нм), средняя Z (average Z, нм), индекс полидисперсности (polydispersity index – PdI) и стандартное отклонение (St. deviation, нм). Анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения Linkoptik Ver. 2.0.0.7.

Размер и концентрацию образцов ВВ оценивали методом анализа траектории наночастиц (Nanoparticle tracking analysis – NTA) на приборе NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, UK) [22, 23]. Полученные изображения оценивали визуально с использованием программного обеспечения NTA 3.4 NanoSight (Malvern Panalytical, UK). Количество частиц анализировали в диапазонах размерности объектов 30–150 нм и 150–400 нм.

Имунофенотипирование образцов внеклеточных везикул выполняли методом высокочувствительной мультицветовой проточной цитометрии на лазерном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Калифорния, США). Окрашивание ВВ осуществляли следующими антителами, конъюгированными с флуорофорами: anti-CD54-PE (Beckman Coulter, Калифорния, США), Annexin V-FITC (Biolegend, Калифорния, США), anti-CD14-KromeOrange (Beckman Coulter, Калифорния, США), anti-CD9-PE/Cy7 (Beckman Coulter, Калифорния, США), anti-CD63-APC (Beckman Coulter, Калифорния, США) согласно протоколу, опубликованному ранее [13, 26]. Анализ полученных результатов фенотипирования ВВ проводили с помощью программной среды Cytexpert 2.4 (Beckman Coulter, Калифорния, США) и Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Калифорния, США).

Белковый состав внеклеточных везикул определяли методом вестерн-блот с использованием первичных антител против белка теплового шока HSP70 – HSP70 (D69) Antibody 4876 (1:1000) и мембранного гликопротеина CD9 – CD9 (D8O1A) Rabbit mAb 13174 (1:1000) (Cell Signaling Technology, Массачусетс, США), а также вторичных антител Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 7074 (1:2000) (Cell Signaling Technology, Массачусетс, США), согласно ранее описанному протоколу [22].

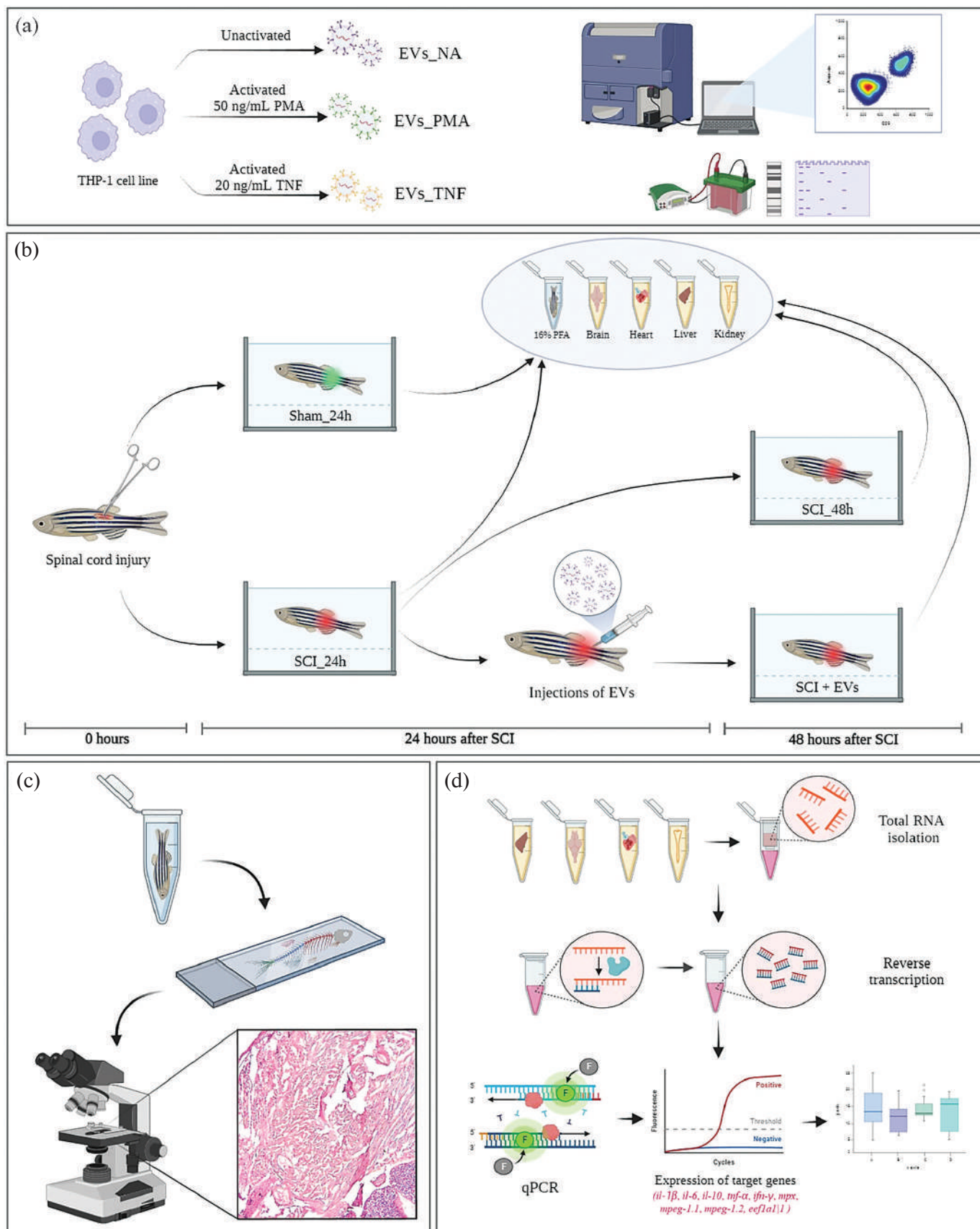


Рис. 1. Общий дизайн исследования (описание в тексте).

Дизайн эксперимента in vivo

В эксперимент были включены рыбы *Danio rerio* обоего пола в возрасте 4–5 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях: светотемновой режим 14:10, кормление готовыми рационами Tetra mini granules 2 раза в сутки, температура воды 28.0°C с pH 6.8–7.4. Все манипуляции проводили стерильными микрохирургическими инструментами с использованием стереоскопического микроскопа (ЛОМО, Россия), в состоянии медикаментозного сна, достигаемого путем помещения рыб в анестезирующий раствор (пропофол 10 мг/л + лидокаин 50 мг/л). Для моделирования повреждения спинного мозга канговыми ножницами производили кожный разрез на уровне 14–17 позвонков. Пинцетом для капсулорексиса тупым методом препарировали ткани до полной визуализации оболочек спинного мозга. Изогнутыми канговыми ножницами производили полную транссекцию спинного мозга на уровне 15–16 позвонков. Рану ушивали узловым швом монофиламентной полипропиленовой нитью. После манипуляций каждую рыбу содержали в индивидуальном аквариуме с добавлением метиленового синего. В контрольной группе рыб (Sham) производили кожный разрез на уровне 14–17 позвонков, препарировали ткани до полной визуализации оболочек спинного мозга без транссекции спинного мозга. Спустя 24 ч оценивали наличие повреждения спинного мозга у рыб *Danio rerio* на основании функциональных поведенческих тестов (реакция на прикосновение, вибрацию) [27]. Оперированные рыбы с положительными поведенческими тестами на прикосновение и вибрацию, т. е. с сохраненными функциями спинного мозга, были отнесены к контрольной группе Sham и выведены из эксперимента путем эвтаназии с передозировкой пропофола (25 мг/л). Оперированным рыбам с отрицательными поведенческими тестами на прикосновение и вибрацию, т. е. с функционально подтвержденным повреждением спинного мозга, осуществляли инъекцию в целомическую полость 2 мкл образца внеклеточных везикул, полученных либо от неактивированных ТНР-1 клеток (EVs_NA), либо от активированных ТНР-1 клеток воздействием PMA в концентрации 50 нг/мл (EVs_PMA), либо от активированных ТНР-1 клеток воздействием TNF в концентрации 20 нг/мл (EVs_TNF), согласно ранее описанной методике [22]. В качестве контроля носителя рыбам вместо образцов ВВ вводили в целомическую полость 2 мкл раствора DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Биолот, Россия). Спустя сутки рыб подвергали эвтаназии передозировкой пропофола (25 мг/л).

Во всех точках эксперимента, начиная с 24 ч с момента проведения хирургических манипуляций и нанесения повреждения спинного мозга,

5 рыб, отобранных случайным образом из каждой группы, после эвтаназии помещали в 4% раствор параформальдегида для дальнейшей подготовки гистологических препаратов. У остальных рыб проводили биобанкирование жизненно важных органов (мозг, сердце, печень и почку). Полученный материал помещали в отдельные стерильные пробирки, содержащие 800 мкл реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия), замораживали и хранили при -80°C до последующего использования.

В результате было сформировано семь экспериментальных групп, каждая из которых состояла не менее чем из 15 рыб. Рыб одного возраста и веса относили к экспериментальным группам случайным методом. Все манипуляции с рыбами разных групп выполнялись в одинаковых, стандартных условиях, условия содержания в послеоперационном периоде не различались.

1 группа – Sham_24h (оперированные рыбы *Danio rerio* без травмы спинного мозга, выведенные из эксперимента через 24 ч после операции);

2 группа – SCI_24h (оперированные рыбы *Danio rerio* с подтвержденной функциональными тестами травмой спинного мозга, выведенные из эксперимента через 24 ч после операции);

3 группа – SCI_48h (оперированные рыбы *Danio rerio* с подтвержденной функциональными тестами травмой спинного мозга, выведенные из эксперимента через 48 ч после операции);

4 группа – SCI+DPBS (оперированные рыбы *Danio rerio* с подтвержденной функциональными тестами травмой спинного мозга, с введением в целомическую полость DPBS через 24 ч после операции и выведенные из эксперимента через 48 ч после операции);

5 группа – SCI+EVs_NA (оперированные рыбы *Danio rerio* с подтвержденной функциональными тестами травмой спинного мозга, с введением через 24 ч после операции в целомическую полость ВВ, секретированных неактивированными ТНР-1 клетками, и выведенные из эксперимента через 48 ч после операции);

6 группа – SCI+EVs_PMA (оперированные рыбы *Danio rerio* с подтвержденной функциональными тестами травмой спинного мозга, с введением через 24 ч после операции в целомическую полость ВВ, секретированных активированными ТНР-1 клетками воздействием PMA в концентрации 50 нг/мл, и выведенные из эксперимента через 48 часа после операции);

7 группа – SCI+EVs_TNF (оперированные рыбы *Danio rerio* с подтвержденной функциональными тестами травмой спинного мозга, с введением через 24 ч после операции в целомическую полость ВВ, секретированных активированными ТНР-1 клетками воздействием TNF в концентра-

ции 20 нг/мл, и выведенные из эксперимента через 48 ч после операции).

Гистологические исследования

Для подготовки гистологических препаратов целую рыбу после эвтаназии помещали в 4% раствор параформальдегида на 4 ч, после чего на 3 ч переносили в ЭДТА-содержащий декальцинирующий раствор “СофтиДек” (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия). По истечении 3-х ч животное помещали в 30% раствор сахарозы на трое суток. Подготовленных рыб замораживали в криогеле Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Калифорния, США). Нарезку замороженных препаратов рыб *Danio rerio* проводили в кранио-сагитальном направлении с помощью криотома Tissue-Tek® Cryo³ (Sakura Finetek, Калифорния, США). Срезы толщиной 10 мкм помещали на предметное стекло и окрашивали гематоксилин-эозином согласно стандартному протоколу. Гистологические срезы рыб *Danio rerio* визуализировали с использованием микроскопа ZEISS Axio Observer (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Оценка уровня экспрессии генов

Выделение тотальной РНК из тканей мозга, сердца, печени и почки рыб *Danio rerio* проводили с использованием реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя согласно протоколу, описанному ранее [28]. Количество и качество выделенной тотальной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 UV Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific, Массачусетс, США). Для проведения обратной транскрипции использовали 500 нг выделенной тотальной РНК, 20 мкМ случайного праймера (“Евроген”, Россия) и фермент MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя согласно условиям, описанным ранее [28]. Синтезированную кДНК хранили при -80°C .

Относительный уровень экспрессии генов *il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mpeg-1.1*, *mpeg-1.2*, *mx* и *il-10* в органах рыб *Danio rerio* определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе LightCycler®480 Software version 1.5.1.62 SP3 (“Roche”, Швейцария) с использованием набора реагентов qPCRmix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя согласно условиям, описанным ранее [28]. В качестве референсного гена для нормализации данных использовали ген домашнего хозяйства *eef1a1-1* [28]. Уровень относительной количественной экспрессии генов рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, выбросы значений $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ определя-

ли на основании алгоритма ROUT ($Q = 10\%$) и исключали из дальнейшего анализа.

Статистический анализ

Расчёт объёма выборки был проведен с использованием программы G*Power version 3.1.9 (Германия). Был выбран уровень значимости статистических заключений — 95% (вероятность ошибки первого рода — 5%). Показатель мощности — 80% (вероятность ошибки второго рода — 20%). Рекомендованный размер группы составил 7 животных.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software Inc., Калифорния, США). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха, Me (25;75). Различия между группами Sham_24h и SCI_24h рассчитывали с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Для множественного сравнения групп после воздействия использовали критерий Краскела—Уоллиса, далее для попарных сравнений групп — тест Данна. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика образцов внеклеточных везикул

Все полученные образцы внеклеточных везикул демонстрировали умеренную полидисперсность. Было показано, что ВВ, полученные от ТНР-1 клеток, активированных воздействием 20 нг/мл TNF, имели наибольшие размеры частиц (peak size = 191.9 нм, St. Dev = 112.22 нм), наименьшие размеры частиц были характерны для ВВ, полученных от ТНР-1 клеток активированных воздействием 50 нг/мл РМА (peak size = 36.15 нм, St. Dev = 30.77 нм). При этом для образцов ВВ, полученных от клеток ТНР-1 активированных РМА, был определен наибольший диапазон размерности частиц, примерно до 110 нм.

В диапазоне размеров 30–150 нм концентрации образцов ВВ, полученных от клеток ТНР-1 активированных воздействием TNF (29.7×10^8 (19.9×10^8 ; 38.3×10^8)) и ВВ, полученных от клеток ТНР-1 активированных воздействием РМА (25.8×10^8 (16.4×10^8 ; 43.2×10^8)) были достоверно выше, по сравнению с ВВ, полученными от неактивированных клеток ТНР-1 (11.3×10^8 (8.53×10^8 ; 11.7×10^8)) ($p < 0.01$). В диапазоне размеров 150–400 нм концентрации внеклеточных везикул, продуцированных как активированными клетками ТНР-1 воздействием РМА и TNF, так и от неактивированных ТНР-1 клеток не отличались.

Методом вестерн-блот было показано, что в полученных образцах ВВ присутствовали везикулярный мембранный маркер CD9 и маркер внутреннего содержимого — белок теплового шока 70 (HSP70).

Все образцы внеклеточных везикул, полученных как от неактивированных THP-1 клеток, так и от активированных воздействием PMA и TNF содержали CD9+, CD63+, CD54+, CD14+ и Annexin V+ объекты по результатам высокочувствительной мультицветовой проточной цитометрии. При этом для образцов ВВ, полученных от активированных клеток THP-1 воздействием PMA и TNF уровень CD9+, CD63+, CD54+, и Annexin V-позитивных объектов был достоверно выше по сравнению с образцами, полученными от неактивированных кле-

ток THP-1 ($p < 0.05$). Также для внеклеточных везикул, полученных от клеток THP-1, активированных воздействием TNF, количество CD54-позитивных событий было выше более чем в 10 раз по сравнению с ВВ, полученными как от неактивированных клеток THP-1, так и от активированных PMA.

Морфофункциональная оценка модели *Danio rerio* с повреждением спинного мозга

При проведении функциональных поведенческих тестов через 24 и 48 ч после хирургических манипуляций у всех рыб *Danio rerio* с нанесенной механической травмой спинного мозга (группы SCI_24h, SCI_48h, SCI+DPBS, SCI+EVs_NA,

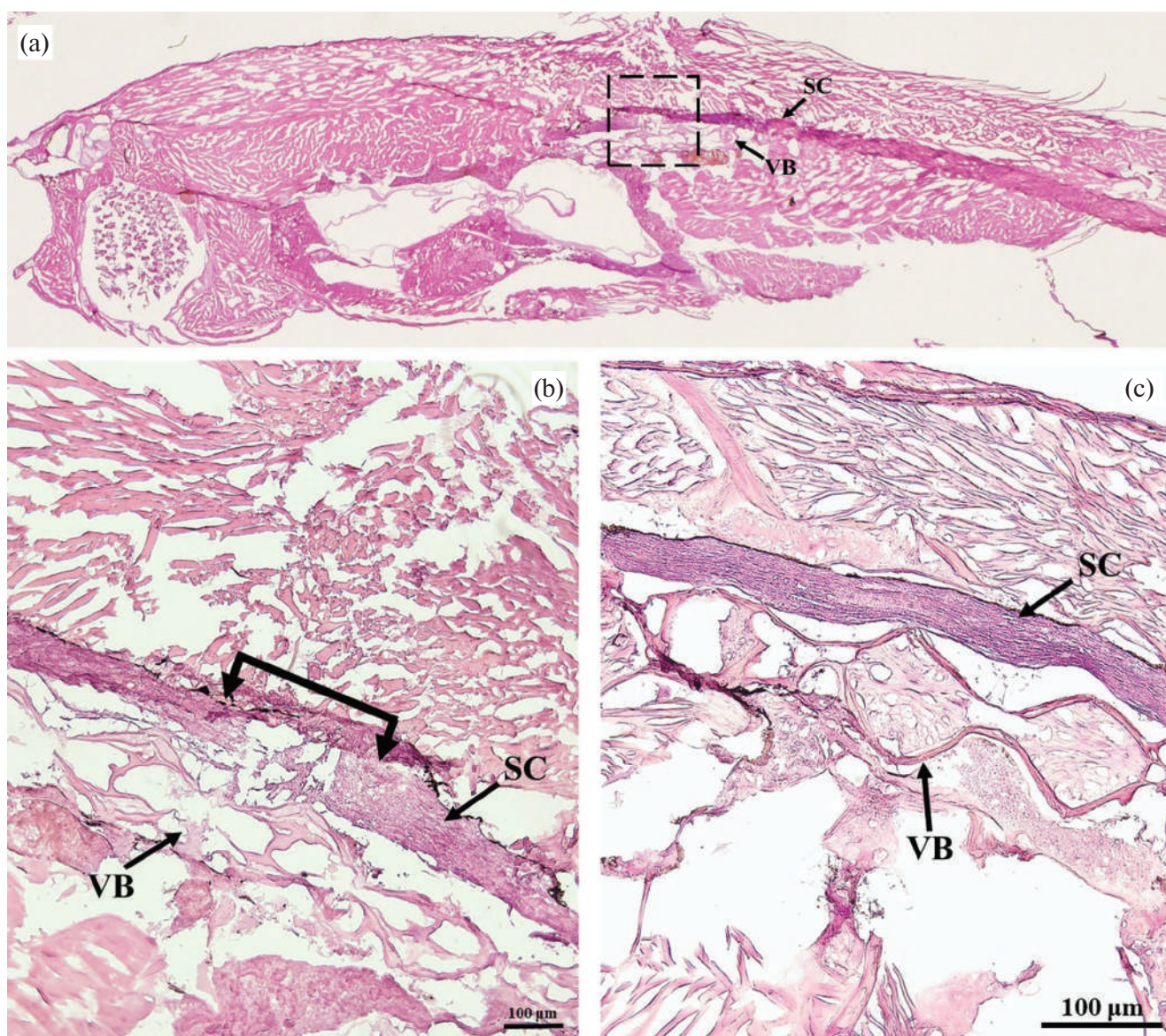


Рис. 2. Сагиттальные срезы поврежденного (a-b) и неповрежденного (c) спинного мозга рыб *Danio rerio*, окрашенные гематоксилин-эозином. (a) — срез рыбы *Danio rerio* с моделью травмы спинного мозга; (b) — увеличенное изображение травмы спинного мозга, выделенное квадратом на (a); (c) — неповрежденный спинной мозг. SC — спинной мозг, VB — тела позвонков.

SCI+EVs_PMA, SCI+EVs_TNF) отсутствовала положительная реакция на прикосновения или вибрацию по сравнению как с полностью интактными рыбами, так и с оперированными рыбами контрольной группы Sham. Повреждение спинного мозга у рыб *Danio rerio* сопровождалось потерей активности плавательных движений задней части тела каудальнее места травмы на протяжении всего периода наблюдения.

Полная транссекция спинного мозга приводила к разрыву нервных путей и локальной потере ткани белого и серого вещества (рис. 2b). В области механической травмы наблюдались отечность окружающих тканей, инфильтрация, а также нарушение нормальной структуры мышечных волокон (рис. 2b). При этом в контрольной группе рыб Sham сохранялась целостная структура белого и серого вещества, нормальная организация мышечных волокон, а в окружающих тканях отсутствовали отечность и инфильтрация (рис. 2с).

Оценка изменения уровня экспрессии генов в мозге, сердце, печени и почках у рыб Danio rerio через 24 часа после повреждения спинного мозга

На всех этапах исследования в мозге, печени и почках оценивали относительный уровень экспрессии восьми генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *trpx*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин, тогда как в сердце (из-за размера органа) только четырех генов *il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* и *il-10*.

Полная транссекция спинного мозга у рыб *Danio rerio* (группа SCI_24h) через 24 ч после операции характеризовалась достоверным увеличением уровня экспрессии в тканях мозга генов *il-1 β* ($p=0.02$) и *il-6* ($p=0.04$) по сравнению с контрольной группой Sham_24h; в тканях сердца достоверным снижением уровня экспрессии генов *il-6* ($p=0.01$) и *il-10* ($p=0.02$); в ткани печени достоверным снижением уровня экспрессии только гена *il-10* ($p=0.01$); тогда как в тканях почки достоверным увеличением уровня экспрессии гена *il-10* ($p=0.02$) и одновременным снижением уровня экспрессии гена *ifn- γ* ($p=0.04$) (рис. 3, табл. 1).

Эффект ВВ на профиль экспрессии некоторых про- и противовоспалительных генов в мозге, сердце, печени и почках у рыб *Danio rerio* с повреждением спинного мозга оценивали

Влияние ВВ на изменение относительного уровня экспрессии генов в тканях органов рыб *Danio rerio* с повреждением спинного мозга оценивали через сутки после введения образцов ВВ в целомическую полость рыб. Группами сравнения были рыбы с повреждением спинного мозга, в целомическую полость которых вводили раствор DPBS (группа SCI+DPBS), и рыбы с повреждением спин-

ного мозга без инъекции (группа SCI_48h). Во всех анализируемых группах рыб с момента полной транссекции спинного мозга прошло 48 ч (рис. 1).

Мозг

Введение раствора DPBS, в качестве контроля реакции на инъекцию в целомическую полость рыб, не приводило к изменению в тканях мозга рыб группы SCI+DPBS уровня экспрессии ни одного из восьми исследуемых генов, кодирующих как про- (*il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *trpx*), так и противовоспалительные (*il-10*) цитокины, по сравнению с таковыми группы SCI_48h (рис. 4, табл. 2). При этом отсутствовали достоверные отличия как при множественном сравнении, так и при попарных сравнениях между группами.

Сердце

Введение раствора DPBS и двух образцов ВВ вызывало достоверное изменение уровня экспрессии гена противовоспалительного *il-10* в тканях сердца рыб ($p<0.001$). При этом ВВ в группе SCI+EVs_PMA вызывали достоверное снижение уровня экспрессии ($p=0.002$), в то время как образцы в группе SCI+EVs_TNF не оказывали аналогичного воздействия, и уровень экспрессии *il-10* не отличался от такового в группе с повреждением SCI_48 h (рис. 5, табл. 3).

Печень

Введение образцов ВВ после травмы спинного мозга вызывало достоверное изменение уровня экспрессии гена *ifn- γ* ($p=0.004$) и *mpeg-1.1* ($p=0.002$) в печени рыб (рис. 6, табл. 4). Введение везикул после травмы в группе SCI+EVs_TNF приводило к достоверному снижению экспрессии *ifn- γ* по сравнению с таковым в группе без воздействия ($p=0.007$).

Введение везикул в группе SCI+EVs_TNF приводило к достоверному ($p=0.017$) снижению уровня экспрессии гена *mpeg-1.1* по сравнению с таковым в группе с моделированной травмой без воздействия (SCI_48h). Из всех использованных везикул, именно в этой группе был отмечен наибольший даун-регуляторный эффект в отношении гена *mpeg-1.1* (рис. 6, табл. 4).

Почка

Введение внеклеточных везикул после травмы спинного мозга приводило к достоверному изменению экспрессии генов *il-6* ($p=0.022$) и *ifn- γ* ($p=0.038$) в почках рыб (рис. 7, табл. 5). При этом везикулы в группе SCI+EVs_TNF вызывали

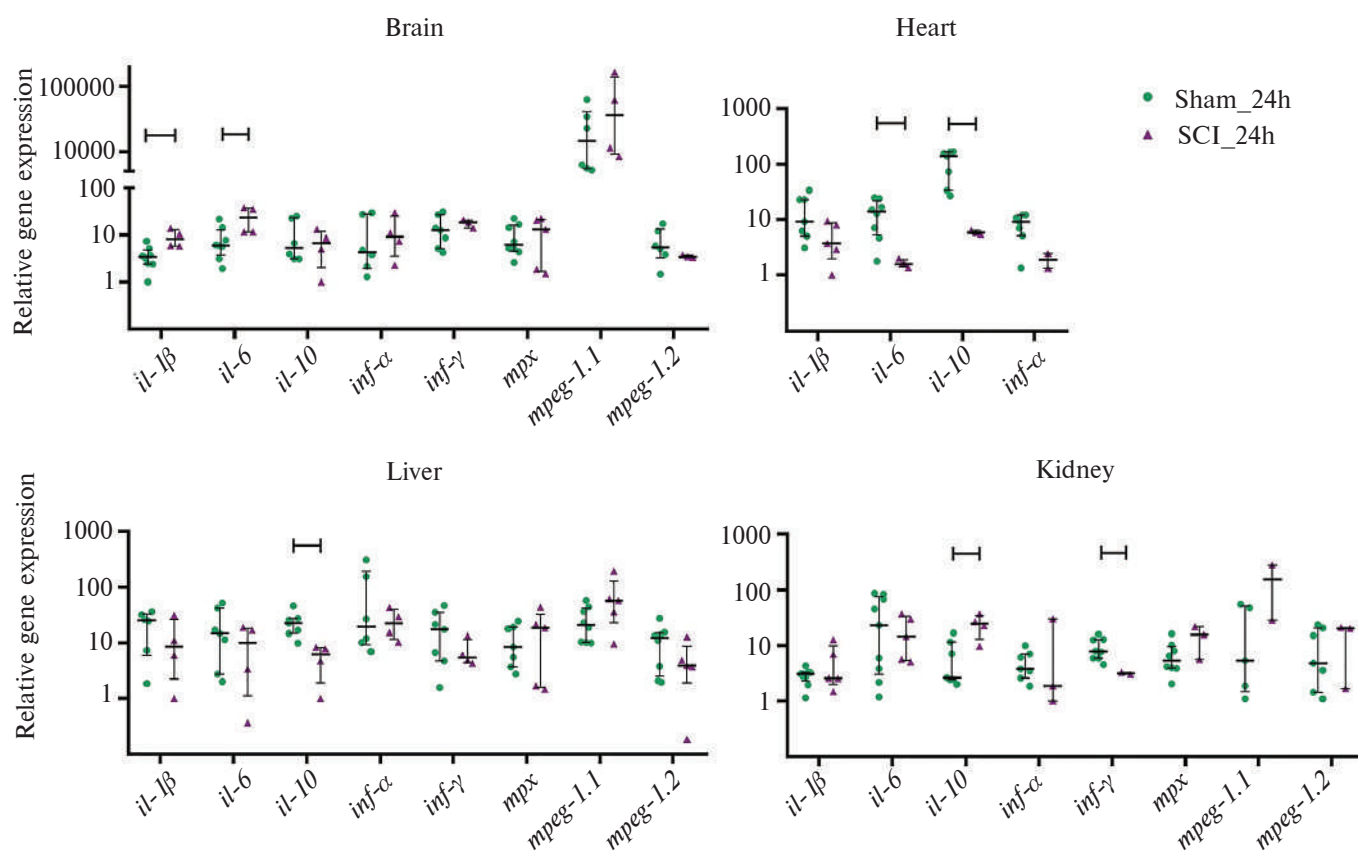


Рис. 3. Относительная экспрессия генов в тканях мозга, сердца, печени и почки у рыб *Danio rerio* с функционально подтвержденной травмой спинного мозга (SCI_24h) и без повреждения спинного мозга (Sham_24h) через 24 ч после хирургической манипуляции. Достоверные отличия между группами обозначены при $p < 0.05$.

Таблица 1. Относительная экспрессия генов в тканях органов рыб *Danio rerio* через 24 часа после повреждения спинного мозга, Ме (25;75)

	Мозг		Сердце		Печень		Почка	
	Sham_24h	SCI_24h	Sham_24h	SCI_24h	Sham_24h	SCI_24h	Sham_24h	SCI_24h
il-1 β	3.4 (2.4; 4.8)*	8.2 (5.9; 13.0)*	9.2 (5.1; 23.1)	3.8 (2.0; 8.7)	25.3 (6.0; 33.1)	8.6 (2.3; 26.3)	3.1 (2.3; 3.3)	2.6 (2.0; 9.8)
il-6	6.0 (3.8; 12.7)*	23.5 (11.6; 37.6)*	14.0 (5.3; 22.2)**	1.6 (1.4; 1.9)**	14.7 (2.7; 42.2)	10.1 (1.1; 18.3)	22.9 (3.0; 75.7)	14.5 (5.3; 33.2)
il-10	5.4 (3.1; 23.4)	6.8 (2.0; 12.0)	139.0 (33.6; 167.0)*	5.8 (5.5; 6.4)*	22.5 (14.7; 21.3)**	6.3 (1.9; 8.2)**	2.6 (2.4; 11.6)*	24.5 (12.9; 34.2)*
tnf- α	4.3 (1.9; 28.4)	9.2 (3.5; 25.3)	9.1 (5.2; 12.1)	1.9 (1.3; 2.5)	19.4 (9.3; 193.0)	22.4 (11.6; 39.9)	3.8 (2.6; 7.1)	1.9 (1.0; 29.9)
ifn- γ	12.6 (5.2; 27.3)	18.6 (14.0; 20.7)	—#	—	17.4 (4.7; 35.5)	5.5 (4.4; 11.5)	7.8 (5.9; 12.8)*	3.1 (3.0; 3.3)*
mpx	6.3 (4.6; 16.2)	13.0 (1.7; 21.4)	—	—	8.5 (3.7; 19.2)	18.5 (1.6; 32.6)	5.3 (3.9; 9.6)	15.6 (5.6; 21.7)
mpeg-1.1	14573 (5502; 41406)	36499 (9217; 139822)	—	—	20.8 (10.3; 42.4)	57.7 (22.8; 128)	5.3 (1.5; 51.4)	152.0 (28.2; 276.0)
mpeg-1.2	5.5 (3.3; 13.3)	3.4 (3.3; 3.8)	—	—	12.3 (2.5; 15.2)	3.9 (1.9; 8.8)	4.8 (1.4; 20.5)	20.0 (1.7; 20.8)

Примечание. * — достоверные отличия между группами $p < 0.05$; ** — достоверные отличия между группами $p < 0.01$. Для расчета р-значения применялся U-критерий Манна–Уитни. # — исследование не проводилось.

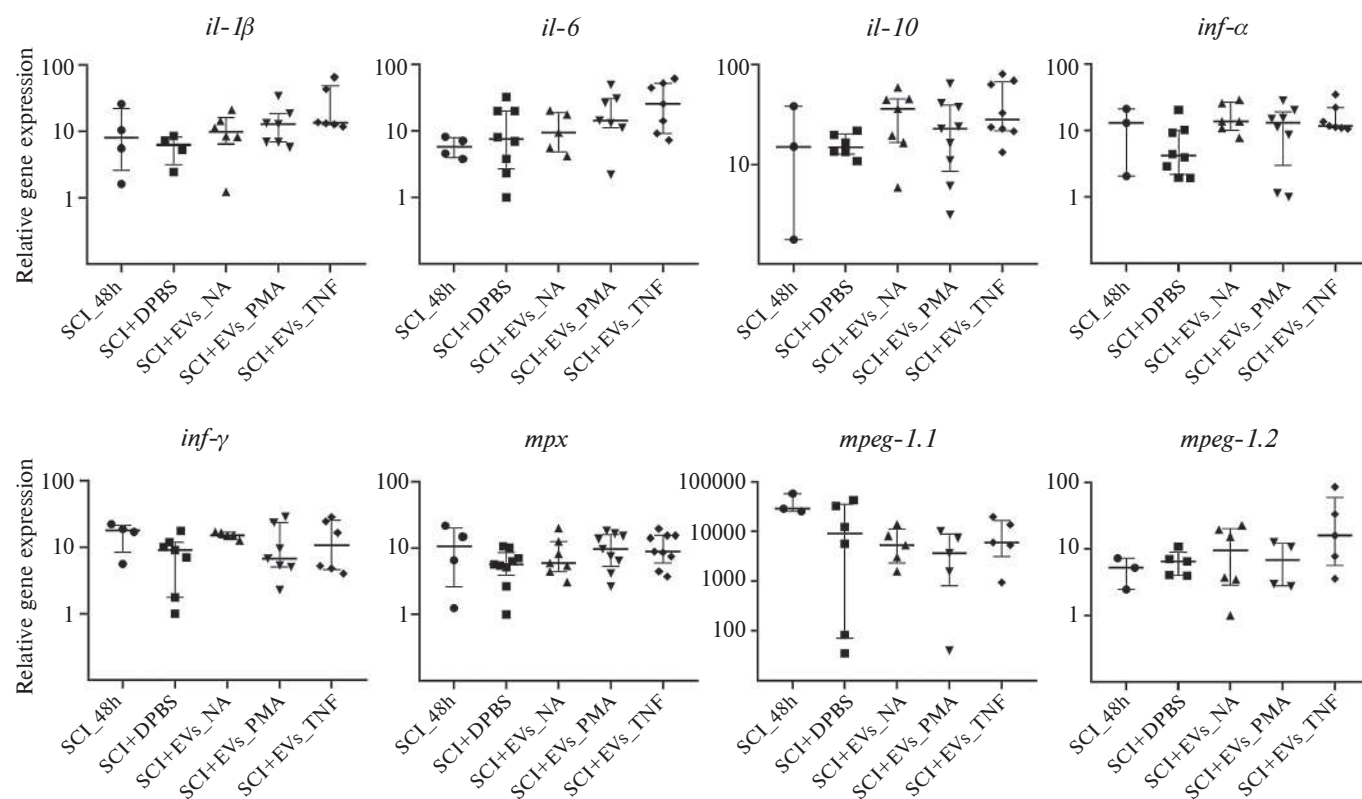


Рис. 4. Относительная экспрессия генов *il-1β*, *il-6*, *il-10*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpx*, *mpeg-1.1*, *mpeg-1.2* в тканях мозга рыб *Danio rerio* с функционально подтвержденной травмой спинного мозга и введением внеклеточных везикул.

Таблица 2. Относительная экспрессия генов в тканях мозга рыб *Danio rerio* после травмы спинного мозга и введения образцов внеклеточных везикул, Ме (25;75)

	SCI_48h	SCI + DPBS	SCI + EVs_NA	SCI + EVs_PMA	SCI + EVs_TNF	Множественные сравнения, критерий Краскела–Уоллиса	Попарные сравнения, тест Данна
<i>il-1β</i>	8.0 (2.6; 22.2)	6.3 (3.2; 8.2)	9.9 (6.5; 16.1)	12.9 (6.9; 18.8)	13.5 (12.6; 49.5)	$p=0.106$	—#
<i>il-6</i>	5.9 (4.0; 7.9)	7.6 (2.7; 20.1)	9.5 (4.9; 19.1)	14.4 (11.2; 31.1)	25.8 (9.2; 53.1)	$p=0.083$	—
<i>il-10</i>	15.1 (1.8; 38.6)	15.0 (12.8; 20.2)	36.3 (16.6; 45.6)	22.8 (8.6; 39.6)	28.2 (21.8; 68.2)	$p=0.189$	—
<i>tnf-α</i>	13.1 (2.1; 21.4)	4.3 (2.2; 10.0)	13.8 (10.1; 27.0)	13.2 (3.0; 19.3)	11.8 (11.0; 22.5)	$p=0.143$	—
<i>ifn-γ</i>	17.7 (8.4; 21.0)	9.1 (1.7; 12.0)	14.9 (13.8; 16.5)	6.7 (5.0; 23.3)	10.7 (4.6; 25.3)	$p=0.442$	—
<i>mpx</i>	10.6 (2.6; 19.7)	5.7 (3.9; 8.6)	5.9 (4.4; 12.6)	9.7 (5.3; 15.7)	8.9 (5.9; 15.3)	$p=0.376$	—
<i>mpeg-1.1</i>	28526 (25180; 57849)	8937 (71.2; 34898)	4196 (1180; 9546)	2614 (35.4; 8080)	5724 (705; 14991)	$p=0.144$	—
<i>mpeg-1.2</i>	5.2 (2.4; 7.3)	6.5 (4.0; 9.0)	9.5 (2.8; 20.0)	6.9 (2.8; 12.2)	15.9 (5.7; 59.7)	$p=0.421$	—

Примечание. # — статистически достоверных межгрупповых отличий не наблюдалось.

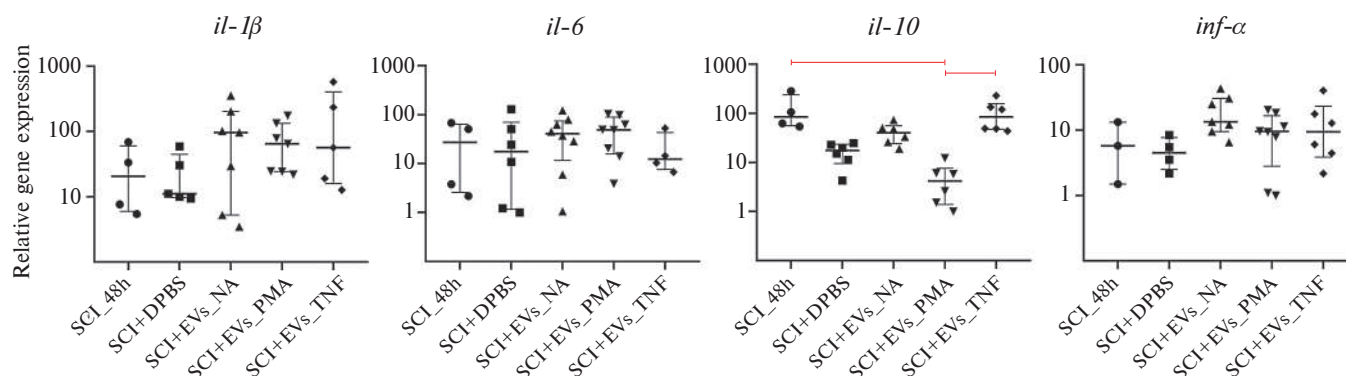


Рис. 5. Относительная экспрессия генов *il-1β*, *il-6*, *il-10*, *tnf-α* в тканях сердца рыб *Danio rerio* с функционально подтвержденной травмой спинного мозга и введением внеклеточных везикул. Достоверные отличия представлены при $p=0.002$.

Таблица 3. Относительная экспрессия генов в тканях сердца рыб *Danio rerio* после травмы спинного мозга и введения образцов внеклеточных везикул, Ме (25;75)

	SCI_48h	SCI + DPBS	SCI + EVs_NA	SCI + EVs_PMA	SCI + EVs_TNF	Множественные сравнения, критерий Краскела–Уоллиса	Попарные сравнения, тест Данна
<i>il-1β</i>	20.5 (6.0; 59.8)	11.1 (9.7; 44.6)	96.3 (5.2; 202)	64.4 (24.3; 133.0)	56.5 (15.9; 403.0)	$p=0.394$	—#
<i>il-6</i>	27.2 (2.6; 63.4)	17.5 (1.2; 69.7)	40.8 (11.6; 74.2)	48.7 (15.7; 88.9)	12.4 (7.6; 43.1)	$p=0.734$	—
<i>il-10</i>	84.4 (56.0; 240)	17.5 (9.5; 23.4)	40.5 (24.1; 55.9)	4.2 (1.4; 7.6)	84.7 (47.6; 158.0)	$p<0.001$	SCI_48h vs. SCI + EVs_PMA, $p=0.002$; SCI + EVs_PMA vs. SCI + EVs_TNF, $p=0.002$
<i>tnf-α</i>	5.8 (1.5; 13.4)	4.5 (2.5; 7.7)	13.5 (9.6; 30.7)	9.6 (2.8; 16.7)	9.5 (3.9; 23.4)	$p=0.127$	—

Примечание. # — статистически достоверных межгрупповых отличий не наблюдалось.

достоверно более высокую экспрессию гена *il-6* ($p=0.021$), а также гена *mpeg-1.2* ($p=0.028$), чем везикулы, полученные от нестимулированных клеток в группе SCI+EVs_NA. Вместе с тем, эти же везикулы, полученные от клеток без стимуляции, вызывали достоверное ($p=0.045$) повышение экспрессии *ifn-γ* по сравнению с таковым у рыб только с моделированной травмой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Патогенез травмы спинного мозга включает первичное и вторичное повреждение; к первичному относится механическое повреждение спинного мозга, которое вызывает гибель нейронов и глии в очаге поражения вскоре после травмы; тогда как вторичное повреждение является следствием клеточных и биологических реакций, протекающих в ответ на первичное повреждение, включая местную и системную воспалительную реакцию, окислительный стресс, ишемию, демиелинизацию, гибель нервных клеток и другое [29]. При повреж-

дении ЦНС одними из первых реагируют клетки резидентной микроглии, которые считаются основным клеточным компонентом врожденной иммунной системы в нервной ткани и составляет до 10% от общего числа клеток нейроглии взрослого человека [2–4]. Вслед за микроглией в ответ на повреждение активируются астроциты и эндотелиальные клетки, а также в очаг повреждения привлекаются нейтрофилы, моноциты и лимфоциты [5]. Эти клетки секретируют провоспалительные и иммуномодулирующие факторы для реализации иммунного ответа, который может иметь разрушительные последствия и тормозить регенерацию нервной ткани. Herzog и соавт. [30] на основе анализа профиля экспрессии генов микроглии, выявили 17 генов, участвующих в инициации путей клеточной гибели, в том числе *il-1β* и *il-6*, повышение экспрессии которых наблюдалось после повреждения нервной ткани личинок *Danio rerio*.

Подобно периферическим макрофагам, микроглия реагирует на изменения в своем микроокружении, поляризуясь в направлении классически

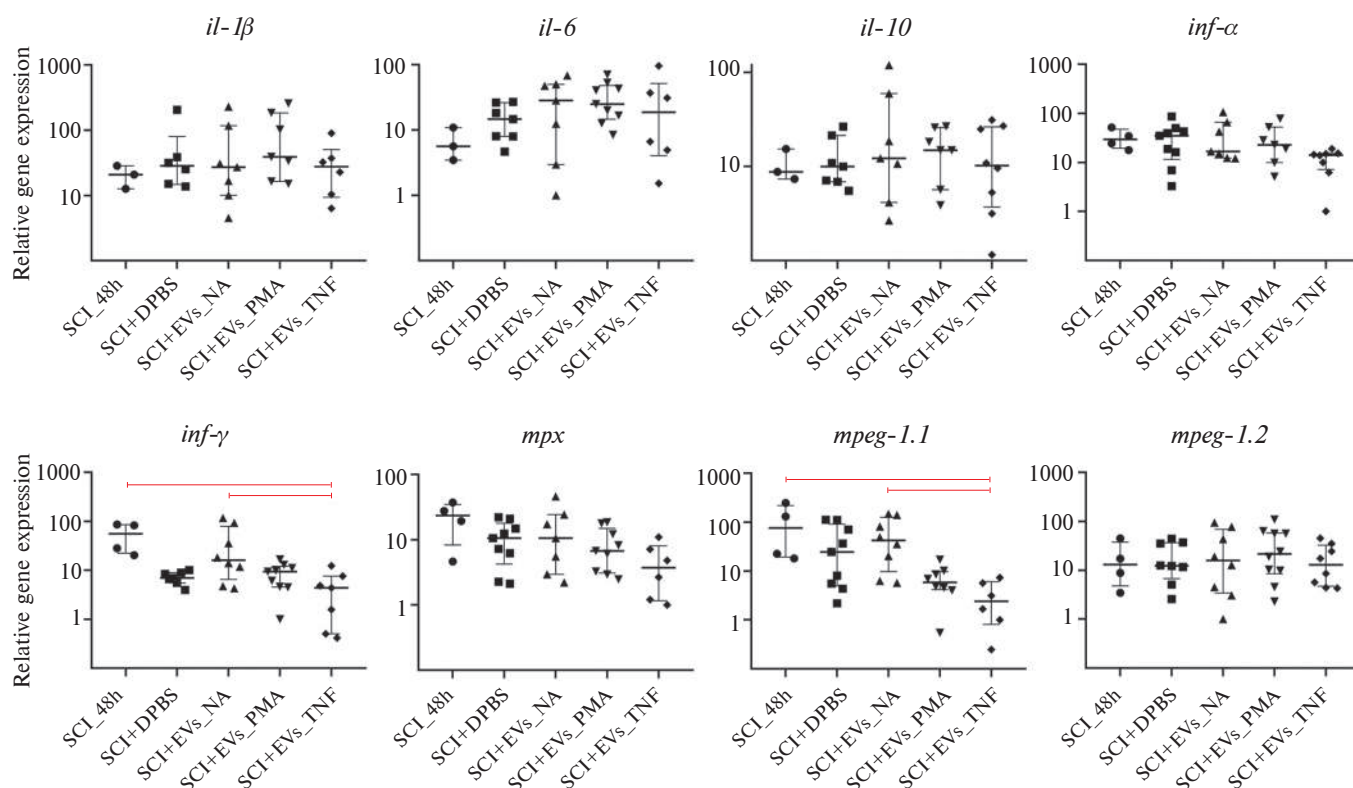


Рис. 6. Относительная экспрессия генов *il-1β*, *il-6*, *il-10*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpx*, *mpeg-1.1*, *mpeg-1.2* в ткани печени рыб *Danio rerio* с функционально подтвержденной травмой спинного мозга и введением внеклеточных везикул. Достоверные отличия представлены при $p < 0.05$.

Таблица 4. Относительная экспрессия генов в ткани печени рыб *Danio rerio* после травмы спинного мозга и введения образцов внеклеточных везикул, Ме (25;75)

	SCI_48h	SCI + DPBS	SCI + EVs_NA	SCI + EVs_PMA	SCI + EVs_TNF	Множественные сравнения, критерий Краскела–Уоллиса	Попарные сравнения, тест Данна
<i>il-1β</i>	20.8 (12.6; 28.4)	31.6 (15.0; 205)	27.1 (10.1; 117)	39.1 (16.4; 185)	27.6 (9.4; 50.4)	$p=0.505$	—#
<i>il-6</i>	5.7 (3.5; 10.9)	14.7 (8.0; 26.4)	28.4 (3.0; 50.2)	25.1 (14.8; 48.3)	18.9 (4.1; 51.8)	$p=0.246$	—
<i>il-10</i>	8.8 (7.4; 15.3)	10.0 (6.9; 21.4)	12.2 (4.1; 59.7)	14.9 (5.7; 26.0)	10.2 (3.7; 26.4)	$p=0.949$	—
<i>tnf-α</i>	29.6 (19.6; 47.6)	35.0 (11.6; 46.7)	16.7 (12.4; 65.8)	22.9 (9.9; 52.7)	14.1 (7.2; 15.3)	$p=0.131$	—
<i>ifn-γ</i>	55.5 (22.4; 85.3)	7.0 (5.5; 9.0)	16.1 (6.5; 78.8)	9.4 (4.6; 12.0)	4.4 (0.5; 7.6)	$p=0.004$	SCI_48h vs. SCI + EVs_TNF, $p=0.007$ SCI + EVs_NA vs. SCI + EVs_TNF, $p=0.050$
<i>mpx</i>	23.4 (8.3; 34.6)	10.6 (4.2; 17.9)	10.6 (3.0; 24.3)	6.7 (3.1; 14.9)	3.7 (1.2; 8.1)	$p=0.142$	—
<i>mpeg-1.1</i>	76.1 (19.2; 218.0)	24.6 (4.9; 90.6)	42.3 (9.7; 125.0)	5.9 (4.2; 9.8)	2.4 (0.8; 6.1)	$p=0.002$	SCI_48h vs. SCI + EVs_TNF, $p=0.017$; SCI + EVs_NA vs. SCI + EVs_TNF, $p=0.015$
<i>mpeg-1.2</i>	13.0 (4.8; 37.8)	12.4 (6.8; 36.5)	15.8 (3.4; 68.7)	21.5 (8.5; 57.9)	13.0 (4.7; 32.4)	$p=0.867$	—

Примечание. # — статистически достоверных межгрупповых отличий не наблюдалось.

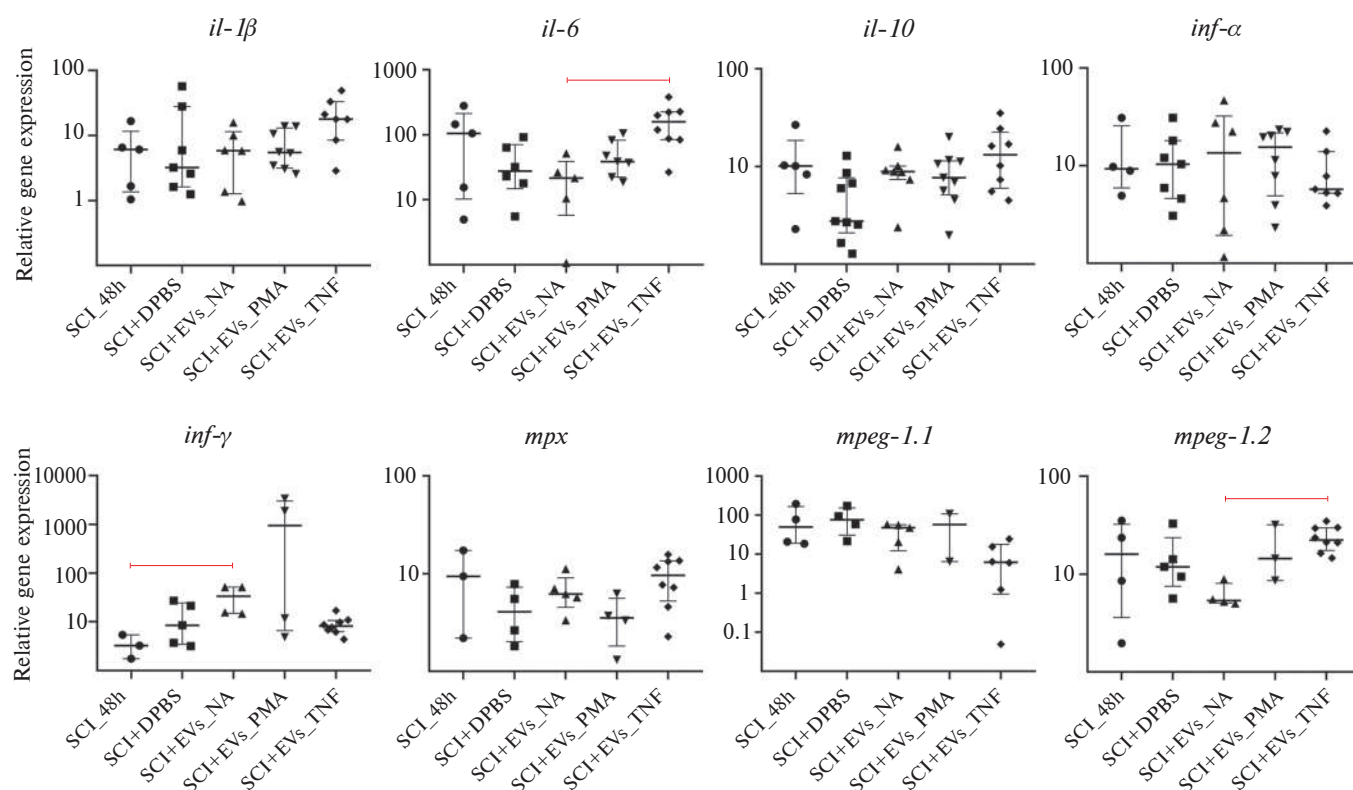


Рис. 7. Относительная экспрессия генов *il-1β*, *il-6*, *il-10*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpx*, *mpeg-1.1*, *mpeg-1.2* в тканях почки рыб *Danio rerio* с функционально подтвержденной травмой спинного мозга и введением внеклеточных везикул. Достоверные отличия представлены при $p < 0.05$.

Таблица 5. Относительная экспрессия генов в тканях почки рыб *Danio rerio* после травмы спинного мозга и введения образцов внеклеточных везикул, Ме (25;75)

	SCI_48h	SCI + DPBS	SCI + EVs_NA	SCI + EVs_PMA	SCI + EVs_TNF	Множественные сравнения, критерий Краскела–Уоллиса	Попарные сравнения, тест Данна
<i>il-1β</i>	6.1 (1.4; 11.6)	3.2 (1.6; 28.1)	5.9 (1.3; 11.4)	5.5 (3.2; 13.0)	17.9 (8.5; 33.1)	$p = 0.167$	—#
<i>il-6</i>	105.0 (10.2; 212.0)	27.5 (14.8; 70.6)	21.6 (5.8; 38.7)	38.6 (22.3; 82.7)	158 (84.2; 225)	$p = 0.022$	SCI + EVs_NA vs. SCI + EVs_TNF, $p = 0.021$
<i>il-10</i>	10.1 (5.3; 18.5)	2.8 (2.1; 7.7)	8.9 (7.4; 10.1)	7.7 (5.1; 11.4)	13.2 (6.0; 22.5)	$p = 0.111$	—
<i>tnf-α</i>	9.3 (5.9; 25.6)	10.3 (4.6; 18.0)	13.5 (1.9; 32.2)	15.5 (4.9; 21.7)	5.7 (5.2; 13.9)	$p = 0.953$	—
<i>ifn-γ</i>	3.3 (1.8; 5.4)	8.5 (3.5; 24.3)	33.6 (15.0; 51.6)	942 (6.6; 2998)	8.2 (6.4; 10.6)	$p = 0.038$	SCI_48h vs. SCI + EVs_NA, $p = 0.045$
<i>mpx</i>	9.4 (2.2; 17.3)	4.1 (2.0; 7.3)	6.2 (4.5; 9.1)	3.5 (1.8; 5.6)	9.6 (5.2; 13.5)	$p = 0.183$	—
<i>mpeg-1.1</i>	49.2 (19.0; 165)	75.8 (30.8; 153.0)	47.5 (12.3; 56.7)	57.0 (6.5; 108)	6.2 (0.9; 17.8)	$p = 0.056$	—
<i>mpeg-1.2</i>	16.1 (3.6; 32.3)	11.9 (7.5; 23.6)	5.4 (5.1; 8.0)	14.4 (8.6; 32.0)	22.4 (17.5; 29.8)	$p = 0.058$	SCI + EVs_NA vs. SCI + EVs_TNF, $p = 0.028$

Примечание. # — статистически достоверных межгрупповых отличий не наблюдалось.

активированной микроглии — M1 или альтернативно активированной микроглии — M2 [2, 4, 7]. Классический, M1-фенотип, макрофаги и микроглия приобретают в ответ на воздействие провоспалительных молекул, таких как бактериальный липополисахарид и интерферон гамма (IFN- γ) [3]. Индукторами воспаления и поляризации в направлении M-1 могут выступать и DAMP — продукты повреждения клеток (кристаллы мочевой кислоты, белки теплового шока, IL-33 и т. д.) [2, 6, 31]. В свою очередь M1-микроглия высвобождает ряд провоспалительных факторов таких как цитокины (IL-1 β , IL-12, TNF- α), хемокины (CCL2, CXCL9, CXCL10), активные формы кислорода и оксид азота [3, 4]. Активация микроглии по классическому пути изначально является защитной реакцией и направлена на устранение повреждения, однако чрезмерная M1-подобная активация из-за высвобождения большого количества провоспалительных медиаторов способна приводить к ещё большему повреждению нервной ткани [2–4], компартиментализации воспаления с вовлечением отдаленных органов и формированием порочного круга [32]. Альтернативная M2-подобная активация клеток микроглии происходит под влиянием IL-4, IL-10, IL-13, трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и направлена на восстановление целостности тканей и их функций, стимуляцию регенерации, обратному развитию воспалительных реакций, утилизации продуктов повреждения [2, 4, 33]. В исследовании Brennan и соавт. [34] было показано, что активация специфичных для микроглии сигнальных путей у мышей с истощенной микроглией способствовала уменьшению выраженности вторичного повреждения ЦНС и положительно влияла на процессы регенерации нервной ткани. При изучении молекулярных механизмов регенерации аксонов у личинок рыб *Danio rerio* после травмы спинного мозга было установлено, что подавление воспаления уменьшало, а его активация ускоряла регенерацию аксонов, при этом ключевую роль в процессах регенерации играли не нейтрофилы или микроглия, а периферические макрофаги за счет секреции провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α [35].

Рассечение тканей, нанесение механической травмы спинного мозга являются серьёзными повреждающими факторами и могут способствовать увеличению выброса гормонов стресса у рыб *Danio rerio*. Также, как и у млекопитающих, в организме рыб *Danio rerio* присутствуют эволюционно консервативные системы, такие как норадренергическая, серотонинергическая, дофаминергическая, а также стресс-реализующая система с основным гормоном стресса — кортизолом [36, 37]. При повреждении головного мозга помимо активации микроглии и астроцитов происходит также актива-

ция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, что приводит к секреции большого количества кортизола, оказывающего противовоспалительное действие за счет подавления активности иммунных клеток [38, 39]. В исследовании Hartig и соавт. [37] показано, что у эмбрионов рыб *Danio rerio*, обработанных кортизолом, значительно повышалась экспрессия генов *irg1l* (immunoresponsive gene 1-like), *mpeg1* (macrophage marker) и *socs3a* (immunoregulatory gene), связанных с регуляцией иммунного ответа. При этом у рыб *Danio rerio*, полученных из эмбрионов, обработанных кортизолом, нарушались процессы регенерации после повреждения хвостового плавника, а моделирование воспаления посредством введения этим рыбам липополисахарида, приводило к подавлению экспрессии генов провоспалительных цитокинов в сердце, селезенке и мышцах (*il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *socs3a*) в сравнении с интактными рыбами не подвергшихся воздействию кортизола [37]. В нашем исследовании у рыб *Danio rerio* через 24 ч после полной транссекции спинного мозга регистрировались изменения профиля экспрессии провоспалительных *il-1 β* , *il-6*, *ifn- γ* и противовоспалительного *il-10* генов в органах по сравнению с таковыми у рыб без повреждения спинного мозга: происходило повышение экспрессии генов *il-1 β* и *il-6* в нервной ткани, в кардиомиоцитах снижение экспрессии генов *il-6* и *il-10*, в гепатоцитах снижение экспрессии гена *il-10*, тогда как в почках экспрессия гена *il-10* повышалась, а гена *ifn- γ* понижалась. Более того, в тканях мозга уровень экспрессии гена *mpeg-1.1*, кодирующего порообразующий белок перфорин-2 по своей структуре и функциям схожий с C9 компонентом комплемента [40], был более чем в сто раз выше такового в кардиомиоцитах, гепатоцитах и ткани почек. Таким образом, полученные результаты подтверждают развитие нейровоспаления у рыб *Danio rerio* в ответ на травму спинного мозга, кроме того, имеет место компартиментализация воспаления с вовлечением печени, почек, сердца. Интересно, что мы не зафиксировали изменение уровня экспрессии гена *trp* в тканях мозга. Активация продукции лизосомального фермента миелопероксидазы указывала бы, скорее всего, на присутствие PAMP, то есть инфекционных агентов [28, 41, 42]. В нашем случае имело место стерильное воспаление, инициированное хирургическим повреждением тканей.

В ответ на повреждение ЦНС помимо микроглии активируются астроциты, которые также участвуют в развитии нейровоспаления. Астроциты составляют 19–40% глиальных клеток [43] и в норме обеспечивают формирование синапсов, аксональную передачу, миелинизацию, участвуют в регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера [5, 31, 44]. Подобно клеткам микро-

глии астроциты могут иметь как провоспалительный, так и противовоспалительный фенотип [2, 33]. Астроциты секретируют провоспалительные факторы такие как IL-1 β , TNF- α , активные формы кислорода, оксид азота, что усиливает процессы нейровоспаления [2, 5, 33]. Противовоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-13 и IL-10 способствуют индукции альтернативной, или нейропротективной активации астроцитов. Альтернативно-активированные астроциты также высвобождают IL-4, IL-10 и TGF- β , нейротрофический фактор мозга, которые оказывают противовоспалительное действие при повреждении головного или спинного мозга [2, 33].

Таким образом, процесс реализации иммунного ответа при повреждении центральной нервной системы, а также его генерализация, являются регулируемым. Ключевую роль в нем играют M1 или M2 клетки микроглии. Вместе с тем, поляризация в том или ином направлении регулируется цитокинами про- или противовоспалительного спектра. В последнее время активно изучается роль внеклеточных везикул в процессах регуляции клеточной дифференцировки, пролиферации, функциональной активности и т. д. При этом наиболее важными факторами эффективности являются их клеточное происхождение, переносимый груз нуклеиновых кислот, белков, липопротеидов [45–47].

Предполагается, что введение экзогенных ВВ на фоне повреждения спинного мозга и развившегося нейровоспаления может внести существенный вклад в поляризацию иммунного ответа с возможным переключением микроглии на M1 или M2 фенотип. Кроме того, при системном введении везикул можно ожидать их эффекты в отдаленных органах и тканях. В наших экспериментах интрацеломическое введение рыбам *Danio rerio* с травмой спинного мозга ВВ, секретируемых как неактивированными (EVs_{NA}), так и активированными макрофагоподобными клетками THP-1 (EVs_{PMA} и EVs_{TNF}), не приводило к достоверному изменению профиля экспрессии исследуемых генов про- и противовоспалительных цитокинов. Вместе с тем, были отмечены тренды, которые могли бы быть продемонстрированы при более подробном изучении дозозависимых эффектов вводимых внеклеточных везикул. Наиболее “перспективными” в этом отношении можно считать внеклеточные везикулы, полученные при стимуляции клеток THP-1 фактором некроза опухолей.

Полученные результаты позволяют также предположить, что ВВ, секретируемые моноцитоподобными клетками под воздействием TNF, могут нести в своем составе маркеры активации сигнальных путей, влияющих на процессы, протекающие не только в микроглии, но и астроцитах, которые также участвуют в развитии нейровоспаления. ВВ

могут оказывать влияние на различные сигнальные пути, в частности src-киназу, ERK1/2 киназу, эндотелиальную NO-синтазу (eNOS), сборку NL- β -инфламмосомы и т. д. Эти пути связаны с адгезией, миграцией, пролиферацией, продукцией цитокинов клетками [48, 49].

В своем исследовании Chaudhuri и соавт. [50] показали, что внеклеточные везикулы, секретируемые астроцитами в зависимости от вида стимула (АТФ, IL-1 β и TNF- α) несли в себе различные грузы микроРНК и оказывали противоположные эффекты на нейроны гиппокампа. ВВ, секретируемые при обработке астроцитов АТФ, содержали в своем составе let-7f, miR-100, miR-23a, miR-145 и способствовали увеличению длины аксонов, дендритов и формированию нервных узлов. В то время как ВВ, секретируемые астроцитами при стимуляции IL-1 β и TNF- α , оказывали обратные эффекты на длину аксонов и дендритов, а также количество нервных узлов. ВВ, полученные от воздействия IL-1 β , несли в себе let-7a, let-7c, let-7d, let-7f, miR-16, miR-214, miR-100, miR-125a-5p, miR-125b-5p и miR-24, а ВВ, секретируемые при воздействии TNF α , содержали miR-27b, miR-145, miR-107, miR-628, miR-544, miR-598-5p, miR-16, miR-1224, miR-214, miR-199a-3p, miR-501, miR-125b-5p, miR-24, miR-532-5p и miR-208a [50]. В исследовании *in vivo* на мышинной модели было показано, что экзосомы микроглиального происхождения содержали повышенный уровень microRNA-124-3p и способствовали поляризации макрофагов в M2 фенотип, что значительно снижало воспалительную реакцию при черепно-мозговой травме. Ингибирующий эффект microRNA-124-3p на воспаление нейронов происходил путем подавления активности передачи сигналов через mTOR (the mammalian target of rapamycin) за счет снижения экспрессии гена *PDE4B*. Кроме того, повышенное содержание microRNA-124-3p в экзосомах способствовало восстановлению поврежденных нейронов [51].

Очевидно, что молекулярный состав внеклеточных везикул влияет как на их биодоступность, так и на вызываемые эффекты. Экспрессируемые на поверхности ВВ молекулы межклеточной адгезии, интегрины, тетраспанины и т. д. влияют на распространение и миграцию, опосредуя связывание частиц с дифференциально экспрессируемыми лигандами на разных типах клеток в разных органах [52, 53]. Например, ВВ, несущие тетраспанин Tspan8 и интегрин ITG β 4, преимущественно связываются тканями селезенки, легких и почек [54]; ВВ, экспрессирующие ITG α 5 β 1 и α V β 3 и взаимодействующие с фибронектином, демонстрируют преимущественную нацеленность на печень [55]; ВВ, несущие ITG β 3, — на мозг [56]. В процессе циркуляции эти молекулы адгезии с различной

степенью специфичности связываются с такими целевыми клетками в органах как эндотелиоциты, эпителиоциты, фагоциты [57, 58]. Вероятно, регистрируемые нами различные эффекты, или отсутствие таковых, в отдаленных органах при введении ВВ от активированных по-разному клеток, связано с различием в экспрессии именно молекул адгезии и тетраспанинов. В частности, уровень CD54 (ICAM-1) во ВВ в группе EVs_TNF был выше, чем во фракции везикул EVs_PMA [22, 23].

При реализации иммунного ответа внеклеточные везикулы участвуют в обеспечении взаимодействия разных звеньев иммунной системы, а именно врожденной и адаптивной. Для активации наивной Т-клетки необходима презентация антигена антигенпрезентирующей клеткой (АПК) в составе главного комплекса гистосовместимости. ВВ могут брать на себя эту функцию, когда АПК напрямую не взаимодействует с Т-клеткой [59]. Так же, как и с клетками, для обеспечения контакта на ВВ потребуется ко-экспрессия ICAM-1 и рецепторов B7-1 (CD80)/ B7-2 (CD86) [60, 61]. Таким образом, экспрессия костимуляторных и адгезионных молекул на поверхности ВВ, продуцируемых моноцитоподобными клетками, может быть критичной для реализации их функций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании на рыбах *Danio rerio* мы продемонстрировали возможность посредством внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками, влиять на поляризацию иммунного ответа после смоделированной травмы спинного мозга, в частности на изменение уровня экспрессии провоспалительных и противовоспалительных генов в тканях мозга, сердца, печени и почки.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Планирование эксперимента, подготовка и обработка проб, сбор данных (Г.А.С., С.Д.Б., К.О.В., А.А.Д., Т.П.В., К.Е.Е., Т.А.С., Р.А.А., М.Л.А., К.И.В.), обработка данных (Г.А.С., К.О.В., С.Д.Б., А.А.Д., Т.П.В.), написание и редактирование манускрипта (Г.А.С., К.О.В., С.Д.Б.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Протокол эксперимента был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных

животных НМИЦ им. В.А. Алмазова (выписка № 8 из протокола № 22–8/1 от 31 августа 2022 г.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19–75–20076, <https://rscf.ru/project/19-75-20076/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orr MB, Gensel JC (2018) Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics* 15: 541–553. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0631-6>
2. Liu X, Zhang L, Cao Y, Jia H, Li X, Li F, Zhang S, Zhang J (2023) Neuroinflammation of traumatic brain injury: Roles of extracellular vesicles. *Front Immunol* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1088827>
3. Loane DJ, Kumar A (2016) Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 275: 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.018>
4. Yang Y, Boza-Serrano A, Dunning CJR, Clausen BH, Lamberts KL, Deierborg T (2018) Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *J Neuroinflammation* 15. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1204-7>
5. Shi K, Zhang J, Dong J, Shi FD (2019) Dissemination of brain inflammation in traumatic brain injury. *Cell Mol Immunol* 16: 523–530. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0213-5>
6. Ruan J, Miao X, Schlüter D, Lin L, Wang X (2021) Extracellular vesicles in neuroinflammation: Pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Mol Ther* 29: 1946–1957. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.020>
7. Simon DW, McGeachy MJ, Bayl H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM (2017) The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 13: 171–191. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.13>
8. Zhang J, Shi W, Qu D, Yu T, Qi C, Fu H (2022) Extracellular vesicle therapy for traumatic central nervous system disorders. *Stem Cell Res Ther* 13. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03106-5>
9. Verdi V, Bécot A, van Niel G, Verweij FJ (2021) In vivo imaging of EVs in zebrafish: New perspectives from “the waterside.” *FASEB BioAdvances* 3: 918–929. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00081>
10. Aires ID, Ribeiro-Rodrigues T, Boia R, Ferreira-Rodrigues M, Girão H, Ambrósio AF, Santiago AR (2021) Microglial extracellular vesicles as vehicles for neurodegeneration spreading. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11060770>

11. *Hu Q, Su H, Li J, Lyon C, Tang W, Wan M, Ye Hu T* (2020) Clinical applications of exosome membrane proteins. *Precis Clin Med* 3: 54–66.
<https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbaa007>
12. *Fitzgerald W, Freeman ML, Lederman MM, Vasilieva E, Romero R, Margolis L* (2018) A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. *Sci Rep* 8(1): 8973.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27190-x>
13. *Kondratov K, Nikitin Y, Fedorov A, Kostareva A, Mikhailovskii V, Isakov D, Ivanov A, Golovkin A* (2020) Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. *J Extracell Vesicles* 9.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1743139>
14. *Kalinina OV, Khudiakov AA, Panshin DD, Nikitin YV, Ivanov AM, Kostareva AA, Golovkin AS* (2022) Small Non-Coding RNA Profiles of Sorted Plasma Extracellular Vesicles: Technical Approach. *J Evol Biochem Physiol* 58:1847–1864.
<https://doi.org/10.1134/s0022093022060151>
15. *Fedorov A, Kondratov K, Kishenko V, Mikhailovskii V, Kudryavtsev I, Belyakova M, Sidorkevich S, Vavilova T, Kostareva A, Sirotkina O, Golovkin A* (2020) Application of high-sensitivity flow cytometry in combination with low-voltage scanning electron microscopy for characterization of nanosized objects during platelet concentrate storage. *Platelets* 31: 226–235.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1599337>
16. *Jin T, Gu J, Li Z, Xu Z, Gui Y* (2021) Recent advances on extracellular vesicles in central nervous system diseases. *Clin Interv Aging* 16: 257–274.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S288415>
17. *Rong Y, Liu W, Wang J, Fan J, Luo Y, Li L, Kong F, Chen J, Tang P, Cai W* (2019) Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy. *Cell Death Dis* 10.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1571-8>
18. *Mhalhel K, Sicari M, Pansera L, Chen J, Levanti M, Diotel N, Rastegar S, Germanà A, Montalbano G* (2023) Zebrafish: A Model Deciphering the Impact of Flavonoids on Neurodegenerative Disorders. *Cells* 12.
<https://doi.org/10.3390/cells12020252>
19. *Saleem S, Kannan RR* (2018) Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov* 4.
<https://doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7>
20. *Lee Y, Lee S, Park JW, Hwang JS, Kim SM, Lyoo IK, Lee CJ, Han IO* (2018) Hypoxia-Induced Neuroinflammation and Learning–Memory Impairments in Adult Zebrafish Are Suppressed by Glucosamine. *Mol Neurobiol* 55: 8738–8753.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1017-9>
21. *Zeng C-W, Tsai H-J* (2023) The Promising Role of a Zebrafish Model Employed in Neural Regeneration Following a Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci* 24: 13938.
<https://doi.org/10.3390/ijms241813938>
22. *Sambur DB, Kalinina OV, Aquino AD, Tirikova PV, Mignunova MA, Koroleva EE, Trulyov AS, Rubinshtein AA, Kudryavtsev IV, Golovkin AS* (2024) Extracellular vesicles secreted by the THP-1 cells influence on the inflammation gene expression in zebrafish. *Neurochem J* 1.
23. *Акино АД, Рубинштейн АА, Трулев АС, Кудрявцев ИВ, Головкин АС* (2024) Изменение профиля продуцируемых внеклеточных везикул клетками линии THP-1 в зависимости от использованного стимулятора. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. Опубликовано онлайн 07.12.2023. [Aquino AD, Rubinshtein AA, Trulyov AS, Kudryavtsev IV, Golovkin AS (2024) Izmenenie profilya produciruemyyh vnekletochnyh vezikul kletkami linii THP-1 v zavisimosti ot ispol'zovannogo stimulyatora Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevanij (In Russ)]. Published Online 7 December 2023.
24. *Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan M, Brigstock DR, Brisson A, Broekman MLD, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DRF, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chaudhuri AD, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FAW, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TAP, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, EL Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DCI, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AGE, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S ichi, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin I V., Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li ITS, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SLN, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens*

- Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciacci VR, Möller A, Möller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen ENM, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlin A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Ostegaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BCH, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovcova I, Poon IKH, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudski N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KMA, Ruggetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PRM, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BWM, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJC, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti JJ, Veit TD, Vella LJ, Velot E, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wautben MHM, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang Jye, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
25. Dubashynskaya NV, Bokaty AN, Golovkin AS, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, Trulioff AS, Dubrovskii YA, Skorik YA (2021) Synthesis and characterization of novel succinyl chitosan-dexamethasone conjugates for potential intravitreal dexamethasone delivery. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222010960>
 26. Kudryavtsev I, Kalinina O, Bezrukikh V, Melnik O, Golovkin A (2021) The significance of phenotyping and quantification of plasma extracellular vesicles levels using high-sensitivity flow cytometry during covid-19 treatment. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13050767>
 27. Hui SP, Dutta A, Ghosh S (2010) Cellular response after crush injury in adult zebrafish spinal cord. *Dev Dyn* 239: 2962–2979. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22438>
 28. Alexey G, Ma Y, Fedorov AV, Kondratov KA, Knyazeva AA, Vasyutina ML (2021) Organ-specific lps-induced inflammatory gene expression in adult zebrafish. *Med Immunol* 23: 1069–1078. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-OSL-2357>
 29. Hu X, Xu W, Ren Y, Wang Z, He X, Huang R, Ma B, Zhao J, Zhu R, Cheng L (2023) Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 8. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01477-6>
 30. Herzog C, Greenald D, Larraz J, Keatinge M, Herrgen L (2020) RNA-seq analysis and compound screening highlight multiple signalling pathways regulating secondary cell death after acute CNS injury *in vivo*. *Biol Open* 9. <https://doi.org/10.1242/bio.050260>
 31. Fontaine M, Lepape A, Piriou V, Venet F, Friggeri A (2016) Innate danger signals in acute injury: From bench to bedside. *Anaesth Crit Care Pain Med* 35: 283–292. <https://doi.org/10.1016/J.ACCPM.2015.10.009>
 32. Cavaillon JM, Annane D (2006) Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 12: 151–170. <https://doi.org/10.1179/096805106X102246>
 33. Kwon HS, Koh SH (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
 34. Brennan FH, Li Y, Wang C, Ma A, Guo Q, Li Y, Pukos N, Campbell WA, Witcher KG, Guan Z, Kigerl KA, Hall JCE, Godbout JP, Fischer AJ, McTigue DM, He Z, Ma Q, Popovich PG (2022) Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nat Commun* 13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31797-0>
 35. Tsarouchas TM, Wehner D, Cavone L, Munir T, Keatinge M, Lambertus M, Underhill A, Barrett T, Kassapis E, Ogryzko N, Feng Y, van Ham TJ, Becker T, Becker CG (2018) Dynamic control of proinflammatory cytokines IL-1 β and Tnf- α by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration. *Nat Commun* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07036-w>
 36. Theron V, Harvey BH, Botha T, Weinshenker D, Wolmarans DW (2023) Life-threatening, high-intensity trauma and context-dependent anxiety in zebrafish and its modulation by epinephrine. *Horm Behav* 153: 105376. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2023.105376>
 37. Hartig EI, Zhu S, King BL, Coffman JA (2016) Cortisol-treated zebrafish embryos develop into pro-inflammatory adults with aberrant immune gene regulation. *Biol Open* 5: 1134–1141. <https://doi.org/10.1242/bio.020065>
 38. Barton DJ, Kumar RG, Schuster AA, Juengst SB, Oh BM, Wagner AK (2021) Acute Cortisol Profile Associations With Cognitive Impairment After Severe Traumatic Brain Injury. *Neurorehabil Neural Repair* 35: 1088–1099. <https://doi.org/10.1177/15459683211048771>
 39. Dong T, Zhi L, Bhayana B, Wu MX (2016) Cortisol-induced immune suppression by a blockade of lymphocyte egress in traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 13. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0663-y>
 40. Ferrero G, Gomez E, Lye S, Rovira M, Miserocchi M, Langenau DM, Bertrand JY, Wittamer V (2020) The macrophage-expressed gene (mpeg) 1 identifies a subpopula-

- tion of B cells in the adult zebrafish. *J Leukoc Biol* 107: 431–443.
<https://doi.org/10.1002/JLB.1A1119-223R>
41. Rojo I, de Ilárduya ÓM, Estonba A, Pardo MÁ (2007) Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation. *Fish Shellfish Immunol* 23: 1285–1293.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.07.002>
 42. Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE (2001) Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98: 3087–3096.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.V98.10.3087>
 43. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J (2020) Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00294>
 44. Hart CG, Karimi-Abdolrezaee S (2021) Recent insights on astrocyte mechanisms in CNS homeostasis, pathology, and repair. *J Neurosci Res* 99: 2427–2462.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24922>
 45. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S (2016) Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 17.
<https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
 46. Великонивцев ФС, Головкин АС (2020) Терапия внеклеточными везикулами: возможности, механизмы и перспективы применения. *Росс кардиол журн* 25(10): 4081. [Velikonivtsev FS, Golovkin AS (2020) Extracellular vesicle therapy: effectiveness, mechanisms and application potentials. *Russ J Cardiol* 25(10):4081. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4081>
 47. Velmiskina AA, Kalinina OV, Petrova TA, Nikitin YV, Golovkin AS (2022) Methodology To Study Single Extracellular Vesicles Of Various Cellular Origin. *Russ J Pers Med* 2: 101–110.
<https://doi.org/10.18705/2782-3806-2022-2-3-101-110>
 48. Chan YK, Zhang H, Liu P, Tsao SW, Lung ML, Mak NK, Ngok-Shun Wong R, Yue PYK (2015) Proteomic analysis of exosomes from nasopharyngeal carcinoma cell identifies intercellular transfer of angiogenic proteins. *Int J Cancer* 137: 1830–1841.
<https://doi.org/10.1002/ijc.29562>
 49. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R (2013) Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* 27: 31–39.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.002>
 50. Chaudhuri AD, Dastgheyb RM, Yoo SW, Trout A, Talbot CC, Hao H, Witwer KW, Haughey NJ (2018) TNFα and IL-1β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons article. *Cell Death Dis* 9.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0369-4>
 51. Huang S, Ge X, Yu J, Han Z, Yin Z, Li Y, Chen F, Wang H, Zhang J, Lei P (2018) Increased miR-124–3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J* 32: 512–528.
<https://doi.org/10.1096/fj.201700673R>
 52. Lin W, Fang J, Wei S, He G, Liu J, Li X, Peng X, Li D, Yang S, Li X, Yang L, Li H (2023) Extracellular vesicle-cell adhesion molecules in tumours: biofunctions and clinical applications. *Cell Commun Signal* 21: 246.
<https://doi.org/10.1186/s12964-023-01236-8>
 53. Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M, Hingst JR, Hjorth M, Hughes WE, Egan CL, Cron L, Watt KI, Kuchel RP, Jayasooriah N, Estevez E, Petzold T, Suter CM, Gregorevic P, Kiens B, Richter EA, James DE, Wojtaszewski JFP, Febbraio MA (2018) Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. *Cell Metab* 27: 237–251.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.001>
 54. Rana S, Yue S, Stadel D, Zöller M (2012) Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1574–1584.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.018>
 55. Nguyen SL, Ahn SH, Greenberg JW, Collaer BW, Agnew DW, Arora R, Petroff MG (2021) Integrins mediate placental extracellular vesicle trafficking to lung and liver in vivo. *Sci Rep* 11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82752-w>
 56. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Jørgen Labori K, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, De Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527:329–335.
<https://doi.org/10.1038/nature15756>
 57. Ghoroghi S, Mary B, Larnicol A, Asokan N, Klein A, Osmani N, Busnelli I, Delalande F, Paul N, Halary S, Gros F, Fouillen L, Haeberle AM, Royer C, Spiegelhalter C, André-Grégoire G, Mittelheisser V, Detappe A, Murphy K, Timpson P, Carapito R, Blot-Chabaud M, Gavard J, Carapito C, Vitale N, Lefebvre O, Goetz JG, Hyenne V (2021) Ral GTPases promote breast cancer metastasis by controlling biogenesis and organ targeting of exosomes. *Elife* 10:1–29.
<https://doi.org/10.7554/eLife.61539>
 58. Leary N, Walser S, He Y, Cousin N, Pereira P, Gallo A, Collado-Diaz V, Halin C, Garcia-Silva S, Peinado H, Dieterich LC (2022) Melanoma-derived extracellular vesicles mediate lymphatic remodelling and impair tumour immunity in draining lymph nodes. *J Extracell Vesicles* 11.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12197>
 59. Ruhland MK, Roberts EW, Cai E, Mujal AM, Marchuk K, Beppler C, Nam D, Serwas NK, Binnewies M, Krummel MF (2020) Visualizing Synaptic Transfer of Tumor Antigens among Dendritic Cells. *Cancer Cell* 37:786–799.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.05.002>
 60. Hwang I, Shen X, Sprent J (2003) Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-present-

ing cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules. Proc Natl Acad Sci U S A 100(11): 6670–6675.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1131852100>

61. Robbins PD, Morelli AE (2014) Regulation of immune responses by extracellular vesicles. Nat Rev Immunol 14: 195–208.
<https://doi.org/10.1038/nri3622>

ADMINISTRATION OF THE IMMUNE RESPONSE TO SPINAL CORD INJURY IN ZEBRAFISH BY EXTRACELLULAR VESICLES SECRETED BY ACTIVATED MONOCYTE-LIKE CELLS

D. B. Sambur^a, O. V. Kalinina^a, A. D. Aquino^a, P. V. Tirikova^a, E. E. Koroleva^a, A. S. Trulioff^b,
 A. A. Rubinshtein^{a, b}, L. A. Murashova^a, I. V. Kudryavtsev^{a, b}, A. S. Golovkin^{a, #}

^a Federal State Budgetary Institution “Almazov National Medical Research Center”, St. Petersburg, Russia, 197341

^b Federal State Budgetary Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia, 197376

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

The immune response to spinal cord injury is realized by local and systemic inflammation, followed by repair and restoration of the function of damaged organs. The opportunity to control pro-inflammatory activity and stimulate regenerative processes is an important aspect of the research. Extracellular vesicles (EVs) secreted by activated monocyte-like cells may be a useful tool to drive the polarization of the immune response towards M1 or M2. The aim of the study was to investigate the systemic effects of extracellular vesicles, produced by activated monocyte-like cells of the THP-1 line, after spinal cord injury in zebrafish. It was shown that intracoelomic administration to *Danio rerio* fish with spinal cord injury of EVs secreted by THP-1 cells, activated by the tumor necrosis factor (TNF), led to a proinflammatory effect, manifested by an increase in the expression of *il-6* and *tnf-α* genes in the brain tissue, and to a less pronounced change in activity in the tissues of the heart, liver and kidney. In the same time, EVs, secreted by unactivated THP-1 cells as well as activated by the phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), did not show any activity. Thus, it was demonstrated that extracellular vesicles secreted by activated monocyte-like cells have the potential to influence on the polarization of the immune response after simulated spinal cord injury in zebrafish.

Key words: *Danio rerio*, zebrafish, spinal cord injury, Extracellular vesicles, THP-1 cells, gene expression, systemic inflammation

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СОТРУДНИЧЕСТВА НА АМПЛИТУДЫ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПРИ ТВОРЧЕСКОЙ И НЕТВОРЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2024 г. Ж. В. Нагорнова^{1,*}, Н. В. Шемякина^{1,**}

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

* E-mail: nagornova_zh@mail.ru

** E-mail: shemyakina_n@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 11.12.2024 г.

Принята к публикации 12.12.2024 г.

Данная работа является продолжением ряда работ по исследованию влияния условий социального взаимодействия (соревнования или сотрудничества) на мозговые корреляты вербальной творческой деятельности. В работе рассматривается модель сотрудничества, в которой участникам ставилась задача вместе, хотя и не советуясь, придумать как можно больше ответов в творческом и нетворческом заданиях. Испытуемые (4 мужчин, 26 женщин) выполняли два типа заданий индивидуально и в условиях сотрудничества в парах (мужчина-мужчина, женщина-женщина): творческое — придумать необычное использование повседневного предмета, и нетворческое — перечислить предметы из предложенных категорий. Сравнивали вызванные потенциалы (ВП) в каждом из заданий между условиями сотрудничества и индивидуального выполнения. Условия сотрудничества приводили к уменьшению амплитуды компонента P200 на временном интервале 148–272 мс от начала предъявления стимула как при творческой, так и при нетворческой деятельности, свидетельствуя о снижении внимания к стимулу в условиях социального взаимодействия. При выполнении творческого задания наблюдается большая амплитуда позднего позитивного компонента на интервале 662–1240 мс — в задневисочных и затылочных отведениях, что может отражать активацию височно-теменного соединения, вовлеченного в процессы “понимания другого”.

Ключевые слова: ЭЭГ, вызванные потенциалы (ВП), вербальная творческая деятельность, сотрудничество, социальные взаимодействия, тест альтернативного использования, P200

DOI: 10.31857/S0044452924010088, EDN: ZFJYHO

ВВЕДЕНИЕ

Социальное взаимодействие существенным образом влияет на нейрофизиологические механизмы той или иной деятельности. Мозговая активность при выполнении заданий в условиях взаимодействия с реальным партнером отличается от взаимодействия с компьютерной программой [1, 2] или, как нами было показано ранее, от выполнения заданий индивидуально [3]. Даже при восприятии записи речи, если испытуемый думает, что это живая речь невидимого социального партнера — наблюдается активация индивидуальных зон сети ментализации (mentalizing) для понимания состояния другого человека, отсутствующая, если участник знал, что прослушивает запись речи [4]. Исследования с использованием подходов гиперсканинга (то есть одновременной синхронной регистрации показателей активности мозга у двух и более участников социального взаимодействия) демонстрируют, что условия совместной деятельности модулируют активность дорсомедиальной префронтальной коры (dorsomedial prefrontal

cortex), височно-теменного соединения (temporoparietal junction) и передней поясной коры (anterior cingulate cortex) при участии в экономических играх [5]. Творческая деятельность в условиях совместного выполнения (прежде всего, музыкальное творчество) характеризуется увеличением индивидуальной синхронизации и межсубъектной синхронизации между участниками в низкочастотных диапазонах (дельта, тета и низкочастотный альфа-диапазоны ЭЭГ) в лобных и центральных областях [6] и увеличением десинхронизации (оцениваемой для участников отдельно) в альфа-диапазоне ЭЭГ [7]. При совместной игре на музыкальных инструментах, как модели сотрудничества в творческой деятельности — наблюдается увеличение межсубъектной синхронизации ЭЭГ [см. для обзора 8].

Вербальная творческая деятельность (придумывание необычного использования) в условиях сотрудничества приводит к увеличению индекса межсубъектной синхронизации активности правой дорсолатеральной префронтальной коры и правого височно-теменного

соединения по данным спектроскопии в ближней инфракрасной области [9]. В условиях соревнования такой паттерн межсубъектной синхронизации не наблюдался [9]. Условие сотрудничества приводило к увеличению беглости и оригинальности идей по сравнению с условием соревнования. В нашем предыдущем исследовании было показано, что условие соревнования значительно уменьшает количество ответов в творческом и нетворческом заданиях и приводит к уменьшению амплитуд как перцептивных, так и семантических компонентов вызванных потенциалов (ВП) [3]. Целью данной работы была оценка влияния условий сотрудничества на амплитуды вызванных потенциалов при вербальной творческой и нетворческой деятельности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участники. В исследовании одновременной деятельности приняли участие 15 пар испытуемых (мужчина-мужчина, женщина-женщина) 18–22 лет (4 мужчин, 26 женщин), студенты вузов естественно-научного и гуманитарного профиля. Участники на момент проведения исследования были здоровы, без неврологических нарушений и соматических заболеваний, не проходили медикаментозную терапию. Участие в исследовании было добровольным, участники давали информированное согласие после ознакомления с процедурой и целями исследования.

Задания, процедура исследования. Исследование проводилось в тихом, освещенном помещении. Испытуемые располагались в креслах на равном расстоянии (1.5 м) от монитора компьютера, на котором предъявлялись стимулы. Предъявление стимулов осуществлялось в программе PsyTask, в центре экрана черным шрифтом (Times New Roman, 48 кегль) на белом фоне, все буквы строчные. Участники выполняли два типа заданий: творческое задание — придумать как можно больше способов необычного использования обычного предмета (тест альтернативного использования [10]) и нетворческое — перечислить объекты из предложенной категории. В творческой задаче испытуемым предлагались повседневные предметы, например: газета, скрепка, гвоздь и др., в контрольном задании — названия широко распространенных категорий: мебель, посуда, транспорт и т. п. Задания выполнялись в парадигме вызванных потенциалов и были организованы в короткие блоки. В каждом блоке проб испытуемому предъявлялось около 10 одинаковых стимулов с одинаковой инструкцией (один и тот же предмет или название категории). В каждой пробе через 300 мс от начала пробы предъявлялся стимул: слово, обозначающее предмет или категорию (длительность предъявления 400 мс). Стимул сменялся точкой в центре экрана для фиксации взгляда (длительность предъявления 4400 мс). В этот период времени испытуемые должны были придумать ответ, мысленно “проговорить” его и нажать на кнопку мыши. На 5100-й мс предъявлялся знак вопроса (“?”)

с экспозицией 100 мс, после которого испытуемые озвучивали ответ. В случае отсутствия ответа — испытуемые на кнопку мыши не нажимали и после знака вопроса говорили слово “нет”. Длительность межпробного интервала была рандомизирована от 2500 до 3000 мс. Блоки творческого и контрольного заданий чередовались между собой. Всего предъявлялось более 100 проб в “творческих” и “контрольных” блоках. В творческом задании перед испытуемыми ставилась инструкция “быть оригинальным” — т. е. придумывать наиболее интересные и необычные способы использования объектов.

Задания выполнялись в двух условиях — в условиях совместной деятельности и индивидуально. Порядок индивидуального или совместного выполнения был рандомизирован между парами участников — 8 пар испытуемых начинали выполнять задания совместно, а затем — каждый участник выполнял такое же задание, но с другими стимулами индивидуально, 7 пар участников выполняли задание сначала индивидуально, а потом — совместно. Совместная деятельность выполнялась в условиях сотрудничества. Участникам показывалась гистограмма с количеством ответов других пар и сообщалось, что их задача — вдвоем придумать как можно больше идей использования предметов (или перечислить как можно больше объектов из категорий) — так, чтобы превысить количество ответов, данных другими парами. Никакого поощрения за “победу” участникам пары не обещалось.

После исследования испытуемые оценивали субъективную сложность заданий (по 10-балльной шкале: 1 — минимум, 10 — максимум), силу и знак эмоций, возникавших во время выполнения задания (от -10 до 10), а также оценивали “степень сотрудничества” партнера в паре (по 10-балльной шкале).

Регистрация ЭЭГ (ВП). Регистрацию ЭЭГ при выполнении задания проводили с использованием 32-х канального электроэнцефалографа “Мицар” (ООО “Мицар”, С.-Петербург) при помощи программного пакета WinEEG (Пономарев В.А., Кропотов Ю.Д., № государственной регистрации 2001610516 от 08.05.2001) монополярно, от 15 хлорсеребряных электродов, расположенных на голове испытуемых по модифицированной системе 10–20 (Fpz, F7, F3, Fz, F4, F8, C3, C4, T5, P3, Pz, P4, T6, O1, O2), в полосе пропускания от 0.53–150 Гц, режекторный фильтр 50 Гц, с частотой оцифровки сигнала 500 Гц. Объединенный ушной электрод располагался на мочках обеих ушей, заземляющий электрод — в передне-центральной отведении на поверхности головы. Сопротивление электродов не превышало 5 кОм.

Предобработка ЭЭГ и расчет ВП. В записях ЭЭГ корригировались артефакты горизонтальных и вертикальных движений глаз методом пространственной фильтрации путем обнуления соответствующих независимых компонентов ЭЭГ [11–13]. Далее автоматически из ЭЭГ исключались фрагменты, содержащие волны с амплитудой больше 100 мкВ и фрагменты ЭЭГ, содержащие медленные волны (0–2 Гц с амплитудой выше 50 мкВ)

и быстрые волны (25–35 Гц с амплитудой выше 35 мкВ). После автоматического исключения артефактов проводили визуальный анализ его качества. Расчет вызванных потенциалов проводился только на безартефактных пробах, в которых испытуемые нашли ответ и нажали на кнопку. ВП рассчитывались в интервале от 300 мс до предъявления стимула и 2000 мс после. Усреднение ВП проводилось для каждого испытуемого, каждого электрода и каждого типа проб (творческое, контрольное задания) отдельно.

Статистический анализ. Сравнивали амплитуды усредненных ВП между условиями индивидуального и совместного выполнения заданий с использованием дисперсионного анализа для повторных измерений (RM-ANOVA) для факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ (совместно/индивидуально) и ЗОНА (15 отведений ЭЭГ) и их взаимодействий в творческом и контрольном заданиях отдельно для всех отведений и в областях интереса с учетом поправки Гринхауза-Гейсера [14]. Как области интереса выделены лобные зоны: электроды F7, F3, Fz, F4, F8, и задневисочные-затылочные зоны: электроды T5, T6, O1, O2, чьи проекции соотносятся с областями дорсомедиальной префронтальной коры и височно-теменного соединения, играющими роль в социальных взаимодействиях [21–24]. Апостериорный анализ проводился с использованием LSD критерия Фишера. Интервалы и топографии различий определялись по полумаксимуму разностной волны между ВП в условиях соревнования и индивидуального выполнения.

Поведенческие данные между состояниями сравнивались при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, для всех поведенческих данных и результатов субъективных оценок приводятся значения медиан и нижнего-верхнего квартилей распределения. Статистический анализ проводился в программном пакете Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведенческие результаты выполнения творческого и нетворческого заданий в условиях сотрудничества и индивидуального выполнения

Поведенческие данные при выполнении творческого и контрольного заданий в условиях сотрудничества и индивидуальном выполнении заданий приведены в таблице 1.

Количество ответов было значимо меньше при творческой деятельности в сравнении с нетворческой, как в условиях индивидуального выполнения ($Z=4.7$, $p<0.001$), так и в условиях сотрудничества ($Z=4.7$, $p<0.001$). При этом, количество ответов в условиях совместной деятельности было значимо меньше, чем при индивидуальном выполнении, как в творческом ($Z=4.6$, $p<0.001$), так и в нетворческом ($Z=4.7$, $p<0.001$) заданиях.

Таблица 1. Поведенческие результаты выполнения заданий индивидуально и в условиях сотрудничества (Ме, 25–75Q).

Показатель	Индивидуально	В сотрудничестве
Творческое задание		
Время ответа (мс)	1992 (1518–2305)	1952 (1661–2504)
Кол-во ответов (%)	59 (43–72)	39 (27–51)
Субъективная сложность (от 1 до 10)	6 (4–8)	5.5 (4–7)
Субъективная оценка эмоций (от -10 до 10)	4 (0–6)	4 (1–6)
Нетворческое задание		
Время ответа (мс)	1691 (1221–1901)	1829 (1482–2032)
Кол-во ответов (%)	87 (76–93)	60 (55–75)
Субъективная сложность (от 1 до 10)	2.5 (2–4)	3 (1–5)
Субъективная оценка эмоций (от -10 до 10)	5 (2–6)	5 (3–7)

Время ответа в творческом задании было значимо больше, чем в нетворческом — и при индивидуальной деятельности ($Z=3.8$, $p<0.001$), и в условиях сотрудничества ($Z=3.6$, $p<0.001$). При этом время ответа как в творческом, так и в нетворческом заданиях не отличалось между условиями индивидуального и совместного выполнения.

Творческое задание было значимо сложнее, чем нетворческое — как в условиях индивидуального выполнения ($Z=4.3$, $p<0.001$), так и в условиях сотрудничества ($Z=3.7$, $p<0.001$). Эмоции были более положительными при нетворческой деятельности индивидуально ($Z=2.3$, $p<0.02$) и в условиях сотрудничества ($Z=2.5$, $p<0.02$). Не выявлено различий субъективной сложности и самооценки возникающих эмоций при выполнении и творческого и нетворческого заданий между условиями сотрудничества и индивидуального выполнения.

Различия амплитуд ВП при выполнении творческого и нетворческого заданий в условиях сотрудничества и индивидуального выполнения

При выполнении творческого задания в условиях сотрудничества по сравнению с индивидуальным выполнением выявлена меньшая амплитуда компонента вызванных потенциалов P200 в лобных и цен-

тральных областях на интервале 148–272 мс после начала предъявления стимула. Взаимодействие факторов ЗОНА × УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(14, 812)} = 5.8$, $e(G-G) = 0.17$, $p < 0.002$. Зоны различий, согласно апостериорному анализу: F3, Fz, F4, C3, C4, Pz. Помимо этого выполнение творческого задания в условиях сотрудничества характеризуется большей амплитудой волны вызванного потенциала в позднем временном интервале 662–1240 мс в области интереса — задне-

височных и затылочных областях билатерально (T5, T6, O1, O2), эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1, 58)} = 4.2$, $p < 0.05$ (рис. 1).

Выполнение нетворческого задания в условиях сотрудничества по сравнению с индивидуальным выполнением характеризовалось уменьшением амплитуды компонента вызванных потенциалов P200 в лобных и центральных областях на интервале 148–272 мс после начала предъявления стимула. Взаимодействие факто-

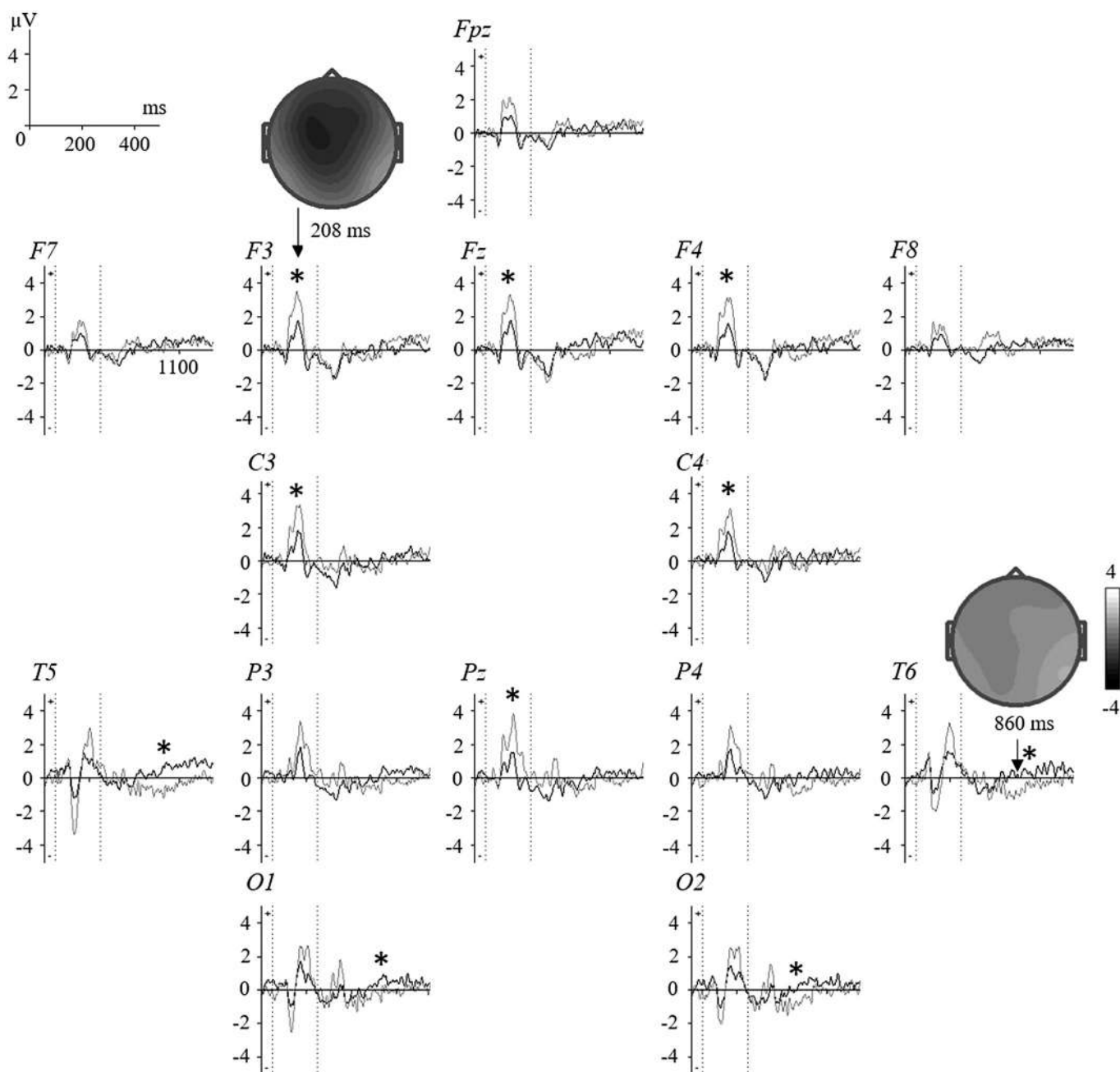


Рис. 1. Вызванные потенциалы при выполнении творческого задания в условиях сотрудничества в паре (черная линия) и индивидуально (серая линия). Обозначения: Fpz–O2 — расположение электродов. Для каждого электрода по оси x — время после предъявления первого стимула (мс); по оси y — амплитуда ВП (мкВ). Вертикальные пунктирные линии обозначают начало и конец предъявления стимула (длительность стимула 400 мс). Положительная полярность (плюс) — вверх. Звездочками отмечены электроды и компоненты ВП, амплитуда которых значимо различалась между условиями. Топограммы представляют распределение амплитуд в обозначенный момент времени внутри интервалов различий.

ров ЗОНАх УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(14, 812)} = 4.3$, $e(G-G) = 0.16$, $p < 0.02$. Зоны различий, согласно апостериорному анализу: F3, Fz, F4, C3, C4 (рис. 2).

личества ответов: в творческом задании с 59% до 39%, в нетворческом задании — с 87% до 60% в среднем по группе. Можно заключить, что поставленные условия сотрудничества не увеличили продуктивность деятельности в паре участников и самым очевидным здесь будет ситуация, когда испытуемые слышали ответы друг друга и не могли предложить такое же решение в условиях поставленной инструкции “совместно предложить

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполнение заданий в условиях социального взаимодействия приводило к значимому уменьшению ко-

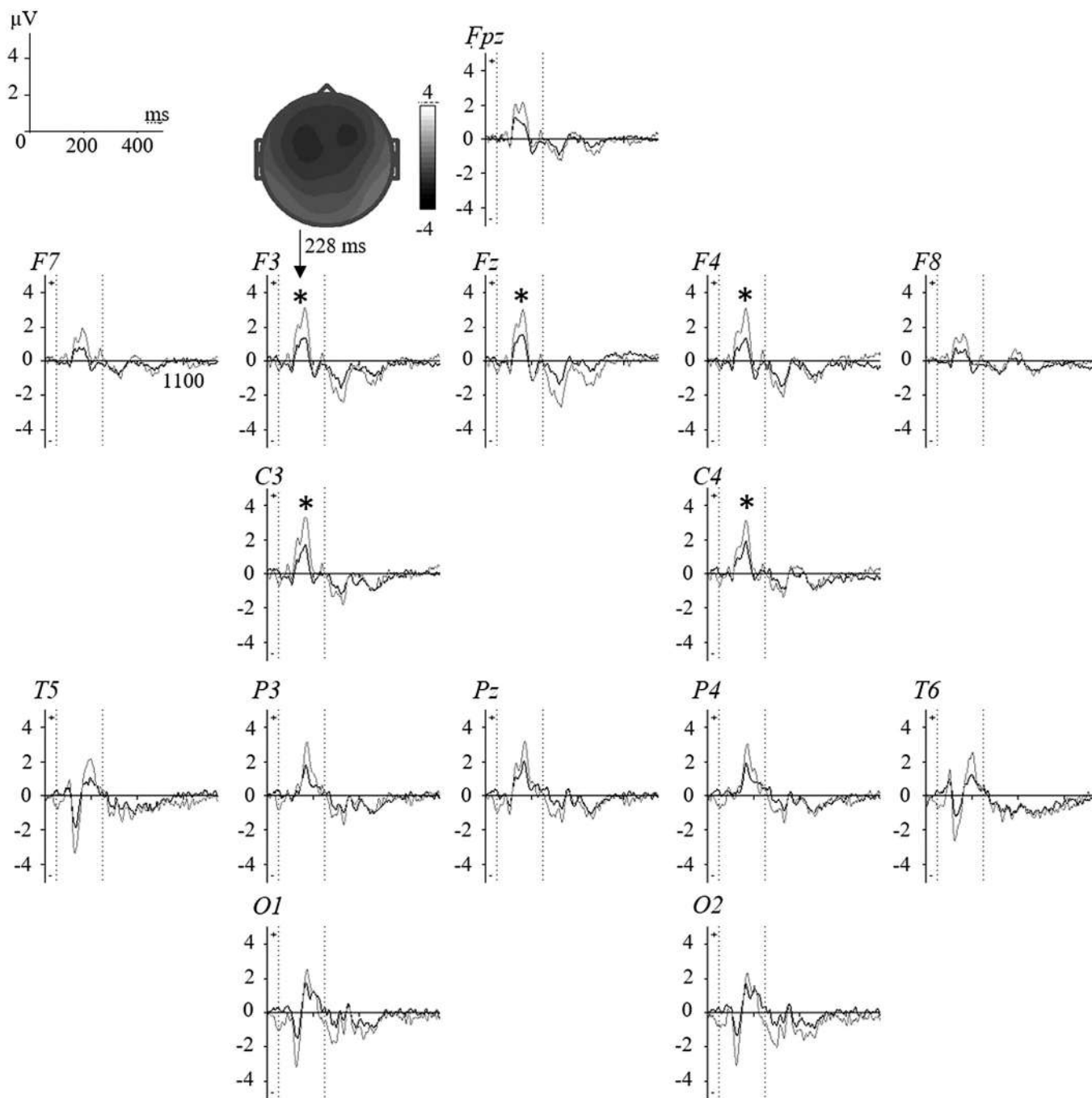


Рис. 2. Вызванные потенциалы при выполнении нетворческого задания в условиях сотрудничества в паре (черная линия) и индивидуально (серая линия). Обозначения: Fpz-O2 — расположение электродов. Для каждого электрода по оси x — время после предъявления первого стимула (мс); по оси y — амплитуда ВП (мкВ). Вертикальные пунктирные линии обозначают начало и конец предъявления стимула (длительность стимула 400 мс). Положительная полярность (плюс) — вверх. Звездочками отмечены электроды и компоненты ВП, амплитуда которых значимо различалась между условиями. Топограмма представляет распределение амплитуд в обозначенный момент времени внутри интервалов различий.

как можно больше решений”. При этом, время ответа не отличалось в условиях сотрудничества от индивидуального выполнения, что может свидетельствовать об отсутствии смены стратегии при придумывании ответа в условиях совместной деятельности: испытуемые, по-видимому, обозначали наличие ответа сразу, как он был найден — как при работе индивидуально, так и в паре. Различий сложности и субъективной оценке эмоций при выполнении заданий в условиях сотрудничества по сравнению с индивидуальным выполнением не наблюдалось. При этом, необходимо отметить совпадение субъективной и объективной оценок сложности заданий: объективно в творческом задании наблюдается большее время ответа и меньшее количество ответов, по сравнению с нетворческим и субъективно участники оценивали это задание, как более трудное для выполнения (табл. 1). Творческая деятельность часто оценивается, как более сложная [15]: в исследовании [16] семантическая дистанция между найденными аналогиями коррелировала с субъективной трудностью задания; в исследовании [17] у более творческих участников при дивергентном мышлении (выполнении теста альтернативного использования) наблюдается большая активация симпатической системы, как показателя больших усилий по данным реокардиографии. Тем не менее, ранее было показано, что нейрофизиологические корреляты творческой деятельности сходны при сравнении как с более “легким” контрольным заданием, так и со сбалансированным по сложности контрольным нетворческим заданием [15], что позволяет сравнивать творческое и контрольное задания вне зависимости от их субъективной сложности. В данном исследовании мы сравниваем ВП отдельно при творческой и нетворческой деятельности, в условиях сотрудничества и индивидуального выполнения, которые не отличались между собой по уровню субъективной сложности заданий. По одному из объективно оцениваемых показателей сложности задания — количеству ответов — условия сотрудничества усложняли деятельность, однако другой показатель объективной сложности заданий — время нахождения ответа — в условиях сотрудничества не изменялся, также, как и субъективные оценки сложности задания. Поэтому рассматриваемые далее различия вызванных потенциалов мы соотносим именно с модулирующим влиянием фактора социальных взаимодействий в условиях сотрудничества, нежели с общим показателем сложности задания.

Уровень кооперативности поведения партнера при выполнении творческого задания в паре была оценена на 6 (5–8) баллов из 10, при выполнении нетворческого задания — на 7 (5–8) баллов из 10, оцененный уровень собственного кооперативного поведения не отличался от уровня кооперативного поведения партнера: 6 (4–8) в творческом задании и 7 (5–8) — в нетворческом задании. Можно заключить, что участники, в целом, были настроены на просоциальное поведение в заданных условиях сотрудничества.

При сравнении ВП во время выполнения творческого и нетворческого заданий в условиях сотрудничества и индивидуального выполнения — наблюдается уменьшение амплитуды компонента P200 (148–172 мс после начала предъявления стимула) — как в творческом, так и в нетворческом задании. Такой же эффект уменьшения амплитуд перцептивных компонентов ВП наблюдался и при выполнении заданий в условиях соревнования [3], в исследовании, проведенном в такой же парадигме, но с заданными условиями соревнования. Амплитуда компонента P200 связана с механизмами внимания и может коррелировать с лучшим выполнением когнитивного задания. Например, амплитуда P200 при предъявлении второго стимула в паре отрицательно коррелирует с количеством ложно-положительных ошибок в тесте отсроченного узнавания пятизначных чисел [18]. Так, включение новых слов из второго (неродного) языка в мультимодальное представление приводило к последующему (при тестировании через неделю) увеличению амплитуды P200 при их предъявлении в задачах определения корректности фраз и сопровождалось лучшим выполнением задания оценки корректности утверждения, включающего это слово [19]. Амплитуда компонента P200 выше при восприятии новых метафор по сравнению с общеупотребительными метафорами, что авторами связывается с большим вовлечением внимания при восприятии менее знакомых фраз [20]. В нашем исследовании, меньшая амплитуда компонента P200 в условиях социального взаимодействия, по-видимому, связана с перераспределением ресурсов внимания от выполнения задачи к оценке прошлых ответов партнера и восприятию невербальных сигналов его поведения, например, ожидание нажатия на кнопку партнером. В творческом задании помимо меньшей амплитуды компонента P200 в условиях сотрудничества, характерной и для творческого, и для нетворческого заданий, наблюдались большие значения амплитуд в позднем временном интервале 662–1240 мс в задневисочных и затылочных отведениях (T5, T6, O1, O2). Данные зоны различий могут соотноситься с активностью височно-теменного соединения (temporo-parietal junction), одной из зон, относящихся наряду с медиальной префронтальной корой к сети ментализации, т. е. понимания состояний и намерений другого [21–23]. Височно-теменное соединение (особенно правого полушария) участвует в различных процессах, включая мультисенсорную интеграцию, социальное познание, чувство субъектности и направленное к стимулу внимание [24]. Мы предполагаем, что большая амплитуда вызванных потенциалов в этих областях при выполнении творческого задания в условиях сотрудничества связана с прогнозированием поведения и ответов партнера. В исследовании [25] увеличение мощности ЭЭГ в бета-диапазоне в правой височно-теменной области коррелировало со способностью участников прогнозировать предпочтения другого человека в фильмах.

Большее влияние условий социального взаимодействия на мозговые корреляты творческой деятельности (при сопоставлении с нетворческой) наблюдалось и в исследовании условий соревнования, проведенного нами ранее [3]. В целом, условия соревнования в большей степени влияли на вызванные потенциалы при творческой и контрольной деятельности, отражаясь в уменьшении амплитуд (в абсолютных значениях) как компонентов, связанных с вниманием (P1, P2), так и поздних компонентов, связанных с семантической обработкой стимулов (N400, P600). Тогда как в условиях сотрудничества только амплитуда компонента P200 и поздних волн (в творческом задании) модулировалась социальными взаимодействиями. При сопоставлении результатов наших исследований можно предположить, что условия соревнования в большей степени влияют на перестройку мозговых механизмов когнитивной деятельности, чем условия сотрудничества. Это, отчасти, соотносится с данными о большей активации ряда областей мозга при соперничестве в сравнении с сотрудничеством при социальном взаимодействии. В исследовании [26] при решении “дилеммы заключенного” общая синхронизация активности мозга была выше в условиях соревнования, чем при сотрудничестве. В исследовании [27] при соревновании наблюдалась большая мощность в бета-диапазоне ЭЭГ, чем при сотрудничестве в игре “ястребы и голуби”. Одним из факторов, который может быть рассмотрен в дальнейшем в контексте влияния условий социальных взаимодействий на нейрофизиологические показатели при совместной творческой деятельности — это пол участников. В данном исследовании группа участников состояла, в основном, из женщин, и на эффективность их деятельности могли повлиять гормональные факторы. Как было показано в исследовании [28], эффективность когнитивной и творческой деятельности, а также уровень психоэмоционального напряжения у женщин зависит от фазы менструального цикла. Можно предположить и различия в просоциальном поведении в зависимости от гормонального статуса, так как эмоциональная регуляция у женщин также связана с фазами цикла [28–31]. В наших исследованиях мы сравниваем между собой задания (творческие и контрольные, в условиях социального взаимодействия и индивидуально), проводимые в один день, тем самым снижая внутрисубъектную вариабельность поведенческих и нейрофизиологических характеристик между заданиями, но межсубъектная вариабельность может быть отчасти обусловлена нейрогоморальным состоянием участниц.

Таким образом, в условиях сотрудничества, ориентированного на предложение большего количества ответов значимо уменьшается индивидуально данное количество ответов при творческой и нетворческой деятельности (в сравнении с одиночным выполнением задания), но не изменяются субъективные характеристики деятельности (ее сложность и эмоциональная окраска). Основное влияние условия сотрудничества оказыва-

ют на компонент ВП, связанный с вниманием (P200, 148–272 мс), уменьшая его амплитуду, вне зависимости от творческого характера деятельности. Творческая деятельность в условиях сотрудничества сопровождается увеличением амплитуды в позднем временном интервале 662–1240 мс по сравнению с индивидуальным выполнением в областях, соотносимых с активностью системы ментализации и понимания субъективного состояния партнера и прогнозирования его действий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории: Васенькиной Виктории Андреевне, Грохотовой Анне Вадимовне — за участие в проведении исследования, регистрации и предобработке файлов ЭЭГ и самоотчетов испытуемых.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Вклад авторов: идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Ш.), обработка и анализ данных (Н.В.Ш., Ж.В.Н.), написание и редактирование рукописи (Н.В.Ш., Ж.В.Н.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры исследования соответствовали этическим нормам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующих изменений. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (протокол № 1–02, от 02.02.2022 г.). Участие в исследовании было добровольным, участники давали информированное согласие после ознакомления с процедурой и целями исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22–28–02012).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hu Y, Pan Y, Shi X, Cai Q, Li X, Cheng X (2018) Inter-brain synchrony and cooperation context in interactive decision making. *Biol Psychol* 133:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2017.12.005>
2. Washburn A, Román I, Huberth M, Gang N, Dauer T, Reid W, Nanou C, Wright M, Fujioka T (2019) Musical Role Asymmetries in Piano Duet Performance Influence Alpha-Band Neural Oscillation and Behavioral Synchronization. *Front Neurosci* 13:1088. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01088>

3. Nagornova ZV, Shemyakina NV (2023) Impact of Competitive Conditions on Amplitudes of Event-Related Potentials during Verbal Creative and Noncreative Task Performance. *J Evol Biochem Phys* 59:33–44.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010039>
4. Rice K, Redcay E (2016) Interaction matters: A perceived social partner alters the neural processing of human speech. *Neuroimage* 129:480–488.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.041>
5. Czeszumski A, Eustergerling S, Lang A, Menrath D, Gerstenberger M, Schuberth S, Schreiber F, Rendon ZZ, König P (2020) Hyperscanning: A Valid Method to Study Neural Inter-brain Underpinnings of Social Interaction. *Front Hum Neurosci* 14:39.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00039>
6. Lindenberger U, Li SC, Gruber W, Müller V (2009) Brains swinging in concert: cortical phase synchronization while playing guitar. *BMC Neurosci* 10:22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-22>
7. Sänger J, Müller V, Lindenberger U (2012) Intra- and interbrain synchronization and network properties when playing guitar in duets. *Front Hum Neurosci* 6:312.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2012.00312>
8. Shemyakina NV, Nagornova ZV (2021) Neurophysiological Characteristics of Competition in Skills and Cooperation in Creativity Task Performance: A Review of Hyperscanning Research. *Hum Physiol* 47:87–103.
<https://doi.org/10.1134/S0362119721010126>
9. Lu K, Xue H, Nozawa T, Hao N (2019) Cooperation Makes a Group be More Creative. *Cereb Cortex* 29:3457–3470.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhy215>
10. Guilford JP (1967) *The Nature of Human Intelligence*. McGraw-Hill, New York.
11. Vigário RN (1997) Extraction of ocular artifacts from EEG using independent component analysis. *EEG and Clin Neurophysiol* 103:395–404.
[https://doi.org/10.1016/s0013-4694\(97\)00042-8](https://doi.org/10.1016/s0013-4694(97)00042-8)
12. Jung TP, Makeig S, Humphries C, Lee TW, McKeown MJ, Iragui V, Sejnowski TJ (2000) Removing electroencephalographic artifacts by blind source separation. *Psychophysiology* 37: 163–178.
<https://doi.org/10.1111/1469-8986.3720163>
13. Tereshchenko EP, Ponomarev VA, Kropotov YuD, Müller A (2009) Comparative efficiencies of different methods for removing blink artifacts in analyzing quantitative electroencephalogram and event-related potentials. *Hum Physiol* 35:241–247.
<https://doi.org/10.1134/S0362119709020157>
14. Greenhouse SW, Geisser S (1959) On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika* 24: 95–112.
15. Danko SG, Shemyakina NV, Nagornova ZV, Starchenko MG (2009) Comparison of the effects of the subjective complexity and verbal creativity on EEG spectral power parameters. *Hum Physiol* 35:381–383.
<https://doi.org/10.1134/S0362119709030153>
16. Green AE, Kraemer DJ, Fugelsang JA, Gray JR, Dunbar KN (2012) Neural correlates of creativity in analogical reasoning. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 38:264–272.
<https://doi.org/10.1037/a0025764>
17. Silvia PJ, Beaty RE, Nusbaum EC, Eddington KM, Kwapil TR (2014) Creative motivation: creative achievement predicts cardiac autonomic markers of effort during divergent thinking. *Biol Psychol* 102:30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2014.07.010>
18. Lijffijt M, Lane SD, Meier SL, Boutros NN, Burroughs S, Steinberg JL, Moeller FG, Swann AC (2009) P50, N100, and P200 sensory gating: relationships with behavioral inhibition, attention, and working memory. *Psychophysiology* 46:1059–1068.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2009.00845.x>
19. Boustani N, Pishghadam R, Shayesteh S (2021) Multisensory Input Modulates P200 and L2 Sentence Comprehension: A One-Week Consolidation Phase. *Front Psychol* 12:746813.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.746813>
20. Sun L, Chen H, Zhang C, Cong F, Li X, Hämäläinen T (2022) Decoding brain activities of literary metaphor comprehension: An event-related potential and EEG spectral analysis. *Front Psychol* 13:913521.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.913521>
21. Van Overwalle F, Baetens K (2009) Understanding others' actions and goals by mirror and mentalizing systems: a meta-analysis. *Neuroimage* 48:564–584.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.06.009>
22. Vogeley K (2017) Two social brains: neural mechanisms of intersubjectivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372:20160245.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0245>
23. Heleven E, Van Overwalle F (2018) The neural basis of representing others' inner states. *Curr Opin Psychol* 23:98–103.
<https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2018.02.003>
24. Eddy CM (2016) The junction between self and other? Temporo-parietal dysfunction in neuropsychiatry. *Neuropsychologia* 89:465–477.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2016.07.030>
25. Park J, Kim H, Sohn JW, Choi JR, Kim SP (2018) EEG Beta Oscillations in the Temporoparietal Area Related to the Accuracy in Estimating Others' Preference. *Front Hum Neurosci* 12:43.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00043>
26. Babiloni F, Astolfi L, Cincotti F, Mattia D, Tocci A, Tarantino A, Marciani M, Salinari S, Gao S, Colosimo A, De Vico Fallani F (2007) Cortical activity and connectivity of human brain during the Prisoner's dilemma: an EEG hyperscanning study. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2007:4953–4956.
<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2007.4353452>
27. Astolfi L, Cincotti F, Mattia D, De Vico Fallani F, Salinari S, Vecchiato G, Toppi J, Wilke C, Doud A, Yuan H, He B, Babiloni F (2010) Imaging the social brain: multi-subjects EEG recordings during the “Chicken's game”. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2010:1734–1737.
<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2010.5626708>
28. Bazanova OM, Kondratenko AV, Kuz'minova OI, Muravleva KB, Petrova SE (2013) Cognitive efficiency and psychoemotional tension in the various menstrual cycle phases [In Russ] *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 99:820–829.

29. Yamazaki M, Tamura K (2017) The menstrual cycle affects recognition of emotional expressions: an event-related potential study. *F1000Res* 6:853. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11563.1>
30. Mulligan EM, Nelson BD, Infantolino ZP, Luking KR, Sharma R, Hajcak G (2018) Effects of menstrual cycle phase on electrocortical response to reward and depressive symptoms in women. *Psychophysiology* 55: e13268. <https://doi.org/10.1111/psyp.13268>
31. Sellitto M, Kalenscher T (2022) Variations in progesterone and estradiol across the menstrual cycle predict generosity toward socially close others. *Psychoneuroendocrinology* 140:105720. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105720>

INFLUENCE OF COOPERATION ON THE EVENT-RELATED POTENTIALS IN VERBAL CREATIVE AND NONCREATIVE TASKS PERFORMANCE

Zh. V. Nagornova^{a, #} and N. V. Shemyakina^{a, ##}

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

[#] *e-mail: nagornova_zh@mail.ru*

^{##} *e-mail: shemyakina_n@mail.ru*

This study examines the effects of social interaction conditions on brain correlates of verbal creativity. A model of cooperation is considered in the study in which participants were to work together without conferring and create as many answers as possible in creative and non-creative tasks. Subjects (4 males, 26 female) performed two types of tasks individually and cooperatively in pairs (male-male, female-female): creative task – to create as many as possible unusual use of an everyday object, and non-creative task – to list items from the proposed categories. Event-related potentials (ERPs) in each of the tasks were compared between the cooperative and individual performance conditions. The cooperative conditions demonstrated decrease in the amplitude of the P200 component at a time interval of 148–272 ms from the onset of stimulus presentation for both creative and non-creative tasks performance, reflecting reduced attention allocation to the stimulus in the social interaction condition. When performing a creative task, a larger amplitude of the late positive component was observed in the 662–1240 ms interval in the posterior temporal and occipital areas, which may reflect activation of the temporo-parietal junction involved in the processes of understanding the other. The number of answers (productivity) was significantly lower in cooperative conditions compared to individual task performance.

Keywords: EEG, event-related potentials (ERP), verbal creativity, cooperation, social interactions, alternative uses test, P200

ИЗМЕНЕНИЯ В ТАКСОНОМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА И ИХ СВЯЗЬ С БИОСИНТЕЗОМ И МЕТАБОЛИЗМОМ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В У ДЕТЕЙ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

© 2024 г. И. Н. Абдурасулова^{1,*}, Е. А. Чернявская¹, В. А. Никитина¹,
А. Б. Иванов², В. И. Людыно¹, А. А. Нартова¹, А. В. Мацулевич¹,
Е. Ю. Скрипченко³, Г. Н. Бисага⁴, В. И. Ульянов², А. В. Дмитриев¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Детский Научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, России

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принята к публикации 30.11.2023 г.

Рассеянный склероз (РС) — хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание, характеризующееся прогрессирующей демиелинизацией, приводящей к гибели нейронов центральной нервной системы. Заболевание обычно манифестирует у людей в возрасте 20–40 лет, но в последние годы наблюдается увеличение числа случаев с дебютом в РС детском возрасте. Мы предполагаем, что это может быть связано с особенностями состава кишечной микробиоты и ее способностью продуцировать витамины группы В. Цель исследования: выявить изменения состава кишечного микробиома в дебюте рассеянного склероза у детей и взрослых и оценить потенциал кишечного микробиома метаболизировать и синтезировать витамины группы В. В исследовании приняли участие 15 детей (9–17 лет), 15 взрослых, у которых РС манифестировал в детском возрасте и 14 взрослых старше 37 лет с длительностью РС менее 1 года. Состав кишечного микробиома определяли методом секвенирования гена 16S рРНК на платформе Illumina с универсальными праймерами на переменный участок гена 16S рРНК V3-V4. Для прогнозирования наличия путей метаболизма витаминов группы В в кишечном микробиоме применяли алгоритм PICRUST с использованием базы данных эталонных геномов KEGG. Установлено, что у детей в дебюте РС происходят специфические изменения микробиома, отличные от изменений у взрослых. Эти изменения включают снижение альфа-разнообразия, а также редукцию доминантных филумов и увеличение *p_Verrucomicrobiota* и *p_Mycoplasmata*, что сопровождалось уменьшением числа бактериальных генов, вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза витаминов В1, В2, В3, В5 и В12. Такие изменения могут быть связаны с ранним проявлением симптомов РС у детей. Полученные результаты подчеркивают важность дальнейшего изучения влияния кишечного микробиома и его метаболического потенциала на развитие и прогрессирование РС, особенно в детском возрасте, а также могут способствовать разработке современных более эффективных методов лечения и профилактики этого демиелинизирующего заболевания.

Ключевые слова: педиатрический рассеянный склероз, кишечная микробиота, кишечный микробиом, витамины группы В

DOI: 10.31857/S0044452924010098, **EDN:** ZFBBNV

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) — аутоиммунное нейродегенеративное заболевание, связанное с хроническим воспалением центральной нервной системы (ЦНС), приводящим к демиелинизации, повреждению аксонов и гибели нейронов. Заболевание манифестирует обычно у молодых людей в возрасте 20–35 лет, в 6–10% случаев — в возрасте

до 18 лет и чаще (2:1) встречается у женщин, чем у мужчин [1]. Симптомы и активность заболевания могут быть переменными. Известно, что существует генетическая предрасположенность к заболеванию, которая реализуется при действии неблагоприятных средовых факторов, среди которых наиболее значимая ассоциация показана для некоторых вирусных инфекций, дефицита витамина D,

“западного типа диеты”, ожирения в подростковом возрасте, стрессов, курения [2–6].

На сегодняшний день для лечения пациентов с различными типами течения РС разработано около 16 иммуномодулирующих препаратов, мишенью которых являются Т и В клетки, однако они лишь замедляют прогрессирование заболевания и наступление необратимой инвалидности. Многие препараты “второй линии” могут вызывать серьезные нежелательные явления, и их применение сопряжено с оценкой соотношения польза / риск [7]. Учитывая, что отмечается тенденция к увеличению числа случаев, когда заболевание развивается в детском и подростковом возрасте (педиатрический РС), изучение причин раннего начала заболевания и разработка методов щадящей терапии представляется актуальной задачей.

Педиатрический РС (ПРС) определяется как РС с дебютом в возрасте до 16 лет, в ряде стран, включая Россию – до 18 лет. У 97–99% детей с ПРС отмечается ремиттирующий тип течения РС [8]. Большинство исследований, посвященных изучению педиатрического РС являются наблюдательными [9]. Предполагается, что факторы риска или триггеры развития РС ранней (до 18 лет) манифестации заболевания могут иметь особенности [10]. Известно, что дефицит витаминов группы В сопровождается развитием неврологических симптомов, которые также характерны для рассеянного склероза [11]. Ранее сообщалось о наличии дефицита витаминов группы В у пациентов с РС [12] и было показано влияние дефицита витаминов группы В на развитие и прогрессирование РС [13]. Эти витамины могут подавлять воспаление и являются модуляторами ремиелинизации, а также необходимы для правильного функционирования циклов метионина и фолиевой кислоты, продукции моноаминоксидазы, процессов метилирования, репликации ДНК [14–17]. Однако нет единого мнения о роли витаминов группы В в патогенезе РС и большинство исследований рассматривает роль витамина D в развитии обострений и формирования характера течения заболевания.

В настоящее время возобновился интерес к исследованию возможной связи дефицита витаминов группы В с развитием / прогрессированием РС, в частности в связи с ролью кишечной микробиоты как продуцента витаминов этой группы.

Исследования последнего десятилетия показали, что существенную роль в патогенезе многих заболеваний ЦНС, в том числе и при РС, играют структурно-функциональные нарушения кишечной микробиоты (дисбиоз) с возрастанием доли родов *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Methanobrevibacter*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* и уменьшением — *Bacteroides*, *Prevotella*, *Collinsella*, а также *Faecalibac-*

terium, *Roseburia* и других бутират-продуцирующих бактерий [18].

Кишечная микробиота играет ключевую роль в метаболизме питательных веществ и синтезе метаболитов, модулирующих разные аспекты жизнедеятельности хозяина [19–21]. Важными метаболитами, продуцируемыми микробиотой, являются витамины (в том числе, В6, В9, В12), поскольку млекопитающие не способны их синтезировать и должны получать из экзогенных источников, включая пищевые источники и микробиоту кишечника [22]. Известно, что бактерии, распространенные в дистальном отделе кишечника, такие как *Bacteroides*, *Bifidobacterium* и *Enterococcus*, синтезируют витамины группы В [23]. Эти бактериальные таксоны в разной степени способны продуцировать витамины группы В [24], поэтому недостаточная продукция витаминов группы В измененным микробным сообществом в ЖКТ [25], наряду с возрастанием доли бактериальных видов-потребителей витаминов может создавать дефицит этих незаменимых микронутриентов. Это определяет необходимость понимания относительного вклада кишечной микробиоты в общий гомеостаз витаминов группы В в организме и последствий, которые оказывают изменения состава микробиома при РС на статус этих витаминов.

В недавнем исследовании функциональных и метаболических изменений кишечного микробиома в китайской когорте пациентов с РС [26], наряду с изменениями путей метаболизма жирных кислот, метаболизма фруктозы и маннозы, биосинтеза убихинона и других терпеноидных соединений, метаболизма аскорбата и альдарата, гликолиза / глюконеогенеза, отмечались пути метаболизма витамина В6.

Цель исследования — выявить изменения состава кишечного микробиома в дебюте рассеянного склероза у детей и взрослых и оценить потенциал кишечного микробиома метаболизировать и синтезировать витамины группы В.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты. В исследовании приняли участие 44 пациента с РС с дебютом заболевания в детском и взрослом возрасте, а также 16 здоровых добровольцев соответствующего возраста. Все совершеннолетние испытуемые подписали информированное добровольное согласие. На участие в исследовании несовершеннолетних детей согласие их родители. Материал для исследования (образцы кала) от детей поступал из ФГБУ “Детский Научно-клинический центр инфекционных болезней” ФМБА России, а материал от взрослых пациентов — из ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алма-

зова, где пациенты наблюдались или находились для уточнения диагноза. Никто из участников исследования не принимал антибиотики или пробиотики в течение последних трех месяцев.

Группы исследования. Для проведения исследования были сформированы следующие группы пациентов.

В группу (EOMS_Onset) — дебют РС в раннем возрасте вошли 15 детей и подростков в возрасте 6–18 лет с установленным диагнозом рецидивирующе-ремиттирующий рассеянный склероз (PP-PC).

Для сравнения были сформированы 2 группы взрослых пациентов с PP-PC. Критериями включения в группу EOMS_DD являлись манифестация РС в детском возрасте (6–18 лет) и длительность заболевания на момент обследования не менее 5 лет; в группу LOMS_Onset — манифестация РС (длительность до 1 года), возраст — не менее 35 лет. Характеристика групп пациентов представлена в табл. 1.

Контрольную группу составили дети и взрослые сопоставимого возраста по 8 человек. Показатели кишечного микробиома здоровых детей и взрослых между собой достоверно не различались, поэтому для повышения статистической значимости анализ данных разных групп пациентов проводился относительно объединенной контрольной группы.

Выделение ДНК микроорганизмов. Образцы стула доставлялись в лабораторию в течение 2-х часов после сбора и хранились при -80°C до проведения исследования. Выделение ДНК микроорганизмов из образцов фекалий проводили с помощью набора “ДНК-сорб-В” (ООО “Некст-Био”, СПб, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Количество ДНК стандартизировали на спектрофотометре для дальнейшего определения таксономического состава методом секвенирования гена 16S рРНК.

Секвенирование гена 16S рРНК. Для проведения метагеномного анализа бактериального сообще-

ства использовали регион V3-V4 гена 16S рРНК. Приготовление библиотеки для секвенирования проводилось в соответствии с протоколом (16S Metagenomic Sequencing Library preparation) для MiSeq, Illumina. Секвенирование полученной библиотеки проводили, используя набор парных прочтений 2×250 bp (Rapid Run) с добавлением 2% Phix в качестве контроля. Тримминг полученных ридов проводился при помощи программы “Trimming v0.3” с последующей фильтрацией химерных ридов с помощью алгоритма Uchime* (часть программы Userach v7.0). Таксономический и функциональный анализ данных проводился с использованием программы Komics-biota [27].

Определение и характеристика таксономического состава кишечного микробиома. Для определения таксономического состава образцов использовался алгоритм uclust_ref [28] и база референсных последовательностей участка 16S рРНК Greengenes v. 13.5 [29], построенная с параметром 97% сходства OTU. Для вычисления альфа-разнообразия (микробная изменчивость внутри образца) использовались две метрики: богатство и разнообразие таксонов оценивалось с помощью индекса Шеннона [30]; обильно- и слабопредставленные виды — с помощью индекса Chao1 [31]. Для оценки бета-разнообразия (микробная изменчивость между образцами) использовали показатель, вычисленный как взвешенное расстояние UniFrac между всеми парами образцов с учетом видовой близости [32].

Прогнозирование наличия метаболических путей витаминов группы В. Функциональная аннотация и прогнозирование наличия метаболических модулей и путей в образцах проводились с использованием алгоритма PICRUST [33]. Последовательности OTU из анализируемых образцов и маркерные гены из базы данных Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) были выровнены на таксономическое дерево [34]. Для вершин дерева с неизвестным содержанием генов их функциональная роль определялась на основе данных из ближай-

Таблица 1. Характеристика групп пациентов

	Группа		
	EOMS_Onset	EOMS_DD	LOMS_Onset
Количество человек (n)	15	15	14
Пол (женщины / мужчины) (%)	86.7 / 13.3	66.7 / 33.3	50 / 50
Возраст (лет)	14.0 ± 0.9	$32.7 \pm 2.1^*$	$37.1 \pm 0.7^*$
Возраст манифестации РС (лет)	13.9 ± 0.9	$15.1 \pm 0.6^{\#}$	$36.5 \pm 0.8^*$
EDSS (баллы)	3.2 ± 0.4	$4.4 \pm 0.5^{\#}$	2.1 ± 0.3
Длительность заболевания (лет)	0.6 ± 0.05	$15.3 \pm 1.7^{\#}$	0.8 ± 0.07
Использование ПИТРС n (%)	1/15 (6.7)	8/15 (53.3)*	3/14 (21.4)

Примечание. * — отличие от группы EOMS_Onset, $p < 0.05$; # — отличие от группы LOMS_Onset, $p < 0.05$.

шего общего предка в дереве. Суммарный функциональный потенциал образца и присутствующие в нем бактериальные гены метаболических путей определялись как совокупность генов, найденных в дереве.

Статистический анализ. Сравнение состава кишечного микробиома на разных таксономических уровнях в группах пациентов и здоровых добровольцев производилась с применением двустороннего теста Манна–Уитни для независимых выборок с поправкой Бонферрони на множественные сравнения с применением программных библиотек *statannot v. 0.2.3.* [35] и *mathplotlib v.3.7.1.* [36] на языке программирования Python *v. 3.8.* [37].

Определение коэффициентов корреляции Пирсона для оценки взаимосвязей между различными бактериальными филумами и метаболическими путями бактерий производилась также с использованием библиотек *statannot v. 0.2.3.* [38] и *mathplotlib v.3.7.1.* [39] на языке программирования Python *v. 3.8.* [37].

Для сравнения долей различных филумов в группах пациентов и здоровых добровольцев осуществляли с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона. Анализ проводили в онлайн-статистическом программном обеспечении *www.openepi.com* [40], *www.medstatistic.ru* [41], а также с помощью языка программирования Python [42] *v.3.8* и программных библиотек для него *numpy v. 1.24.2* [40], *scipy 1.9.1.* [41], *pandas v. 2.0.0.* [42].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения структуры кишечного микробиома

Для описания структуры кишечного микробиома используются характеристики альфа- и бета-разнообразия, отражающие видовое богатство в сообществе и межиндивидуальные различия, соответственно. Сравнение альфа-разнообразия (индексы Шеннона и Чао 1) кишечного микробиома исследуемой выборки выявило более низкие значения обоих индексов в группе EOMS_Onset по сравнению с контрольной группой и с группой EOMS_DD (рис. 1a), а анализ бета-разнообразия — показал высокую межиндивидуальную вариабельность, особенно среди пациентов с РС (рис. 1b).

При визуализации PCoA (метод главных координат) на основе таксономического состава кишечного микробиома не выявлено кластеризации точек, относящихся к разным группам. Часть точек, соответствующих пациентам, расположена в зоне “здоровых”, при этом точки, соответствующие группе EOMS_Onset, практически не перекрываются с этой зоной. Однако ни одна из групп пациентов достоверно не отличалась от контрольной группы (*test statistic 2.073053*; *p-value*

0.071). Точки, соответствующие здоровым людям, располагаются ближе друг к другу, то есть имеют большее сходство, чем у пациентов с РС, что подтверждается сравнительным анализом, выявившим различие между “здоровыми” и “больными” (*pseudo-F 4.095213*; *p-value 0.027*; *number of permutations 999*).

В кишечном микробиоме здоровых людей независимо от возраста выявлено 9 бактериальных филумов, из которых значимо доминировали два филума — *Firmicutes* (реклассифицированы в *Bacillota*) и *Bacteroidota*, в меньшем количестве присутствовали *Proteobacteria* (реклассифицированы в *Actinomycesetota*), *Verrucomicrobiota*, остальные филумы встречались в единичных образцах с низкой представленностью (рис. 2a). У всех пациентов с РС отмечалось сокращение представленности доминантных филумов с возрастанием доли минорных филумов, у 25% пациентов с РС в небольших количествах выявлялись дополнительные филумы — *Acidobacteriota*, *Lentisphaerota*, *Chloroflexota*, *Synergistota* в разных сочетаниях.

Статистически значимого сокращения численности каждого из доминантных филумов по сравнению с контрольной группой не наблюдалось ни у детей, ни у взрослых с РС, однако сокращалась их суммарная доля. Так, в контрольной группе на долю этих филумов приходилось 90–97%, а у пациентов с РС — существенно сокращалась: в группе детей с РС у 20% пациентов доля доминантных филумов была ниже 50% и почти у 30% — не превышала 65% (*p = 0.002*, $\chi^2=13.277$, по сравнению с контрольной группой), в обеих группах взрослых пациентов с РС у ~70.0% пациентов содержание этих филумов варьировало от 47.0% до 85.0% (рис. 2b).

На фоне уменьшения доли *Firmicutes* и *Bacteroidota* в структуре кишечного микробиома во всех группах РС возрастала представленность минорного филума *Verrucomicrobiota*. В обеих группах с ранней манифестацией РС (EOMS_Onset, EOMS_DD) возрастала численность *Mycoplasmata* (ранее *Tenericutes*), а у пациентов группы LOMS_Onset — *Methanoplasmata* (ранее *Euryarchaeota*) (рис. 2a). Среди наиболее представленных классов в составе кишечного микробиома исследуемой выборки встречались *Clostridia*, *Bacilli* (*p_Firmicutes*), *Bacteroidia* (*p_Bacteroidota*), *Verrucomicrobiae* (*p_Verrucomicrobiota*) и *Actinomycesetota* (*p_Actinobacteria*), но значимые изменения по сравнению с контролем отмечались только в относительной доле *Verrucomicrobiae*, которая возрастала во всех группах РС. Из менее представленных классов также во всех группах РС увеличивалась доля *Mollicutes* (*p_Mycoplasmata*) и бактерий *TM7-3* (*p_Saccharibacteria*) (рис. 3).

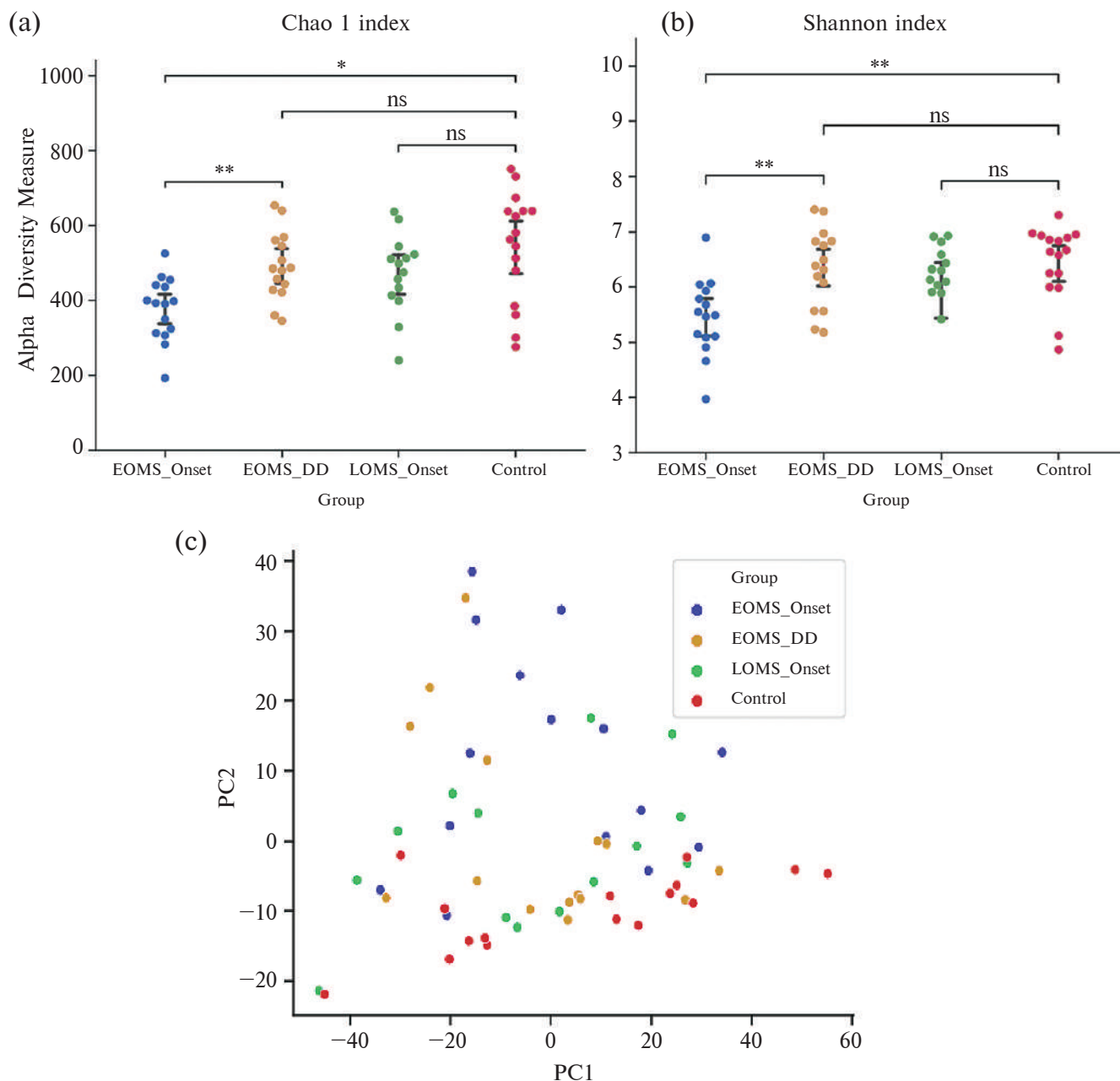


Рис. 1. Альфа- (a), (b) и бета-разнообразие (c) кишечного микробиома исследуемой выборки. (a) и (b) – Альфа-разнообразие оценивалось по индексу Chao1 (a), измеряющему богатство (число видов) и индексу разнообразия Шеннона (b) (относительное обилие различных видов). Данные представлены как медиана и 95% доверительный интервал. Различия между группами оценивались для каждого индекса разнообразия в отдельности с помощью критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$). (c) – Бета-разнообразие – Матрица расстояний между индексами разнообразия была визуализирована с помощью многомерного шкалирования (MDS) с анализом главных координат. Различия между группами оценивались с помощью пермутационного многомерного дисперсионного анализа.

На уровне семейств изменения выявлены в численности 7 таксонов. Во всех группах с PC по сравнению с контрольной группой в 2 и более раза уменьшались *Lachnospiraceae* (p_*Firmicutes*), а в группе детей с PC также сокращалась численность *Alcaligenaceae* (p_*Proteobacteria*) (рис. 4).

Относительная представленность остальных семейств при PC, напротив, возрастала: *Verrucomicrobiaceae* (p_*Verrucomicrobiaceae*) и *Actinomycetaceae*

(p_*Actinobacteria*) во всех группах, *Enterobacteriaceae* (p_*Proteobacteria*) – в обеих группах с ранним началом PC, неклассифицированные o_*Clostridiales* (p_*Firmicutes*) – у взрослых с ранним началом PC, а f_*Christensenellaceae* (p_*Firmicutes*) – у взрослых с ранним началом PC и в дебюте PC.

В среднем по группам в составе кишечного микробиома было выявлено 236 бактериальных родов, которые встречались с разной частотой в ЖКТ

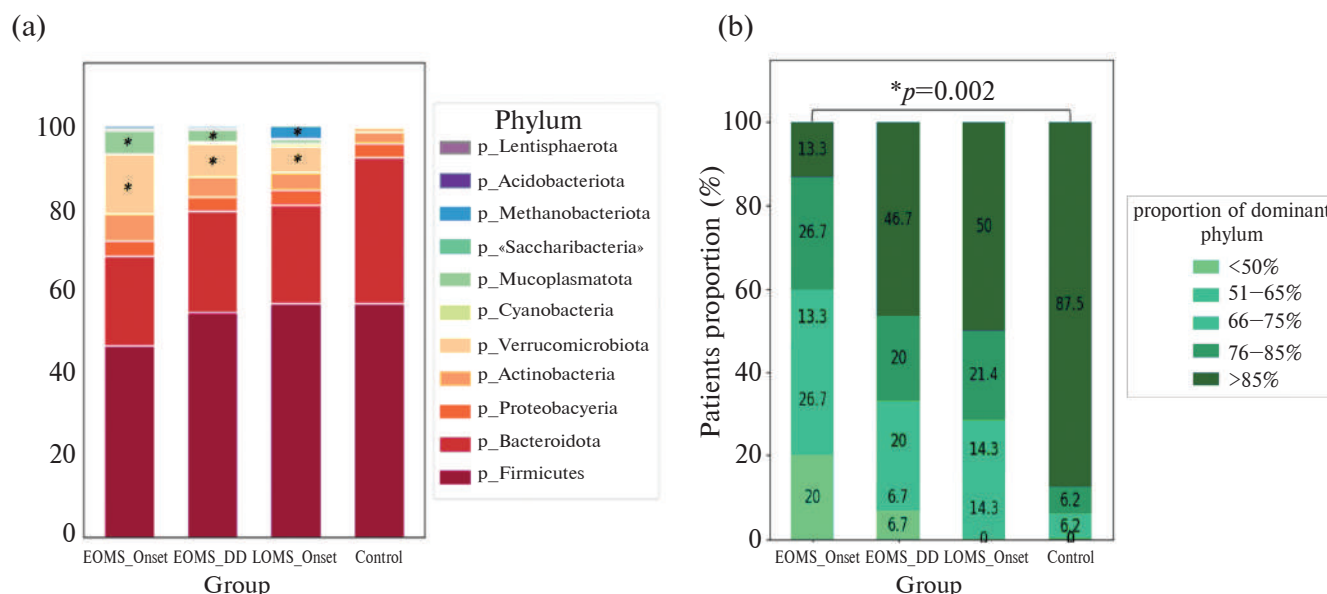


Рис. 2. Соотношение различных филумов в структуре кишечного микробиома (а) и распределение пациентов с разным содержанием доминантных филумов (б). (а) – Сравнение соотношения филумов в различных группах пациентов и здоровых добровольцев производилось с помощью теста Хи-квадрат Пирсона; * – $p < 0.05$ – отличие от контрольной группы, между группами РС отличий нет. (б) – Сравнение суммарной доли доминантных филумов (*Firmicutes* + *Bacteroidota*) проводили с помощью теста Хи-квадрат Пирсона.

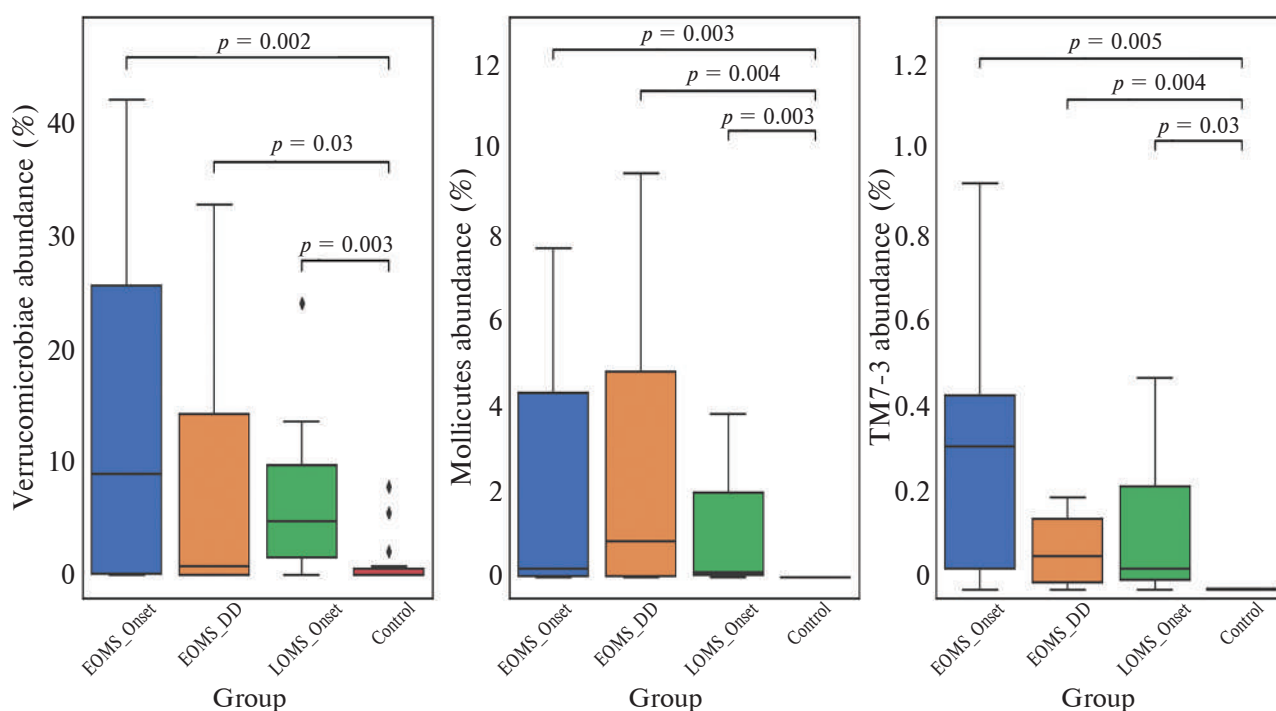


Рис. 3. Изменения кишечного микробиома на уровне классов. Данные представлены как медиана, границы прямоугольников – 1–3 квантили, границы отрезков – 95% доверительный интервал. Для сравнения использовали двусторонний Манна–Уитни тест с поправкой Бонферрони на множественность сравнений.

пациентов и у людей контрольной группы. Наиболее представленные (от 16% до 3%) рода составили *Bacteroides*, *Prevotella* (p_Bacteroidota), *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Dialister* (p_Firmicutes), *Akkermansia* (p_Verrucomicrobiota), а также неклассифицированные бактерии семейств *Ruminococ-*

caceae (реклассифицированы в *Oscillospiraceae*) и *Lachnospiraceae* (p_Firmicutes), из которых значительно от контрольной группы при РС отличались три последних.

Неклассифицированные бактерии семейств *Ruminococcaceae* и *Akkermansiaceae* возрастали в дебюте

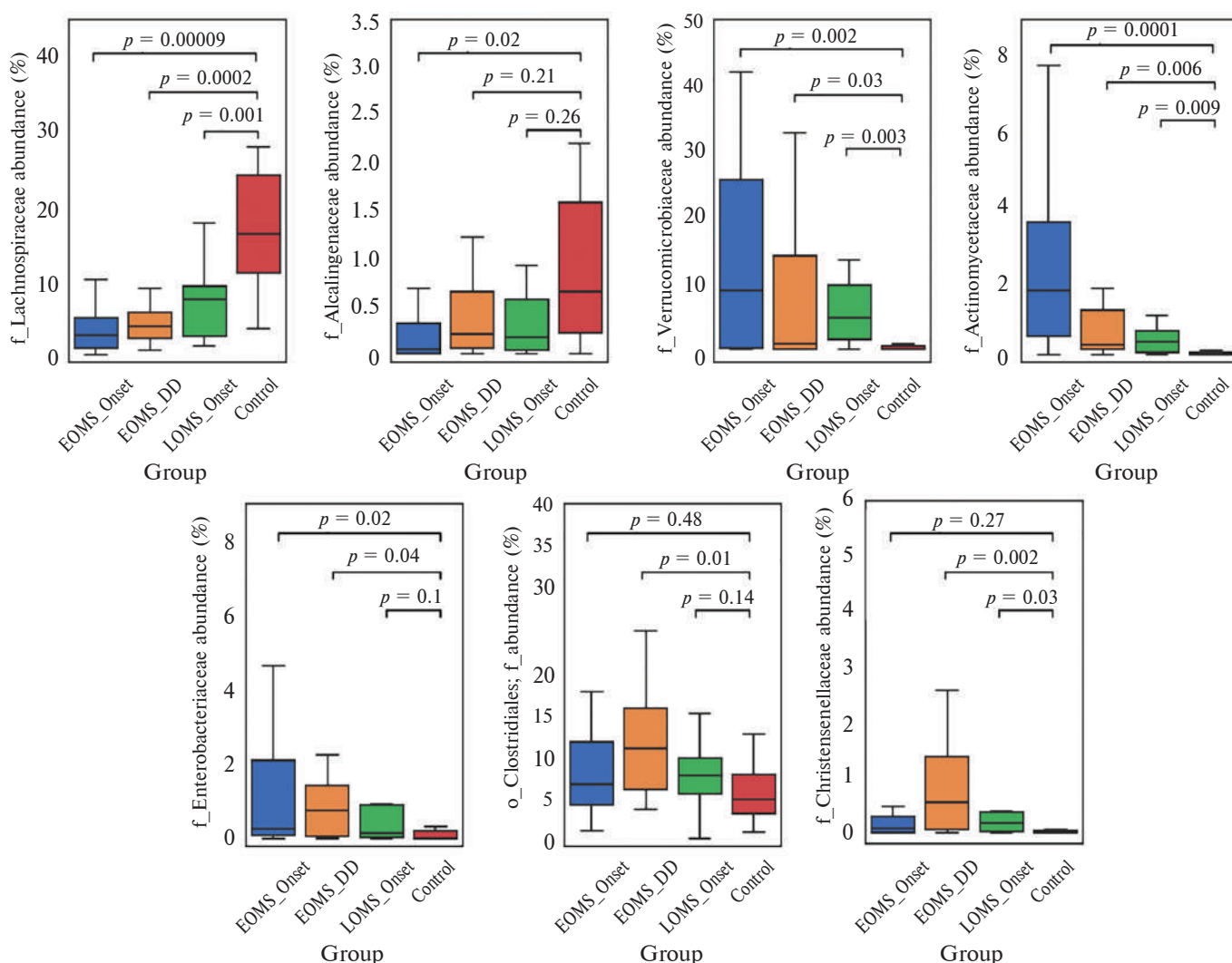


Рис. 4. Изменения кишечного микробиома на уровне семейств. Данные представлены как медиана, границы прямоугольников — 1–3 квантили, границы отрезков — 95% доверительный интервал. Для сравнения использовали двусторонний тест Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений.

РС, как у детей, так и у взрослых, а неклассифицированные бактерии семейства *Lachnospiraceae* уменьшались во всех группах РС (рис. 5). Из менее представленных родов, составлявших от 1 до 3%, во всех группах РС возрастала доля *Actinomyces* (p_*Actinobacteria*; f_*Actinomycetaceae*) и *Bulleidia* (p_*Firmicutes*; f_*Erysipelotrichaceae*), в дебюте РС увеличивалась также представленность *Atopobium* (p_*Actinobacteria*; f_*Coriobacteriaceae*), а в группах с ранним началом РС — неклассифицированные f_*Enterobacteriaceae* (p_*Proteobacteria*). Во всех группах РС была снижена представленность *Blautia* и *Coprococcus* (p_*Firmicutes*; f_*Lachnospiraceae*). *Roseburia*, *Dorea*, [*Ruminococcus*] (p_*Firmicutes*; f_*Lachnospiraceae*) и *Collinsella* (p_*Actinobacteria*; f_*Coriobacteriaceae*) — уменьшались в обеих группах с дебютом РС в детском возрасте, *Lachnobacterium* (p_*Firmicutes*; f_*Lachnospiraceae*) — у детей и взрослых в дебюте РС, у детей также сокращалась чис-

ленность *Lachnospira* (p_*Firmicutes*; f_*Lachnospiraceae*) и *Sutterella* (p_*Proteobacteria*; f_*Sutterellaceae*) (рис. 5).

Таким образом, для каждой группы был характерен свой паттерн изменений кишечного микробиома на разных таксономических уровнях. Наиболее значимые изменения кишечного микробиома отмечались в группе детей при манифестации РС.

Для того, чтобы оценить, могут ли изменения кишечного микробиома повлиять на бактериальный пул витаминов группы В, был проведен сравнительный и корреляционный анализ относительной представленности групп генов бактериальных ферментов, вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза этих витаминов, на основе реконструкции PICRUST и общедоступного ресурса Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) <https://www.genome.jp/kegg/>.

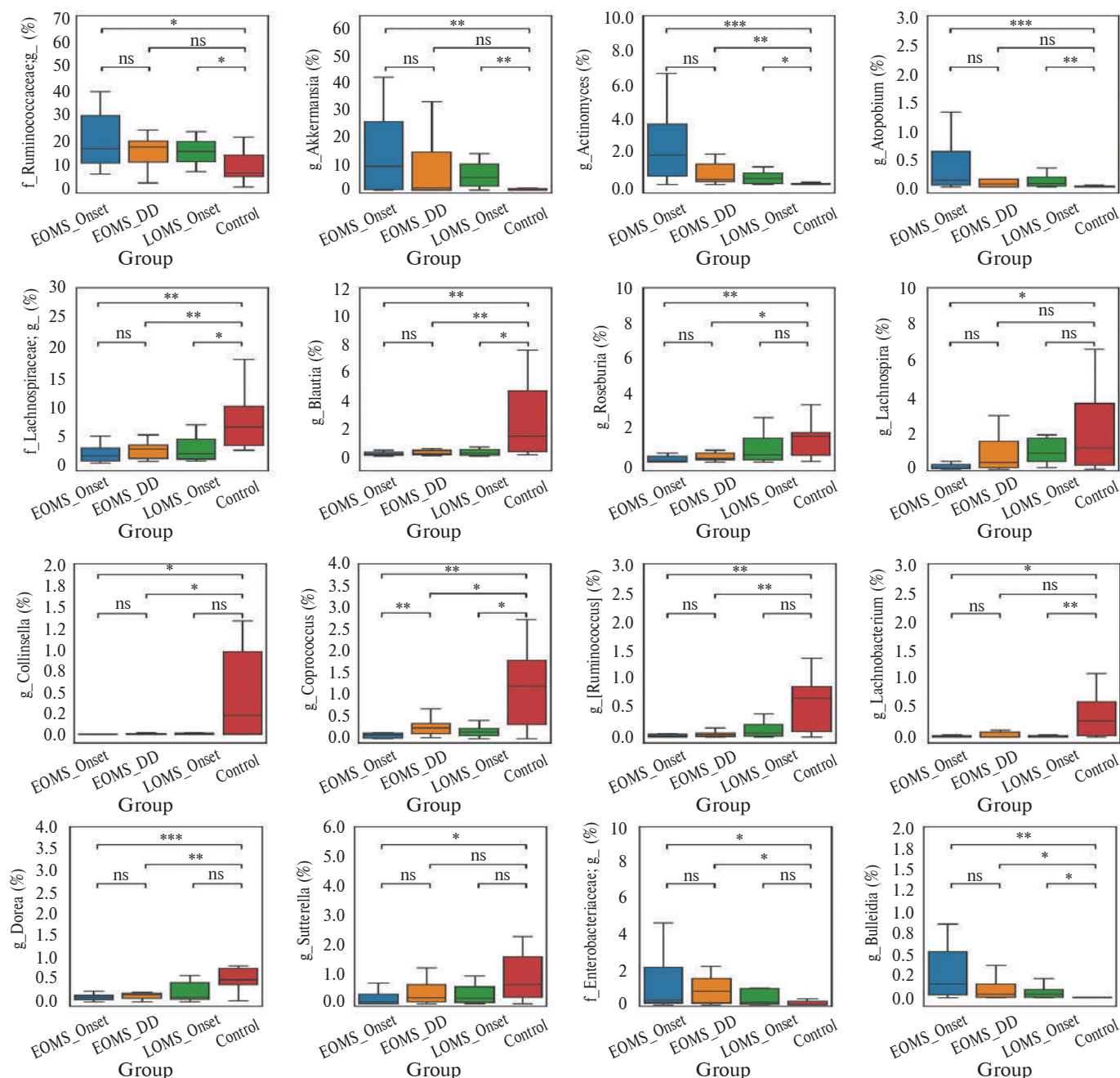


Рис. 5. Изменения кишечного микробиома на уровне родов. Данные представлены как медиана, границы прямоугольников – 1–3 квартили, границы отрезков – 95% доверительный интервал. Для сравнения использовали двусторонний тест Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений (ns: $p > 0.05$; *: $0.01 < p \leq 0.05$; **: $0.001 < p \leq 0.01$).

Анализ реконструированных бактериальных путей синтеза и метаболизма витаминов группы В

Для оценки функционального потенциала кишечного микробиома исследуемой выборки была определена относительная представленность ко (KEGG Orthology) групп генов бактериальных ферментов, связанных с путями метаболизма и биосинтеза витаминов группы В. В общей сложности в составе кишечного микробиома исследуе-

мой выборки были обнаружены бактериальные гены, которые могут вовлекаться в аннотированные в KEGG пути метаболизма и синтеза витаминов группы В, перечисленные в табл. 2.

Кроме того, в составе кишечного микробиома были найдены потенциальные гены транспортных систем витамина В1 (M00191:Thiamine transport system и M00192:Putative thiamine transport system) и витамина В12 (M00241:Vitamin B12 transport system), а также образования хоризмата, который может быть источником фолата или триптофана –

Таблица 2. Потенциальные пути метаболизма и синтеза витаминов группы В, аннотированные в KEGG, в которые может вовлекаться кишечный микробиом исследуемой выборки

Витамин	KEGG идентификатор	Название пути	Модуль пути
B1 тиамин / тиамин-пирофосфат (TPP)	ko00730	Thiamine metabolism	M00127:Thiamine biosynthesis, AIR => thiamine-P/thiamine-2P
B2 рибофлавин / флавиномононуклеотид (FMN) / флавинадениндинуклеотид (FAD)	ko00740	Riboflavin metabolism	M00125:Riboflavin biosynthesis, GTP => riboflavin/FMN/FAD
B3 ниацин / никотинамид-адениндинуклеотид (NAD) / никотинамид-адениндинуклеотидфосфат (NADP)	ko00760	Nicotinate and nicotinamide metabolism	M00115:NAD biosynthesis, aspartate => NAD
			M00622:Nicotinate degradation, nicotinate => fumarate
B5 пантотенат/кофермент А (CoA)	ko00770	Pantothenate and CoA biosynthesis	M00119:Pantothenate biosynthesis, valine/L-aspartate => pantothenate
			M00120:Coenzyme A biosynthesis, pantothenate => CoA
B6 пиридоксин / пиридоксаль / пиридоксамин / пиридоксальфосфат	ko00750	Vitamin B6 metabolism	M00124:Pyridoxal biosynthesis, erythrose-4P => pyridoxal-5P
B7 биотин	ko00780	Biotin metabolism	M00572:Pimeloyl-ACP biosynthesis, BioC-BioH pathway, malonyl-ACP => pimeloyl-ACP
			M00577:Biotin biosynthesis, BioW pathway, pimelate => pimeloyl-CoA => biotin
B9 фолиевая кислота / фолаты тетрагидрофолат (THF)	ko00790	Folate biosynthesis	M00126:Tetrahydrofolate biosynthesis, GTP => THF
	ko00670	One carbon pool by folate	
B12 кобаламин / цианкобаламин / метилкобаламин / аденозилкобаламин	ko00860	Porphyrin metabolism	M00122:Cobalamin biosynthesis, cobinamide => cobalamin

предшественника синтеза NAD (M00022: Shikimate pathway, phosphoenolpyruvate + erythrose-4P => chorismate).

Сравнение относительной представленности групп генов бактериальных ферментов, вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза витаминов группы В, показало, что у детей и подростков с РС в кишечном микробиоме присутствует более низкое количество бактериальных генов, потенциально вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза витаминов B1, B2, B3, B5 и B12, чем в контрольной группе (рис. 6).

Численность генов, вовлекаемых в пути метаболизма тиамина и биосинтеза NAD, была также ниже, у детей в дебюте РС, чем у взрослых с дебютом РС в детском возрасте (рис. 6). В обеих группах с ранней манифестацией РС в составе кишечного микробиома отмечалось увеличение численности генов транспортных систем витамина B12. В груп-

пе взрослых с ранним началом РС также отмечалась тенденция к увеличению численности генов транспортных систем витамина B1 ($p=0.05$).

Во всех группах пациентов с РС уменьшалась представленность генов путей деградации никотината, однако их доля в кишечном микробиоме незначительна (<0.01%). Только у детей в дебюте РС сокращалась представленность генов Шикиматного пути (рис. 6). Различий по сравнению с контрольной группой в представленности генов путей метаболизма и синтеза витаминов B6, B7 и B9 не наблюдалось ни в одной из групп с РС.

Таким образом, наиболее выраженные изменения в представленности бактериальных генов, вовлекаемых в пути и модули путей синтеза витаминов группы В, отмечается в группе детей с РС, что согласуется с более значимыми изменениями таксономического состава кишечного микробиома.

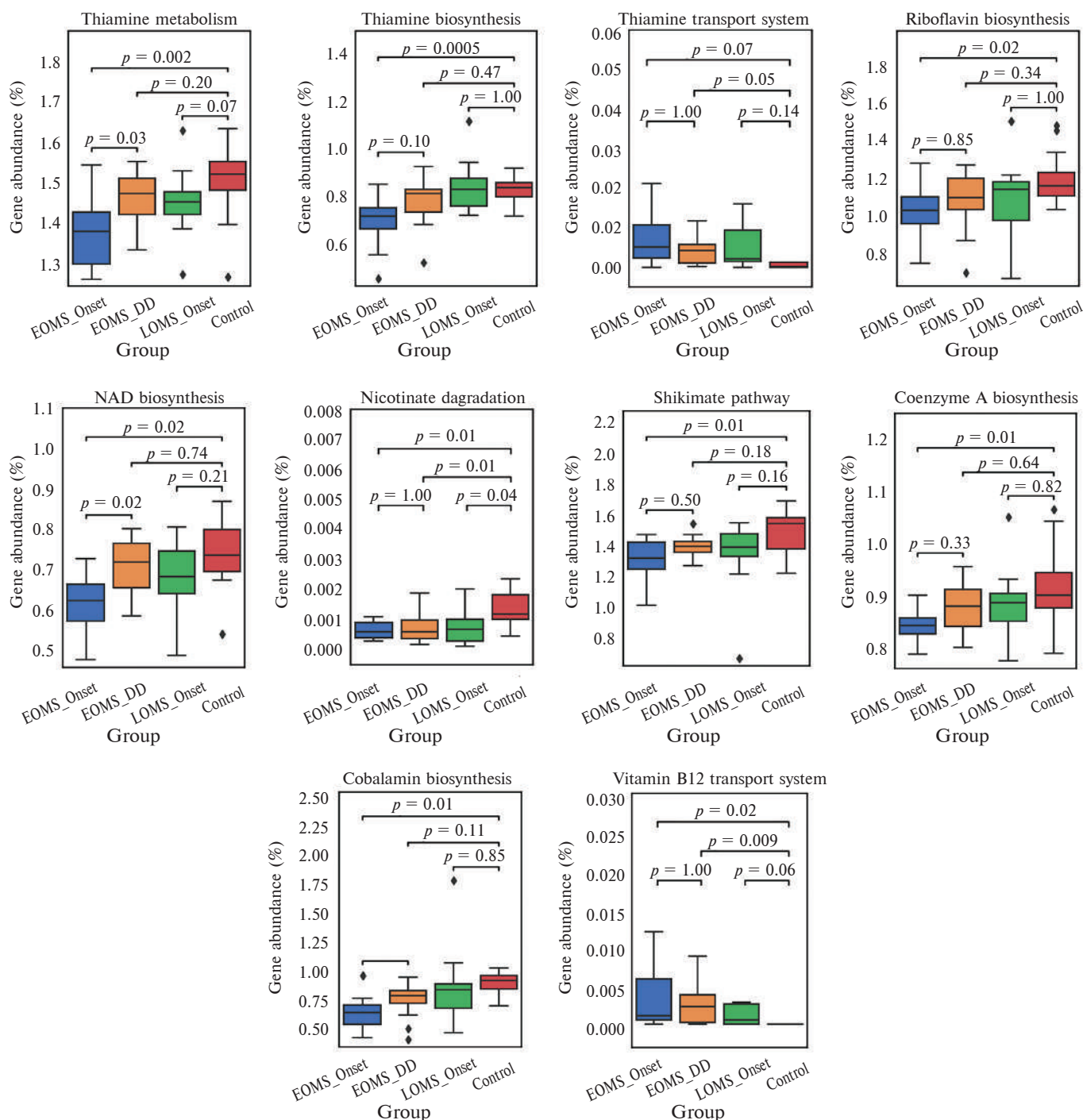


Рис. 6. Изменения потенциальной представленности бактериальных генов, вовлекаемых в пути метаболизма, синтеза и транспорта витаминов группы В. Данные представлены как медиана, границы прямоугольников – 1–3 квартили, границы отрезков – 95% доверительный интервал. Для сравнения использовали двусторонний тест Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений.

Для выявления возможной связи исследуемых реконструированных метаболических путей витаминов группы В с представленностью бактериальных таксонов был проведен корреляционный анализ, который показал наличие значимых корреляций с филумами *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobiota*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Однако выявлен-

ные корреляции различались в контрольной группе и группах пациентов с РС (рис. 7).

Наиболее многочисленные и сильные корреляционные связи с путями или определенными модулями путей биосинтеза и метаболизма витаминов группы В были обнаружены для филума *Bacteroidota* (рис. 7). В контрольной группе с этим

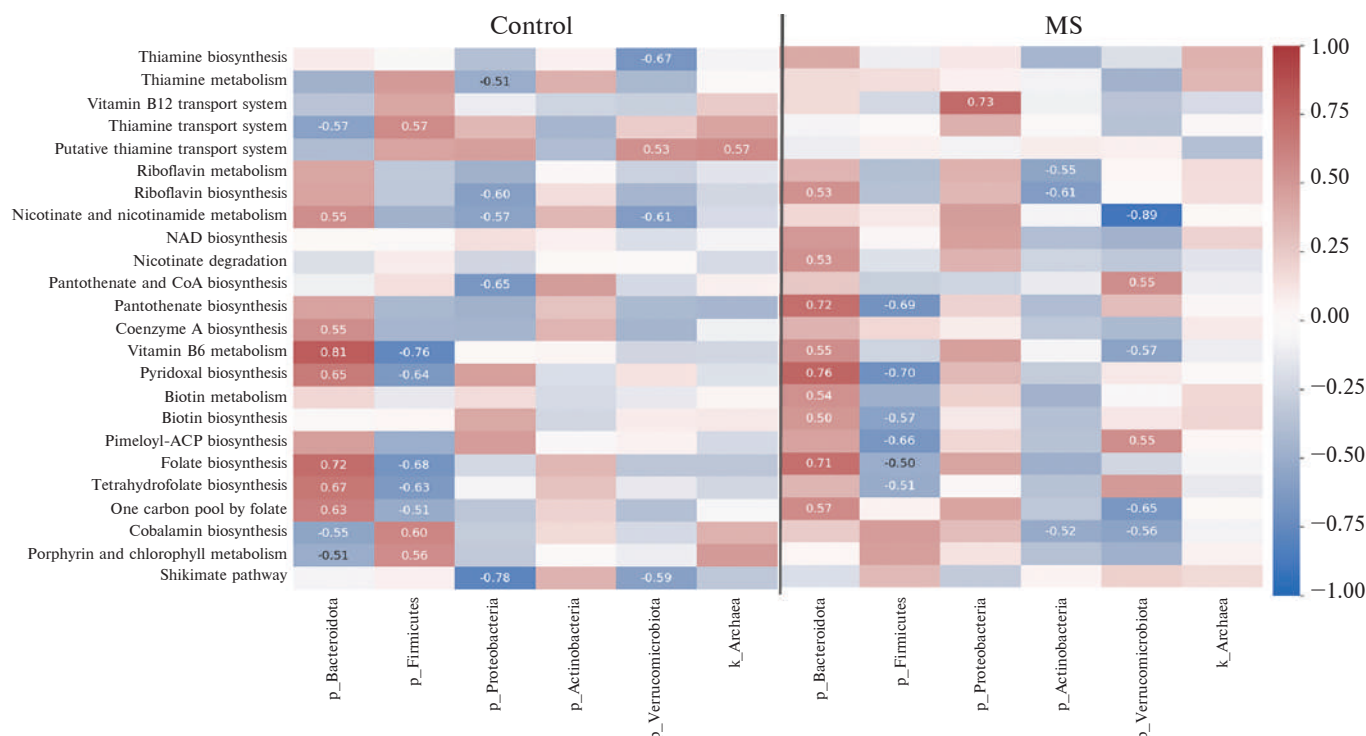


Рис. 7. Корреляционная связь представленности бактериальных филумов и потенциальных генов, вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза витаминов группы В. Ячейки с коэффициентами отражают достоверные корреляции: слабая корреляция — $r \leq 0.5$ (не отображена на графике); средняя корреляция — $0.5 < r \leq 0.7$, сильная корреляция — $r > 0.7$.

филумом коррелировала численность генов путей метаболизма витаминов В3 и В6, путей биосинтеза коэнзима А (В5), пиридоксала (В6), фолата (В9), тетрагидрофолата (В9), а также одноуглеродного пула фолата и отрицательно коррелировала численность генов путей метаболизма и синтеза витамина В12, а также транспортных систем тиамина (В1). При РС сохранялась корреляция с генами путей метаболизма и биосинтеза витамина В6, биосинтеза фолата и одноуглеродного пула фолата, при этом появились новые корреляции — с генами путей биосинтеза рибофлавина (В2), пантотената (В5), биосинтеза и метаболизма биотина, деградации никотината, при этом не выявлено корреляции с путями метаболизма и синтеза витамина В12. С путями метаболизма и синтеза витамина В1 у *Bacteroidota* корреляций не обнаружено ни в одной группе.

Численность *Firmicutes* в основном отрицательно коррелировала с генами, вовлекаемыми в пути метаболизма и синтеза витаминов группы В, хотя эти пути различались в контрольной группе и при РС. С путями метаболизма и синтеза витамина В12 численность *Firmicutes* имела положительную корреляцию в контрольной группе, тогда как у пациентов с РС независимо от возраста такой корреляции не наблюдалось. Были также обнаружены отрицательные корреляции филума *Proteobacteria* с путями метаболизма или синтеза витаминов В1, В2, В3, В5 и шикиматным путем в контрольной

группе. При РС эти корреляции исчезали, отмечалась единственная положительная корреляция с путями транспортных систем витамина В12. Мы не выявили связи филума *Actinobacteria* с представленностью генов путей метаболизма и синтеза витаминов группы В в контрольной группе, но при РС этот филум отрицательно коррелировал с путями метаболизма и синтеза рибофлавина (В2) и синтеза кобаламина (В12). Изменение корреляционных связей численности генов путей метаболизма и синтеза витаминов группы В отмечалось у пациентов с РС по сравнению с контрольной группой с филумом *Verrucomicrobiota* — появлялись отрицательные связи с путями метаболизма витамина В6, одноуглеродным пулом фолата и биосинтезом витамина В12 (рис. 7).

Далее, для выявления бактериальных родов, относящихся к филуму *Bacteroidota*, потенциально связанных с метаболизмом и синтезом витаминов группы В, был проведен дополнительный корреляционный анализ. В контрольной группе большинство корреляций с путями метаболизма витаминов группы В выявлено с родом *Prevotella*: с путями метаболизма витаминов В3 ($r=0.63$), биосинтеза коэнзима А ($r=0.65$), одноуглеродного пула фолата ($r=0.66$), а с путями биосинтеза пиридоксала коррелировала численность *Bacteroides* ($r=0.58$), *Parabacteroides* ($r=0.64$) и f *Muribaculaceae* (ранее S24–7); g_ ($r=0.75$). При РС большинство выявленных корреляций филума *Bacteroidota* с путями

метаболизма и синтеза витаминов группы В обеспечивалось *f_Rikenellaceae*; *g_*, *f_Barnesiellaceae*; *g_* и *Odoribacter*.

Была также проанализирована связь путей метаболизма и синтеза витаминов группы В с другими бактериальными родами, численность которых значимо изменялась при РС (рис. 8).

Обнаружена корреляция *f_Lachnospiraceae*; *g_* и *Roseburia* с путями метаболизма витамина В1, *Ruminococcus* — с путями биосинтеза витамина В3, *Coprococcus* — с путями биосинтеза витамина В5, *Sutterella* — с путями биосинтеза витамина В6. Численность *f_Lachnospiraceae*; *g_*, *Coprococcus* и *Dorea* коррелировала с путями синтеза витамина В12. При РС эти корреляции исчезали, зато появлялись корреляции *Atopobium* и *Akkermansia* с путями метаболизма и синтеза витаминов группы В преимущественно отрицательного знака (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что имеются специфические изменения структуры кишечного микробиома у детей и подростков при манифестации рассеянного склероза, отличные от изменений, происходящих у взрослых в дебюте РС. Для детей и подростков в дебюте РС было характерно не только возрастание или уменьшение отдельных таксонов, но и существенная модифи-

кация структуры кишечного микробиома — снижение альфа-разнообразия, а также редукция доминантных филумов с выраженным возрастанием *Verrucomicrobiota* и *Mycoplasmata*. Наличие сходного паттерна изменений кишечного микробиома в группе взрослых с началом РС в детском возрасте, позволяют предположить, что возрастание *Mycoplasmata* в большей степени может влиять на раннее проявление клинических симптомов РС, тогда как *Euryarchaeota* могут иметь значение для манифестации заболевания РС у взрослых.

Увеличение доли *Verrucomicrobiota* у взрослых пациентов с РС отмечалось неоднократно [26, 43, 44]. В данном исследовании показано, что это происходит не только у взрослых, но и у детей с РС уже в дебюте заболевания. Для филума *Mycoplasmata* не описано изменений при РС, но в исследованиях Tremlett и соавт. [45, 46] показано увеличение класса *Mollicutes* RF39, относящихся к этому филуму, именно у детей с РС.

Во многих исследованиях кишечного микробиома при РС отмечается сокращение [44, 47, 48] или увеличение [49, 50] численности филума *Bacteroidota* при РС, однако мы не обнаружили значимых изменений представленности этого филума ни в целом, ни какого-либо рода из этого филума ни в одной из групп по сравнению с контрольной группой. Отсутствие различий в представленности *Bacteroidota* в группах пациентов с РС по сравнению

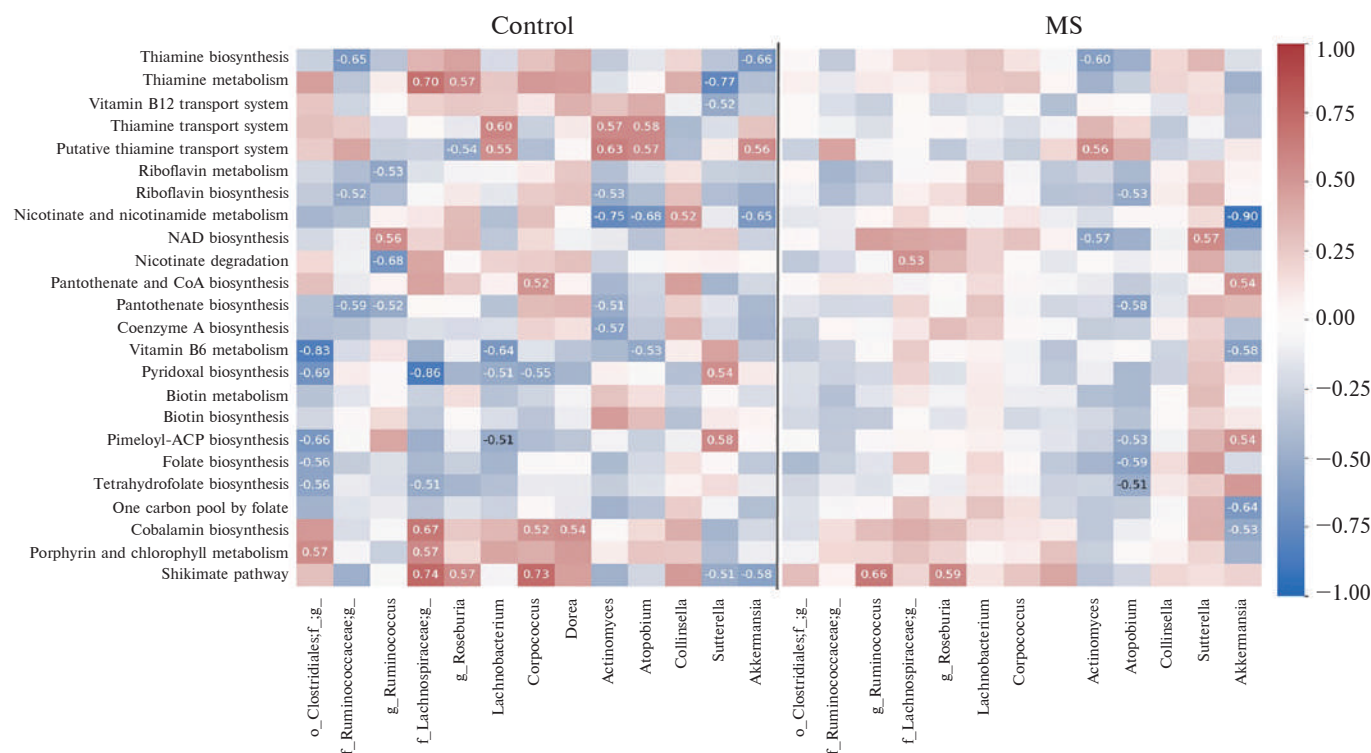


Рис. 8. Корреляционная связь представленности бактериальных родов, измененных при РС и потенциальных генов, вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза витаминов группы В. Ячейки с коэффициентами отражают достоверные корреляции: слабая корреляция — $r \leq 0.5$ не отображена на графике, средняя корреляция — $0.5 < r \leq 0.7$, сильная корреляция — $r > 0.7$.

с контролем в нашем исследовании, вероятно, связано с тем, что численность этих микроорганизмов уменьшается по мере увеличения длительности заболевания, а в нашем исследовании в 2-х группах пациентов длительность РС не превышала одного года. Выявленная нами отрицательная корреляция представленности этого филума с длительностью заболевания согласуется с этой точкой зрения (данные не представлены).

В исследовании Horton и соавт. [51], выполненном также на когорте детей с РС, показана защитная роль *Odoribacter splanchnicus*, относящегося к филуму *Bacteroidota*. Авторы объясняли протективные свойства этих бактерий способностью продуцировать бутират. Мы предполагаем, что позитивное влияние на организм *g_Odoribacter* может оказывать также за счет способности синтезировать витамины группы В (В1, В2, В5, В6 и В7), с путями синтеза которых этот бактериальный таксон коррелировал в нашей когорте пациентов с РС.

Согласно литературным данным, для пациентов с РС, в том числе для детей типично возрастание доли *Actinobacteria* [47, 48, 52–54]. Мы отмечали увеличение доли этого филума у детей, но оно не достигало уровня статистической значимости, видимо, за счет немногочисленности (1–4%) и разнонаправленности (увеличение–уменьшение) изменений, значимо отличающихся между исследуемыми группами *Actinomyces*, *Atopobium*, *Collinsella*, относящихся к этому филуму. Также во многих исследованиях [44–47, 52] показано возрастание численности *g_Bifidobacterium* при РС, которое может считаться установленной характерной особенностью этого заболевания. Ранее нами было обнаружено увеличение численности этих бактерий у пациентов, имевших более тяжелый вариант течения РС, который отмечается на развернутых стадиях РС длительности заболевания 10 и более лет [55]. Однако в дебюте РС ни у детей, ни у взрослых не наблюдалось увеличения доли этих микроорганизмов. Полученные в этом исследовании данные не противоречат ранее полученным результатам, так как в данном исследовании было всего 4 пациента с тяжелым течением РС, которые входили в группу сравнения (EOMS_DD).

Наконец, Jhangi и соавт. [43] у взрослых с РС, а Tremlett и соавт. [45, 46] у детей с РС отмечали увеличение филума *Euryarchaeota* (реклассифицирован в *Methanobacteriota*). Существенное повышение уровня *Methanobacteriota* наблюдалось нами только у взрослых в дебюте заболевания, хотя у части детей также отмечалось увеличение представленности этого филума.

Выявленное у всех пациентов с РС уменьшение неклассифицированных *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, *Blautia* (p_*Firmicutes*), *Collinsella* (p_*Actinobacteria*) и увеличение неклассифициро-

ванных *Ruminococcaceae* (p_*Firmicutes*) согласуется с данными других исследований [43–47, 56, 57]. Отмеченное только у детей с РС уменьшение доли *Lachnospira* (p_*Firmicutes*) и возрастание — *Atopobium*, *Actinomyces* (p_*Actinobacteria*), *Akkermansia* (p_*Verrucomicrobiota*) в других исследованиях отмечалось как у детей, так и у взрослых [45, 46, 56, 58, 59] или только у взрослых [56]. *Clostridium* (p_*Firmicutes*) уменьшались у детей и увеличивались у взрослых соответственно исследованиям [56, 60]. Единственное несоответствие с другими исследованиями [45, 46, 53, 61] — уменьшение, а не повышение доли *Coproccoccus* во всех группах с РС нашей когорты.

Очевидно, что такие выраженные изменения таксономического состава будут отражаться на функциональности кишечного микробиома, в частности, из-за уменьшения числа бактериальных генов, вовлекаемых в пути метаболизма и синтеза витаминов группы В, может создаваться дефицит бактериального пула витаминов. Так, на недостаточный бактериальный синтез витаминов В1, В2, В3 и В12 у детей нашей выборки может указывать выявленное снижение относительной представленности генов бактериальных ферментов, вовлекаемых в метаболические пути этих витаминов.

В исследовании Zheng и соавт. [59] на китайской когорте взрослых пациентов с РС показано, что *Streptococcus*, *Atopobium*, *Actinomyces* и *Rotinia* могут быть биомаркерами РС, а функциональный анализ с помощью PICRUST выявил подавление путей, участвующих в метаболизме кофакторов и витаминов при РС. Два из этих маркерных рода — *Atopobium*, *Actinomyces*, значимо увеличены у детей с РС нашей когорты и их численность отрицательно коррелирует с определенными метаболическими путями витаминов (рис. 8).

В настоящее время не ясно, какое значение для хозяина играет пул витаминов, продуцируемый бактериями в толстой кишке. Однако нарушение баланса между продуцентами и потребителями этих витаминов может приводить к повышенной конкуренции за витамины не только между бактериями, но и с хозяином, способствуя развитию дефицитного состояния витаминов. Наличие транспортеров витаминов в толстой кишке [62] свидетельствует о том, что неабсорбированные в тонкой кишке диетические витамины, а возможно и витамины бактериального происхождения, используются хозяином в этом компартменте кишечника.

Известно, что витамины группы В необходимы для формирования разнообразия и богатства кишечной микробиоты, и при дефиците витаминов В3 наблюдается низкое альфа-разнообразие [63]. Вероятно, изменения структуры кишечного микробиома, связанные с уменьшением альфа-разнообразия, выявленные у детей в дебюте РС,

указывают на имеющийся дефицит витамина В3 в толстой кишке. Дефициту витамина В3 при РС может способствовать многократное возрастание доли *Verrucomicrobiota* в составе кишечного микробиома, особенно у детей с РС, поскольку имеется сильная отрицательная корреляция ($r = -0.89$) численности этого филума с путями синтеза NAD (витамина В3).

Для некоторых микроорганизмов показана зависимость их роста от определенных витаминов группы В. Например, на рост и численность *Roseburia* влияет наличие рибофлавина [64], а на численность *Bacteroidales* и *Clostridiales* — фолиевой кислоты [65]. У мышей с дефицитом фолиевой кислоты снижалась численность этих таксонов, но увеличилась — *Lactobacillales* и *Erysipelotrichaceae* [65].

На основании наших данных мы не можем определить, какие виды бактерий синтезируют витамин В1 и имеется ли дефицит этого витамина у хозяина. Хотя считается, что *Bacteroidota* являются основными продуцентами витамина В1 [24], мы не обнаружили корреляции численности этого филума с путями биосинтеза витамина В1 ни у пациентов с РС, ни у здоровых людей. Более высокой способностью к биосинтезу тиамин обладает бактериальное сообщество, относящиеся к энтеротипу 2, [66] в котором широко представлены *Prevotella*, способные экспрессировать четыре фермента, участвующие в биосинтезе тиамин: гидроксиметилпиримидин киназу, фосфометилпиримидин киназу, тиаминфосфатпиро фосфорилазу и тиаминмонофосфат киназу [66]. В данном исследовании *Prevotella* коррелировали с путями синтеза не только витамина В1, но и витаминов В2 (рибофлавина), В5 (коэнзима А) и В9 (ТНФ).

Показано, что концентрация тиамин в просвете может варьировать от 20 до 2000 нМоль [67], поэтому способность микроорганизмов синтезировать собственный тиамин для обеспечения роста наиболее важна в период падения уровня витамина. Кишечные микроорганизмы, такие как *Ruminococcaceae*, а также многие представители бацилл, для роста которых требуется внешний источник витамина В1 и которые полностью зависят от транспорта тиамин, наиболее чувствительны к снижению доступности тиамин [68, 69]. Логично ожидать, что при недостатке тиамин численность этих бактериальных видов будет снижаться. Однако наблюдалось существенное возрастание доли этих микроорганизмов, из чего следует, что либо в просвете кишечника имеется достаточное количество тиамин, чтобы обеспечить их рост, например, в результате синтетической деятельности возрастающих *Actinomyces* [70], либо они более эффективно его захватывают, либо имеются в достаточном количестве другие пищевые субстраты, необходимые для их роста. В любом случае, при увеличе-

нии численности этих ауксотрофных таксонов они конкурируют за тиамин не только с хозяином, но и с другими членами бактериального сообщества, создавая дефицит этого микронутриента, по крайней мере, локально в толстой кишке. Поскольку показано, что *Roseburia intestinalis* M50/1 не способны расти при отсутствии тиамин, даже при наличии генов, кодирующих синтез тиамин [71], и на их численность влияет наличие рибофлавин [64], уменьшение *Roseburia* у детей с РС может быть связано с дефицитом этих витаминов в толстой кишке. В свою очередь, снижение численности *Roseburia* может негативно сказываться на продукции других витаминов. Hillman и соавт. [72] проанализировали метаболическую способность синтезировать витамин группы В у 10 штаммов, относящихся к пяти видам *Roseburia*, и у всех протестированных штаммов обнаружили наличие генов, вовлекаемых в синтез витаминов В1, В3 и В12, и кроме 3-х штаммов *R. inulinivorans* — гены, способные участвовать в синтезе витаминов В2 и В5. Таким образом, дефицит витамин(ов) через дисбаланс состава кишечного микробного сообщества может приводить к дефициту пула других витаминов.

Поскольку при дефиците витамин В1 нарушается дифференцировка и пролиферация иммунных клеток, ослабляется нейрогенез и миелиногенез, повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера [73–76] его недостаточная продукция микробиотой может способствовать запуску РС и негативно влиять на течение заболевания в дальнейшем. Это предположение подтверждается экспериментальными данными, показывающими, что при индукции экспериментального аутоиммунного / аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) у животных с дефицитом витамин В1 тяжесть заболевания усугублялась и у этих животных отмечалась повышенная пролиферация Т-клеток, усиленная инфильтрация ЦНС субпопуляциями Th1 и Th17 клеток и повышенной активацией макроглии [77].

Противовоспалительные свойства витамин В3 известны, как и его способность снижать проницаемость сосудов в кишечнике [78, 79]. Для путей метаболизма витамин В3 выявлена сильная ($r = -0.95$) отрицательная корреляция с *Akkermansia*. В отличие от других витаминов, витамин В3 также может синтезироваться из триптофана не только кишечными бактериями [80, 81], но и хозяином. [82]. Насколько отражается на пуле этого витамин в кишечнике выявленная нами корреляция с *Akkermansia* не известно. Вероятно, что конкуренция за витамин В3 и создание его дефицита у хозяина, может быть еще одним механизмом провоспалительного действия *Akkermansia*, наряду с деградацией слизи и направлением дифференцировки наивных Т-клеток в Th1.

Напротив, с представленностью генов путей метаболизма витамина В5, у *Akkermansia* выявлена прямая корреляция, поэтому эти микроорганизмы не могли приводить к сокращению численности бактериальных генов, вовлекаемых в пути витамина В5. Несмотря на то, что для *Atopobium* обнаружена отрицательная связь с этими путями, численность этого рода существенно ниже, чем *Akkermansia*, вероятно в дефицит бактериальных генов участвующих в метаболизме витамина В5 вносят вклад также другие малочисленные таксоны, для которых из-за их небольшой численности не были выявлены статистически значимые различия. С наибольшей вероятностью это — различные представители классов *Bacilli* и *Clostridia*. У каждого пациента комбинация этих таксонов индивидуальна.

По трем путям метаболизма и синтеза витаминов группы В не было выявлено отличий от контрольной группы — В6, В7 и В9. Видимо, это связано с тем, что основными продуцентами этих витаминов являются *Bacteroidota* [24], которые значимо не изменяются в нашей когорте пациентов. Необходимые для синтеза витамина В6 гены имеют *Bacteroides fragilis* и *Prevotella copri* (*Bacteroidota*), *Bifidobacterium longum* и *Collinsella aerofaciens* (*Actinobacteria*) и *Helicobacter pylori* (*Proteobacteria*) [80]. Хотя показано наличие у *Collinsella aerofaciens* путей биосинтеза витамина В6, снижение численности представителей рода *Collinsella* не позволило обнаружить корреляцию этих бактерий с путями метаболизма этого витамина. Витамин В9 могут производить *Bacteroides fragilis*, *Prevotella copri*, *Clostridium difficile*, *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, некоторые виды *Bifidobacterium*, *Fusobacterium varium* и *Salmonella enterica* [24, 83], а гены ферментов пути биосинтеза биотина наиболее многочисленно представлены в энтеротипе 1, обогащенном *Bacteroides* [66].

Только около 20% кишечных бактерий могут производить витамин В12 и более 80% кишечных бактерий нуждаются в В12 для своих метаболических потребностей [84, 85], поэтому уменьшение продуцентов этого витамина может наиболее сильно влиять на состав микробного сообщества и численность пула этого витамина в организме. Цианокобаламин обладает иммуномодулирующими и нейротрофными свойствами, участвует в формировании миелина, поэтому его дефицит может негативно сказываться на течении РС. О снижении уровня цианокобаламина в крови пациентов с РС неоднократно сообщалось, а проявления дефицита витамина В12 во многом сходны с симптомами РС [86]. Корреляции с путями метаболизма и синтеза витамина В12 выявлены у недифференцированных *Lachnospiraceae*, а также у рода *Coproccoccus* и *Dorea* в контрольной группе. Эти виды-проду-

центы сокращаются у пациентов с РС, поэтому в этих группах не выявляются корреляции с путями метаболизма и синтеза витамина В12. Напротив, у чрезмерно увеличивающихся *Akkermansia* при РС появляется отрицательная корреляция с метаболическими путями этого витамина. Эти данные могут свидетельствовать о том, что действительно при РС возникает дефицит бактериального пула витамина В12, особенно у детей и требуется восполнение этого витамина в толстой кишке за счет пищевых добавок, в частности, для поддержания роста полезных ауксотрофных бактериальных видов.

Выявленные в нашем исследовании корреляции уровня *Bacteroidota* с метаболическими путями витаминов группы В лишь частично согласуются с данными Magnusdottir и соавт. [24], показавшими при анализе *in silico*, что большинство представителей этого филума имеют необходимые гены для осуществления синтеза *de novo* всех витаминов группы В, за исключением витамина В12. Мы предполагаем, что это может быть из-за того, что наша контрольная выборка была небольшая, а изменения кишечного микробиома у пациентов с РС могли исказить результат.

Хотя мы не можем интерпретировать реконструкцию метаболических путей витаминов группы В как истинные функциональные пути кишечного микробиома, наши данные свидетельствуют о важности их дальнейшего изучения, в том числе, о необходимости уделять внимание тем бактериальным таксонам, которые могут влиять на синтез и потребление витаминов и создавать их дефицит в организме. В данном исследовании мы не определяли, имеется ли дефицит витаминов у пациентов. Однако на другой когорте было показано, что субклинический дефицит витаминов В6 и В9 имеют не только пациенты с РС, но и 25–35% здоровых детей и взрослых, а в отношении витамина В12 — их число возрастает до 50%. Хотя считается, что микробиота не может обеспечить суточную потребность хозяина в витаминах, возрастание доли ауксотрофных видов при сокращении видов-продуцентов будет создавать конкуренцию за пищевые витамины и повышать потребность в их экзогенном поступлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование таксономического состава кишечного микробиома и реконструкция метаболических путей витаминов группы В у детей и взрослых с РС показало важность дальнейшего изучения выявленных взаимосвязей. Понимание роли бактериального пула витаминов в формировании и поддержании кишечного микробного сообщества откроет пути направленной модуляции его состава за счет безопасных микронутриентов или пробиотических штаммов, способных синте-

зировать те витамины, которые необходимы пациенту. Это особенно важно для детей, у которых заболевание находится близко к биологическому началу и еще высок регенеративный потенциал. Однако для того, чтобы не вызвать переизбытка витаминов и сопутствующим им нежелательных явлений, необходимо учитывать и оценивать не только состав кишечной микробиоты, но и способность бактериального сообщества синтезировать и потреблять витамины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии за предоставление оборудования и помощь в исследованиях по секвенированию кишечного микробиома. Мы также благодарим всех участников исследования.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея, планирование и организация исследования (И.Н.А., В.И.Л., А.В.Д.), сбор данных (Е.Ю.С., Г.Н.Б., В.И.Л.), обработка данных (И.Н.А., Е.А.Ч., В.А.Н., А.В.М., В.И.Л.), биоинформационный и статистический анализ (А.Б.И., В.И.У., И.Н.А.), написание и редактирование манускрипта (И.Н.А., А.В.Д.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры исследования соответствовали этическим нормам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующих изменений. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” протокол № 2/22 от 06.04.2022 г. Участие в исследовании было добровольным, участники давали информированное согласие после ознакомления с процедурой и целями исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ и Санкт-Петербургского научного фонда № 22–25–20191.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van den Elsen PJ, van Eggermond MCJA, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S (2014) The epigenetics of multiple sclerosis and other related disorders. *Mult Scler Rel Dis* 3(2): 163–175.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2013.08.007>
2. Loma I, Heyman R (2011) Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuroparmacol* 9(3): 409–416.
<https://doi.org/10.2174/157015911796557911>
3. Simpson SJr, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B (2011) Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82(10): 1132–1141.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.2011.240432>
4. Simpson SJr, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, Dwyer T, Gies P, van der Mei I (2010) Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68(2): 193–203.
<https://doi.org/10.1002/ana.22043>
5. Trojano M, Lucchese G, Graziano G, Taylor BV, Simpson SJr, Lepore V, Grand'maison F, Duquette P, Izquierdo G, Grammond P, Amato MP, Bergamaschi R, Giuliani G, Boz C, Hupperts R, Van Pesch V, Lechner-Scott J, Cristiano E, Fiol M, Oreja-Guevara C, Saladino ML, Verheul F, Snee M, Paolicelli D, Tortorella C, D'Onghia M, Iaffaldano P, Drenzo V, Butzkueven H, Group MSS, the New Zealand MSPSG (2012) Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PloS one* 7(10): e48078.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048078>
6. Wu GF, Alvarez E (2011) The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 29(2): 257–278.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2010.12.009>
7. Wiendl H, Gold R, Zipp F (2021) Multiple sclerosis therapy consensus group (MSTCG): answers to the discussion questions. *Neurologic Res Practice* 3: 44.
<https://doi.org/10.1186/s42466-021-00140-1>
8. Ельчанинова ЕЮ, Смагина ИВ (2017) Неврол Журн (2): 64–71. [El'chaninova EYu, Smagina IV (2017) *Nevrol Zh* (2): 64–71. (In Russ)].
<https://doi.org/10.8821/1560-9545-2017-22-2-64-71>
9. Смагина ИВ, Ельчанинова ЕЮ, Раевских ВМ Связь антропогенных и биотических факторов с риском педиатрического рассеянного склероза (2020) Медико-фармацевт Журн “Пульс” 22(9): 42–51. [Smagina IV, Elchaninova EY, Raevskikh VM (2020) Association of anthropogenic and biotic factors with the risk of pediatric multiple sclerosis. *Med Pharmaceut J “Pulse”* 22(9): 42–51. (In Russ)].
<https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-9-42-51>
10. Bar-Or A, Hintzen RQ, Dale RC, Rostasy K, Brück W, Chitnis T (2016) Immunopathophysiology of pediatric CNS inflammatory demyelinating diseases. *Neurology* 87 (9 Suppl 2): S12–19.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002821>
11. Nemazannikova N, Mikkleson K, Stojanovska L, Blatch GL, Apostolopoulos V (2018) Is there a link between vitamin B and multiple sclerosis? *Med Chem* 14(2): 170.
<https://doi.org/10.2174/1573406413666170906123857>
12. Klenner FB (1973) Response of Peripheral and Central Nerve Pathology to Mega-Doses of the Vitamin B-Complex and Other Metabolites. *J Appl Nutr*.
13. Nijst TQ, Wevers RA, Schoonderwaldt HC, Hommes OR, de Haan AF (1990) Vitamin B12 and folate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of neurological pa-

- tients with special reference to multiple sclerosis and dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53(11): 951. <https://doi.org/10.1136/jnnp.53.11.951>
14. Comerford KB (2013) Recent developments in multivitamin/mineral research. *Advanc Nutrit* 4(6): 644–656. <https://doi.org/10.3945/an.113.004523>
 15. Mikkelsen K, Stojanovska L, Apostolopoulos V (2016) The Effects of Vitamin B in Depression. *Curr Med Chem* 23(38): 4317–4337. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160920110810>
 16. Mikkelsen K, Stojanovska L, Tangalakis K, Bosevski M, Apostolopoulos V (2016) Cognitive decline: A vitamin B perspective. *Maturitas* 93: 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.08.001>
 17. Mikkelsen K, Stojanovska L, Prakash M, Apostolopoulos V (2017) The effects of vitamin B on the immune/cytokine network and their involvement in depression. *Maturitas* 96: 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.11.012>
 18. Abdurasulova IN (2022) Role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of multiple sclerosis. Part 1. Clinical and experimental evidence for the involvement of the gut microbiota in the development of multiple sclerosis. *Medical Academic J* 22(2): 9–36. <https://doi.org/10.17816/MAJ108241>
 19. O'Connor EM (2013) The role of gut microbiota in nutritional status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16: 509–516. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283638eb3>
 20. Berding K, Donovan SM (2016) Microbiome and nutrition in autism spectrum disorder: current knowledge and research needs. *Nutr Rev* 74: 723–736. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw048>
 21. Maruvada P, Leone V, Kaplan LM, Chang EB (2017) The human microbiome and obesity: moving beyond associations. *Cell Host Microbe* 22: 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.005>
 22. Rossi M, Amarett A, Raimondi S (2011) Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3: 118–134. <https://doi.org/10.3390/nu3010118>
 23. Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC (2011) Contributions of intestinal bacteria to nutrition and metabolism in the critically ill. *Surg Clin North Am* 91: 771–785. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2011.05.001>
 24. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crecy-Lagard V, Thiele I (2015) Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front Genet* 6: 148. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00148>
 25. Steinert RE, Lee Y-K, Sybesma W (2019) Vitamins for the Gut Microbiome. *Trends Mol Med* 26(2): 137. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.11.005>
 26. Ling Z, Cheng Y, Yan X, Shao L, Liu X, Zhou D, Zhang L, Yu K, Zhao L (2020) Alterations of the Fecal Microbiota in Chinese Patients with Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 11: 590783. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590783>
 27. Efimova D, Tyakht A, Popenko A, Vasilyev A, Altukhov I, Dovidchenko N, Odintsova V, Klimenko N, Loshkarev R, Pashkova M, Elizarova A, Voroshilova V, Slavskii S, Pekov Y, Filippova E, Shashkova T, Levin E, Alexeev D (2018) Knomics-Biota — a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData Mining* 11: 25. <https://doi.org/10.1186/s13040-018-0187-3>
 28. Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26 (19): 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
 29. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72(7): 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
 30. Shannon CE, Weaver W The mathematical theory of communication, by CE Shannon (and recent contributions to the mathematical theory of communication). W. Weaver. University of illinois Press. 1949.
 31. Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statistics* 11(4): 265–270.
 32. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R (2007) Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 73(5): 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
 33. Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkpile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31(9): 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
 34. Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28(1): 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
 35. Charlier F, Weber M, Izak D, Harkin E, Magnus M, Lalli J, Fresnais L, Chan M, Markov N, Amsalem O, Proost S, Krasoulis A, getzze, Repplinger S (2022) Statannotations (v0.6). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7213391>
 36. Hunter JD (2007) Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing Sci Engineering* 9(3): 90–95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
 37. Van Rossum G, de Boer J (1991) Interactively Testing Remote Servers Using the Python Programming Language. *CWI Quarterly* 4(4): 283–303.
 38. OpenEpi Epidemiologic Statistics [Electronic resource]. URL: <http://www.openepi.com> (accessed: 14.04.2023).
 39. Medstatistic [Electronic resource]. URL: <http://www.medstatistic.ru> (accessed: 14.04.2023).
 40. Harris CR, Millman KJ, van der Walt SJ, Gommers R, Virtanen P, Cournapeau D, Wieser E, Taylor J, Berg S, Smith NJ, Kern R, Picus M, Hoyer S, van Kerkwijk MH, Brett M, Haldane A, Del Río JF, Wiebe M, Peterson P, Gérard-Marchant P, Sheppard K, Reddy T, Weckesser W, Abbasi H, Gohlke C, Oliphant TE (2020) Array programming with NumPy. *Nature* 585(7825): 357–362. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>

41. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Millman KJ, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey CJ, Polat İ, Feng Y, Moore EW, VanderPlas J, Laxalde D, Perktold J, Cimrman R, Henriksen I, Quintero EA, Harris CR, Archibald AM, Ribeiro AH, Pedregosa F, van Mulbregt P, SciPy 1.0 Contributors (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods* 17(3): 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
42. McKinney W (2010) Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proceed Python Sci Conf (SciPy 2010)*: 56–61.
43. Jhingi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL, Cook S, Tankou S, Stuart F, Melo K, Nejad P, Smith K, Topçulu BD, Holden J, Kivisäkk P, Chitnis T, De Jager PL, Quintana FJ, Gerber GK, Bry L, Weiner HL (2016) Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun* 7: 12015. <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
44. Takewaki D, Suda W, Sato W, Takayasu L, Kumar N, Kimura K, Kaga N, Mizuno T, Miyake S, Hattori M, Yamamura T (2020) Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. *PNAS* 117 (36): 22402–22412. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011703117>
45. Tremlett H, Fadrosh D, Faruqi AA, Zhu F, Hart J, Roalstad S, Graves J, Lynch S, Waubant E; US Network of Pediatric MS Centers (2016) Gut microbiome in early pediatric multiple sclerosis: a case-control study. *Eur J Neurol* 23(8): 1308–1321. <https://doi.org/10.1111/ene.13026>
46. Tremlett H, Fadrosh DW, Faruqi AA, Hart J, Roalstad S, Graves J, Lynch S, Waubant E; US Network of Pediatric MS Centers (2016) Gut microbiota composition and relapse risk in pediatric MS: A pilot study. *J Neurol Sci* 363: 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.02.042>
47. Miyake S, Kim S, Suda W, Oshima K, Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Tomita A, Sato W, Kim S-W, Morita H, Hattori M, Yamamura T (2015) Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Cluster. *PLoS One* 10(9): e0137429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137429>
48. Galluzzo P, Capri FC, Vecchioni L, Realmuto S, Scalisi L, Cottone S, Nuzzo D, Alduina R (2021) Comparison of the intestinal microbiome of Italian patients with multiple sclerosis and their household relatives. *Life (Basel)* 11(7): 620. <https://doi.org/10.3390/life11070620>
49. Cosorich I, Dalla-Costa G, Sorini C, Ferrarese R, Messina MJ, Dolpady J, Radice E, Mariani A, Testoni PA, Canducci F, Comi G, Martinelli V, Falcone M (2017) High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci Adv* 3(7): e1700492. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700492>
50. Pellizoni FP, Leite AZ, de Campos Rodrigues N, Ubaiz MJ, Gonzaga MI, Takaoka NNC, Mariano VS, Omori WP, Pinheiro DG, Junior EM, Gomes E, de Oliveira GLV (2021) Detection of Dysbiosis and Increased Intestinal Permeability in Brazilian Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Int J Environ Res Public Health* 18(9): 4621. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094621>
51. Horton MK, McCauley K, Fadrosh D, Fujimura K, Graves J, Ness J, Wheeler Y, Gorman MP, Benson LA, Weinstock-Guttman B, Waldman A, Rodriguez M, Tillema JM, Krupp L, Belman A, Mar S, Rensel M, Chitnis T, Casper TC, Rose J, Hart J, Shao X, Tremlett H, Lynch SV, Barcellos LF, Waubant E; U.S. Network of Pediatric MS Centers (2021) Gut microbiome is associated with multiple sclerosis activity in children. *Ann Clin Transl Neurol* 8(9): 1867–1883. <https://doi.org/10.1002/acn3.51441>
52. Castillo-Álvarez F, Pérez-Matute P, Oteo JA, Marzo-Sola ME (2021) The influence of interferon β -1b on gut microbiota composition in patients with multiple sclerosis. *Neurologia (Engl Ed)* 36(7): 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2020.05.006>
53. Oezguen N, Yalcinkaya N, Küçükali CI, Dahdouli M, Hollister EB, Luna RA, Türkoglu R, Kürtüncü M, Eraksoy M, Savidge TC, Tüzün E (2019) Microbiota stratification identifies disease-specific alterations in neuro-Behçet's disease and multiple sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 37 Suppl 121(6): 58–66.
54. Tremlett H, Waubant E (2018) Gut microbiome and pediatric multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 24(1): 64–68. <https://doi.org/10.1177/1352458517737369>
55. Абдурасулова ИН, Мацулевич АВ, Грегнер НМ, Негорева ИГ, Бисага ГН (2023) Повышенный уровень Bifidobacterium в составе кишечной микробиоты – маркер неблагоприятного течения рассеянного склероза. *Журн Неврологии и психиатрии им СС Корсакова* 123 (7, Вып. 2): 136–137. [Abdurasulova IN, Matsulevich AV, Grefner NM, Negoreeva IG, Bisaga GN (2023) Increased level of Bifidobacterium in intestinal microbiota is a marker of unfavourable course of multiple sclerosis. *Zhurn Neurologii i Psichiatrii im SS Korsakov* 123(7, Issue 2): 136–137. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/jnevro2023123072136>
56. Forbes JD, Chen C-Y, Knox NC, Marrie R-A, El-Gabalawy H, de Kievit T, Alfa M, Bernstein CN, Van Domseelaar G (2018) A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases – does a common dysbiosis exist? *Microbiome* 6(1): 221. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0603-4>
57. Cox LM, Maghzi AH, Liu S, Tankou SK, Dhang FH, Willocq V, Song A, Wasén C, Tauhid S, Chu R, Anderson MC, De Jager PL, Polgar-Turcsanyi M, Healy BC, Glanz BI, Bakshi R, Chitnis T, Weiner HL (2021) The Gut Microbiome in Progressive Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 89(6): 1195–1211. <https://doi.org/10.1002/ana.26084>
58. Kozhieva M, Naumova N, Alikina T, Boyko A, Vlassov V, Kabilov MR (2019) Primary progressive multiple sclerosis

- in a Russian cohort: relationship with gut bacterial diversity. *BMC Microbiology* 19(1): 309.
https://doi.org/10.1186/s12866-019-1685-2
59. Zeng Q, Junli Gong, Liu X, Chen C, Sun X, Li H, Zhou Y, Cui C, Wang Y, Yang Y, Wu A, Shu Y, Hu X, Lu Z, Zheng SG, Qiu W, Lu Y (2019) Gut dysbiosis and lack of short chain fatty acids in a Chinese cohort of patients with multiple sclerosis. *Neurochem Int.* 129:104468.
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104468
 60. Reynders T, Devolder L, Valles-Colomer M, Van Remoortel A, Joossens M, De Keyser J, Nagels G, D'hooghe M, Raes J (2020) Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes. *Ann Clin Transl Neurol* 7(4): 406–419.
https://doi.org/10.1002/acn3.51004
 61. Cantarel BL, Waubant E, Chehoud C, Kuczynski J, De-Santis TZ, Warrington J, Venkatesan A, Fraser CM, Mowry EM (2015) Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *J Investig Med* 63(5): 729–734.
https://doi.org/10.1097/JIM.000000000000192
 62. Абдурасулова ИН, Дмитриев АВ (2023) Витамины группы В: от гомеостаза к патогенезу и лечению рассеянного склероза. *Усп физиол наук* 54(1): 26–54. [Abdurasulova IN, Dmitriev AV (2023) Group B Vitamins: From Homeostasis to Pathogenesis and Treatment of Multiple Sclerosis. *Uspechi Fiziologicheskikh nauk* 54(1): 26–54. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/S0301179823010034
 63. Fangmann D, Theismann E-M, Türk K, Schulte DM, Reling I, Hartmann K, Keppler JK, Knipp J-R, Rehman A, Heinsen F-A, Franke A, Lenk L, Freitag-Wolf S, Appel E, Gorb S, Brenner C, Seegert D, Waetzig GH, Rosenstiel P, Schreiber S, Schwarz K, Laudes M (2017) Targeted Microbiome Intervention by Microencapsulated Delayed-Release Niacin Beneficially Affects Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes Care* 41(3): 398–405.
https://doi.org/10.2337/dc17-1967
 64. Steinert RE, Sadaghian Sadabad M, Harmsen HJ, Weber P (2016) The prebiotic concept and human health: A changing landscape with riboflavin as a novel prebiotic candidate? *Eur J Clin Nutr* 70(12): 1348–1353.
https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.119.
 65. Da Silva AVA, de Castro Oliveira SB, Di Rienzi SC, Brown-Steinke K, Dehan LM, Rood JK, Carreira VS, Le H, Maier EA, Betz KJ, Aihara E, Ley RE, Preidis GA, Shen L, Moore SR (2019) Murine Methyl Donor Deficiency Impairs Early Growth in Association with Dysmorphic Small Intestinal Crypts and Reduced Gut Microbial Community Diversity. *Curr Dev Nutr* 3(1): nzy070.
https://doi.org/10.1093/cdn/nzy070
 66. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerster KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346): 174–180.
https://doi.org/10.1038/nature09944
 67. Said HM (2011) Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J* 437(3): 357–372.
https://doi.org/10.1042/BJ20110326.
 68. Costliow ZA, Degnan PH (2017) Thiamine Acquisition Strategies Impact Metabolism and Competition in the Gut Microbe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *mSystems* 2(5): e00116–17.
https://doi.org/10.1128/mSystems.00116-17
 69. Park J, Hosomi K, Kawashima H, Chen Y, Mohsen A, Ohno H, Konishi K, Tanisawa K, Kifushi M, Kogawa M, Takeyama H, Murakami H, Kubota T, Miyachi M, Kunisawa J, Mizuguchi K (2022) Dietary vitamin B1 intake influences gut microbial community and the consequent production of short-chain fatty acids. *Nutrients* 14(10): 2078.
https://doi.org/10.3390/nu14102078
 70. Herrick JA, Alexopoulos CJ (1943) A Further Note on the Production of Thiamine by Actinomycetes. *Bull Torrey Botanic Club* 70(4): 369–371.
https://doi.org/10.2307/2481558
 71. Soto-Martin E, Warnke I, Farquharson F, Christodoulou M, Horgan G, Derrien M, Faurie J-M, Flint HJ, Duncan SH, Louis P (2020) Vitamin biosynthesis by human gut butyrate-producing bacteria and cross-feeding in synthetic microbial communities. *mBio* 11(4): 20.
https://doi.org/10.1128/mBio.00886-20
 72. Hillman ET, Kozik AJ, Hooker CA, Burnett JL, Heo Y, Kiesel VA, Nevins CJ, Oshiro JM, Robins MM, Thakkar RD, Wu ST, Lindemann SR (2020) Comparative genomics of the genus *Roseburia* reveals divergent biosynthetic pathways that may influence colonic competition among species. *Microb Genom* 6(7): mgen000399.
https://doi.org/10.1099/mgen.0.000399
 73. Abdou E, Hazell AS (2015) Thiamine deficiency: An update of pathophysiologic mechanisms and future therapeutic considerations. *Neurochem Res* 40(2): 353–361.
https://doi.org/10.1007/s11064-014-1430-z
 74. Bâ A (2008) Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol* 28(7): 923–931.
https://doi.org/10.1007/s10571-008-9297-7
 75. Butterworth RF (2003) Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutr Res Rev* 16(2): 277–284.
https://doi.org/10.1079/NRR200367
 76. Hazell AS, Butterworth RF (2009) Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol Alcohol* 44(2): 141–147.
https://doi.org/10.1093/alcac/agn120
 77. Ji Z, Fan Z, Zhang Y, Yu R, Yang H, Zhou C, Luo J, Ke ZJ (2014) Thiamine deficiency promotes T cell infiltration

- in experimental autoimmune encephalomyelitis: the involvement of CCL2. *J Immunol* 193(5): 2157–2167.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302702
78. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, Thangaraju M, Prasad PD, Manicassamy S, Munn DH, Lee JR, Offermanns S, Ganapathy V (2014) Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40(1): 128–139.
https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007
 79. Lipszyc PS, Cremaschi GA, Zubilete MZ, Bertolino MLA, Capani F, Genaro AM, Wald MR (2013) Niacin modulates pro-inflammatory cytokine secretion. A potential mechanism involved in its anti-atherosclerotic effect. *Open Cardiovasc Med J* 7: 90–98.
https://doi.org/10.2174/1874192401307010090
 80. Gazzaniga F, Stebbins R, Chang SZ, McPeck MA, Brenner C (2009) Microbial NAD metabolism: lessons from comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 73(3): 529–541.
https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-08
 81. Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, Begley TP (2003) NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem Biol* 10(12): 1195–1204.
https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.11.011
 82. Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, Li T, Yin Y (2018) Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* 8:13.
https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00013
 83. Crittenden RG, Martinez NR, Playne MJ (2003) Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int J Food Microbiol* 80(3): 217–222.
https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00170-8
 84. Degnan PH, Barry NA, Mok KC, Taga ME, Goodman AL (2014) Human Gut Microbes Use Multiple Transporters to Distinguish Vitamin B12 Analogs and Compete in the Gut. *Cell Host Microbe* 15(1): 47–57.
https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.007
 85. Kelly CJ, Alexeev EE, Farb L, Vickery TW, Zheng L, Eric LC, Kitzenberg DA, Battista KD, Kominsky DJ, Robertson CE, Frank DN, Stabler SP, Colgan SP (2019) Oral vitamin B12 supplement is delivered to the distal gut, altering the corrinoid profile and selectively depleting *Bacteroides* in C57BL/6 mice. *Gut Microbes* 10(6): 654–662.
https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1597667
 86. Miller A, Korem M, Almog R, Galboiz Y (2005) Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 233(1–2): 93–97.
https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.03.009

CHANGES IN GUT MICROBIOME TAXONOMIC COMPOSITION AND THEIR RELATIONSHIP TO BIOSYNTHETIC AND METABOLIC PATHWAYS OF B VITAMINS IN CHILDREN WITH MULTIPLE SCLEROSIS

I. N. Abdurasulova^{a, #}, E. A. Chernyavskaya^a, A. B. Ivanov^b, V. A. Nikitina^a,
V. I. Lioudyno^a, A. A. Nartova^a, A. V. Matsulevich^a, E. Yu. Skripchenko^c,
G. N. Bisaga^d, V. I. Ulyantsev^b, A. V. Dmitriev^a

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

^b National Research University ITMO, St. Petersburg, Russia

^c Pediatric Research and Clinical Centre for Infectious Diseases under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

^d Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

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

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterised by progressive demyelination leading to the death of neurons in the central nervous system. The disease usually manifests in people aged 20–40 years, but in recent years there has been an increase in the number of cases with childhood MS debut. We assume that this may be related to the peculiarities of the taxonomic composition of the intestinal microbiota and its ability to produce B vitamins. Purpose: To identify changes in the composition of the gut microbiome in the debut of multiple sclerosis in children and adults and to assess the potential of the gut microbiome to metabolise and synthesise B vitamins. Fifteen children (9–17 years), 15 adults with MS manifested in childhood and 14 adults over 37 years of age with MS duration less than 1 year participated in the study. The composition of the intestinal microbiome was determined by sequencing the 16S rRNA gene on the Illumina platform with universal primers for the 16S rRNA V3–V4 variable region. The PICRUST algorithm using the KEGG reference genome database was used to predict the presence of B vitamin metabolic pathways in the intestinal microbiome. Children in MS debut were found to have specific microbiome changes different from those in adults. These changes include a decrease in alpha diversity as well as a reduction in dominant phylum and an increase in *p_Verrucomicrobiota* and *p_Mycoplasmata*, which was accompanied by a decrease in the number of bacterial genes involved in the pathways of metabolism and synthesis of vitamins B1, B2, B3, B5 and B12. Such changes may be associated with

early manifestation of MS symptoms in children. The findings highlight the importance of further study of the influence of the intestinal microbiome and its metabolic potential on the development and progression of MS, especially in childhood, and may contribute to the development of modern more effective methods of treatment and prevention of this demyelinating disease.

Keywords: Paediatric multiple sclerosis, intestinal microbiota, intestinal microbiome, B vitamins

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ГЕМОЛИМФЕ И БЕЛКОВОМ ГИДРОЛИЗАТЕ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

© 2024 г. Н. А. Голубь^{1,*}, А. А. Солдатов¹, В. И. Рябушко¹,
А. В. Кузнецов¹, В. П. Курченко², Е. В. Будкевич³

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

² Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь

³ Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

* e-mail: ngolub66@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 18.12.2023 г.

Двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) является видом-вселенцем в Чёрное и Азовское моря. Изучали аминокислотный состав гемолимфы и белковых гидролизатов мягких тканей моллюска. Методом ионообменной хроматографии с последующей нингидриновой детекцией определено содержание 16 протеиногенных аминокислот в пробах. Отмечены высокие концентрации гистидина и пролина в гемолимфе и мягких тканях моллюска. Под влиянием экспериментальной гипоксии выявлены качественные и количественные изменения в содержании свободных аминокислот, как гемолимфы, так и гидролизатов мягких тканей, в частности, отмечено уменьшение в два раза пула алифатических аминокислот и возрастание пула ароматических аминокислот. В условиях гипоксии почти вдвое снижается весовая доля мягких тканей анадары, по сравнению с нормальными условиями обитания — 4.7% в опыте и 8.2% в контроле. Это приводит к ухудшению показателей гидролизатов по общему и аминному азоту, а также сухим веществам (0.34 и 1.84% от сухого вещества при гипоксии и нормоксии). Показано, что в условиях гипоксии метаболизм моллюска реорганизуется в направлении анаэробного катаболизма аминокислот и белков, как источника субстратов цикла трикарбоновых кислот и цикла орнитина. Это приводит к значительному накоплению аргинина, являющегося аллостерическим активатором реакций цикла орнитина и накоплению мочевины в качестве низкомолекулярного антиоксиданта. Таким образом, в анадаре формируется низкомолекулярное звено антиоксидантной защиты в виде высокого содержания таких скавенджеров свободных радикалов, как гистидин и мочевина, что может способствовать успеху инвазии этого моллюска в Чёрное и Азовское моря. Рассмотрены вопросы влияния гипоксии на качество моллюсков как сырья для получения БАД.

Ключевые слова: *Anadara kagoshimensis*, вид-вселенец, гипоксия, белковый гидролизат, метаболизм аминокислот, Чёрное и Азовское моря

DOI: 10.31857/S0044452924010105, EDN: ZEZYEK

ВВЕДЕНИЕ

Интродукция новых биологических видов, зачастую вызванная сбросом балластных вод с судов, является одним из существенных факторов антропогенного воздействия на экосистемы Чёрного и Азовского морей. В XX веке к условиям Чёрного моря адаптировались такие моллюски, как рапана *Rapana venosa*, устрица *Magallana gigas* и анадара *Anadara kagoshimensis*, которые теперь являются объектами промысла и аквакультуры [1]. Первые находки анадары в Чёрном море относятся к 1968 г. [2], затем этот вид был обнаружен

у берегов Болгарии, Румынии и у побережья Турции в 1980–1982 гг., в 1987 проник в северо-западную часть Черного моря, в 1987–1989 проник в Азовское море, а в 1999 г. этот вид был обнаружен на южном побережье Крыма [3]. До 2010 г. этот моллюск имел название *Anadara inaequalvis* (Bruguiere, 1789). Однако затем его систематическое положение было уточнено с использованием генетических методов — *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) [4].

Массовое оседание личинок моллюска отмечено на естественных субстратах на глубинах от 3

до 60 м [3, 5], а также на коллекторах морских ферм [6]. Анадара устойчива к гипоксии и аноксии, поскольку обладает эритроцитарным гемоглобином и значительным содержанием каротиноидов [7, 8]. Особенностью адаптации анадары к колебаниям концентрации кислорода в воде является экономное потребление кислорода даже в условиях нормоксии [9–11]. Анадара способна жить в условиях аноксии в 5–6 раз дольше, чем другие виды двустворчатых моллюсков [12], что может быть примером того, как разные виды двустворчатых моллюсков реагируют на стрессовые факторы [13]. В анадаре отмечено высокое содержание водорастворимых скавенджеров радикалов таких, как глутатион, металлотионеины и мочевины [14, 15]. Моллюск обладает мощным комплексом антиоксидантной защиты ферментативной природы [11, 16] и сохраняет устойчивость аденилатного потенциала не только в условиях гипоксии и аноксии, но даже в условиях сероводородного заражения [15, 17].

Этот вид-вселенец имеет конкурентное преимущество перед другими двустворчатыми моллюсками в черноморском бассейне и может создавать новые сообщества на участках с повышенным терригенным накоплением осадков и менее благоприятным кислородным режимом [18]. В настоящее время анадара доминирует в донных сообществах восточного, западного и юго-западного побережья Чёрного моря и может стать перспективным объектом промысла [19, 20]. Скорость роста моллюска в Чёрном море является более высокой по сравнению с другими районами Мирового океана, а по размерам анадара способна достигать показателей, сравнимых с естественными поселениями для абorigенного Индийско-Тихоокеанского региона [21, 22].

Таким образом, большинство работ посвященное адаптациям анадары в Черном и Азовском морях касается наличия ферментативных систем, состава каротиноидов и наличия естественных антиоксидантов у моллюсков. При этом такой класс соединений, как аминокислоты и их роль в адаптационных процессах, практически, выпадает из поля зрения исследователей. Всё это обусловило интерес к исследованию аминокислотного состава анадары, в частности, для биотехнологического направления использования данного объекта потенциальной конхиокультуры.

Цель данной работы — изучить влияние гипоксии на состав свободных аминокислот гемолимфы и гидролизата мягких тканей двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis*, вида-вселенца в Чёрное и Азовское моря. Дополнительной задачей была оценка перспективы использования моллюска в качестве сырья для биологически активных добавок (БАД) и влияние гипоксии на его показатели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

В работе использовали двустворчатого моллюска-вселенца в Чёрное море *Anadara kagoshimensis*. Моллюсков с длиной раковины 25–33 мм содержали в садках на устричной ферме в бухте Карантинная (Крым, г. Севастополь). Моллюсков после изъятия разделяли на контрольную ($n=10$) и экспериментальную группы ($n=5$) и помещали в отдельные ёмкости. Контрольную группу животных выдерживали в течение 3 сут в условиях нормоксии — $5 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$, в экспериментальной — при гипоксии, содержание кислорода поддерживалось на уровне $0.05\text{--}0.10 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$. Содержание кислорода в воде понижали путем барботажа ее азотом в течение 5 часов. Контроль за содержанием кислорода в воде осуществляли на протяжении всего эксперимента при помощи люминесцентного оксиметра HACH LDO 101. Раз в сутки воду в емкостях, где содержались моллюски, замещали на свежую для удаления метаболитов. Содержание кислорода в воде при этом сохранялось на прежнем уровне. Температура воды поддерживалась на уровне $16\text{--}17^\circ\text{C}$. Через 3 сут измеряли индивидуальную массу моллюсков, мягких тканей и раковин. Объём гемолимфы определяли вместе с межстворчатой жидкостью, которая выделяется при вскрытии раковин моллюсков в первые 5 мин. Мягкие ткани использовали для получения гидролизата, а гемолимфу — для выделения аминокислот.

Лабораторная обработка проб

Свободные аминокислоты (САК) гемолимфы очищали от белковых продуктов, добавляя этанол до конечной концентрации 70% [23]. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 8000 об/мин. Супернатант упаривали при температуре 60°C на роторном испарителе IKA RV10 в вакууме с разряжением от -720 до -800 мбар. Осадок смывали со стенок колбы минимальным объемом раствора соляной кислоты в концентрации 15 mM HCl . Гидролиз мягких тканей проводили 1% раствором щелочи в (NaOH , хч) течение 3 ч по методике [24]. Гидролизат упаривали в 2–3 раза по объёму при температуре 80°C на роторном испарителе под вакуумом от -700 до -760 мбар. Свободные аминокислоты экстрагировали 70% раствором этанола, как и из гемолимфы. Затем пробы повторно центрифугировали и упаривали при тех же условиях, что и образцы гемолимфы, и смывали со стенок колбы минимальным объемом 15 mM HCl . Образцы помещали в стерильный флакон объемом 10 см^3 , запечатывали резиновой пробкой с алюминиевым колпачком и в таком виде отправляли для аминокислотного анализа.

Весовые характеристики определяли гравиметрическим методом, используя аналитические весы AXIS AGN200 (Класс точности по ГОСТ OIML R76–1–2011–1, предел взвешивания (max), кг – 0.2, (min), кг – 0.00001, дискретность, г – 0.001). Данные измерений приведены в работе в граммах и массовых долях.

Содержание сухих веществ определяли, высушивая пробы до постоянного веса при $103 \pm 2^\circ\text{C}$ в сушильном шкафу, до разницы в массе между двумя последующими взвешиваниями не более 0.001 г. Определения проводили в 2 повторностях, за окончательный результат принимали среднее арифметическое полученных значений, расхождение результатов не должно превышать 0.5% [23].

Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования (методом Серенсена) [25].

Определение аминокислот в пробах

Аминокислотный состав в пробах определяли на аминокислотном анализаторе ARACUS (производства MembraPure, ФРГ) в НИЛ нанобиотехнологии и биофизики СКФУ (Ставрополь, Россия) и НИЛ прикладных проблем биологии БГУ (Минск, Беларусь) с разделением аминокислот на колонке High Resolution длиной 125 мм с использованием буферных систем производителя на основе солей и гидроксида лития, с последующим окрашиванием выходных фракций нингидрином и детектированием на двухканальном матрично-диодном спектрофотометре комплексов нингидрин-аминокислота при длинах волн 570 нм и 440 нм. Идентификацию и количественное содержание аминокислот в пробах выполняли с привлечением программного обеспече-

ния AminoPeak. Данные получали в размерности нМоль, нг/мл и мг/100 мл. Для сопоставления полученных результатов использовали данные по аминокислотному составу гемолимфы и мягких тканей мидии *M. galloprovincialis* и мягких тканей рапаны *R. venosa* [26].

Статистический анализ

Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Для исследования нормальности распределения использован критерий Пирсона, рассчитанный в программе Excell (Microsoft Office 2010). Так как выборки не являются равноразмерными, то для выяснения достоверности различий средних значений в двух независимых выборках использовали непараметрический статистический критерий Манна–Уитни [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В составе САК гемолимфы и гидролизате мягких тканей анадары идентифицировано 16 протеиногенных аминокислот, однако их содержание варьируется как в зависимости от насыщения воды кислородом, так и от их локализации в организме.

В гемолимфе моллюсков в условиях нормоксии отмечено высокое содержание пролина (23.04 мг/100 мл) и гистидина (17.67 мг/100 мл), аспарагиновой (14.67 мг/100 мл) и глутаминовой (12.29 мг/100 мл) кислот, а также аргинина (10.62 мг/100 мл), что отражено на рис. 1. Под воздействием гипоксии у них резко возрастает концентрация аргинина в гемолимфе (28.56 мг/100 мл) при существенном снижении содержания остальных аминокислот. При этом почти вчетверо снижается содержание аспарагиновой (3.84 мг/100 мл)

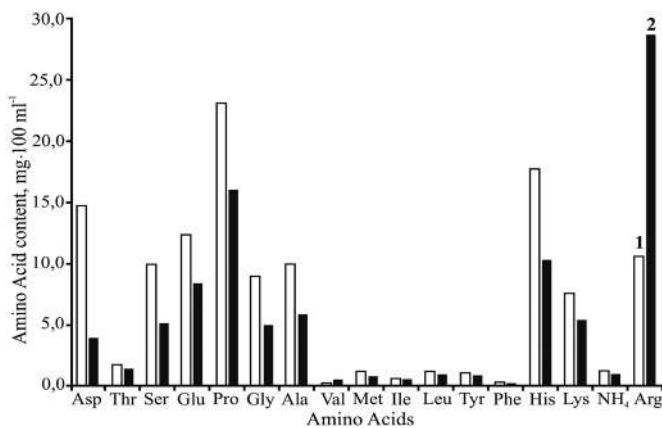


Рис. 1. Содержание свободных аминокислот в гемолимфе анадары *Anadara kagoshimensis* при нормоксии (1) и гипоксии (2).

Примечание. Глутамин и аспарагин в процессе разделения в кислой среде разлагаются на глутаминовую и аспарагиновую кислоты, поэтому на хроматограмме появляется пик аммиака (см. рис. 1, 2, 3).

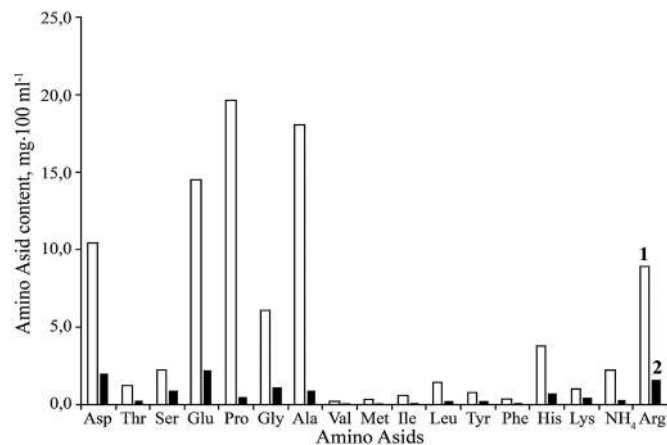


Рис. 2. Аминокислотный состав гидролизатов мягких тканей *Anadara kagoshimensis* при нормоксии (1) и гипоксии (2).

и в полтора раза глутаминовой (8.27 мг/100 мл) кислот, также существенно уменьшаются концентрации серина, глицина, аланина, пролина, гистидина и лизина (рис. 1).

В гидролизате мягких тканей в условиях нормоксии также отмечено высокое содержание пролина (19.65 мг/100 мл), глутаминовой (14.50 мг/100 мл) и аспарагиновой (10.47 мг/100 мл) кислот, аргинина (8.93 мг/100 мл), а также глицина (6.10 мг/100 мл) и гистидина (3.77 мг/100 мл). Также почти вдвое выше содержание аммиака (2.23 мг/100 мл), что свидетельствует о большем содержании в мягких тканях аспарагина и глутамин, по сравнению с гемолимфой (1.31 мг/100 мл, рис. 2).

Об усиленном катаболизме белков и аминокислот в условиях гипоксии свидетельствует снижение количества свободных аминокислот в гидролизате моллюсков в 2–6 раз, по сравнению с нормальными условиями, для пролина падение составляет в 40 раз, а для метионина, фенилаланина и аланина — от 17 до 19 раз (рис. 2).

Количественные показатели аминокислот в гемолимфе и гидролизате мягких тканей анадары, содержащейся в условиях нормоксии, значительно отличаются от данных, полученных на животных при гипоксии (табл. 1).

Для оценки возможностей использования анадары в качестве БАД и влияния условий выращивания определены весовые характеристики моллюсков и гидролизатов из них, а также содержание аминного азота в гемолимфе и мягких тканях моллюска, данные приведены в табл. 2–4. Соотношение сырой массы створка/мягкие ткани/гемолимфа в условиях нормоксии составляет 57.4:23.9:18.7% (табл. 2). В условиях гипоксии, когда анаэробные процессы катаболизма белков и аминокислот преобладают над синтезом, у анадары изменяется соотношение створка/мягкие ткани/гемолимфа — 67.8:14.2:18.0%. При гипоксии отмечено снижение массы мягких тканей почти вдвое по сравнению

Таблица 1. Содержание аминокислот в гемолимфе и гидролизатах мягких тканей *Anadara kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии (в мг на 100 мл)

Аминокислота	Нормоксия		Гипоксия	
	Гемолимфа	Гидролизат	Гемолимфа	Гидролизат
Аспарагиновая кислота	14.67	10.47	3.84	1.98
Треонин	1.68	1.27	1.37	0.29
Серин	9.99	2.23	5.11	0.89
Глутаминовая кислота	12.29	14.50	8.27	2.25
Пролин	23.04	19.65	15.92	0.46
Глицин	8.90	6.10	4.94	1.10
Аланин	9.99	18.04	5.77	0.92
Валин	0.24	0.25	0.45	0.08
Метионин	1.22	0.34	0.72	0.02
Изолейцин	0.61	0.59	0.58	0.12
Лейцин	1.19	1.47	0.90	0.24
Тирозин	1.09	0.83	0.88	0.25
Фенилаланин	0.29	0.35	0.26	0.02
Гистидин	17.67	3.77	10.24	0.74
Лизин	7.55	1.05	5.36	0.45
Аммиак	1.31	2.23	0.97	0.34
Аргинин	10.62	8.93	28.56	1.67
Общее количество	122.35	92.07	94.14	11.82

с контролем (в пересчете на сухой вес — 4.7 и 8.2%, соответственно) (табл. 2). В зависимости от стадии развития и возраста доля мягких тканей может варьировать от 24 до 36% сырой массы моллюска.

Весовые показатели моллюсков и гидролизатов из них приведены в табл. 3. Так, в условиях нормоксии, при соотношении массовых долей створок и мягких тканей в фарше из анадар в пропорции 55.5:44.5% выход гидролизата по содержанию

Таблица 2. Весовые показатели анадары *Anadara kagoshimensis* в условиях нормоксии и гипоксии

Образец	Сырая масса, г	Влажность, %	Сухая масса, г	Сырая масса, %	Сухая масса, %
При нормоксии:					
Створка	36.57 ± 0.04	2.7	35.58 ± 0.21	57.4	91.5
Мягкие ткани	15.22 ± 0.47	79.1	3.18 ± 0.08	23.9	8.2
Гемолимфа	11.90 ± 0.28	98.9	0.13 ± 0.01	18.7	0.3
Целиком	63.68	38.9	38.9	100.0	100.0
При гипоксии:					
Створка	21.07 ± 0.04*	2.7	20.50 ± 0.03*	67.8	95.0
Мягкие ткани	4.40 ± 0.02*	76.8	1.02 ± 0.04*	14.2	4.7
Гемолимфа	5.59 ± 0.03*	98.9	0.06 ± 0.02*	18.0	0.3
Целиком	31.06	30.5	21.58	100.0	100.0

Примечание. * — статистически значимые различия по критерию Манна–Уитни $U < U_{cr}$ ($U = 0$, $U_{cr} = 8$). $\chi^2 = 40.18$ вероятность распределения $p < 0.001$; асимметрия $A_s = 1.277$; эксцесс $E_x = 0.134$. Асимметричная форма распределения указывает на отклонение распределения от нормального. В контрольной группе: $n = 10$, в экспериментальной: $n = 5$.

Таблица 3. Весовые показатели фарша и гидролизатов из анадары *Anadara kagoshimensis* в зависимости от условий содержания моллюсков

Образец	Сырая масса, г	Массовая доля от массы фарша, %	Сухая масса, г	Влажность, %	Объем гидролизата, мл	Массовая доля сухих веществ, %
При нормоксии:						
Створка	46.40 ± 0.11	55.5	45.85 ± 0.11	1.2		
Мягкие ткани	37.24 ± 0.10	44.5	7.79 ± 0.02	79.1		
Фарш целиком	83.64	100.0	53.64	35.9	156	4.9
При гипоксии:						
Створка	17.80 ± 0.06*	57.8	17.60 ± 0.06*	1.1		
Мягкие ткани	12.99 ± 0.06*	42.2	2.71 ± 0.01*	79.1		
Фарш целиком	30.79	100.0	20.31	34.0	78	3.9

Примечание. * — статистически значимые различия по критерию Манна–Уитни $U < U_{cr}$ ($U=0$, $U_{cr}=8$). В контрольной группе: $n=10$, в экспериментальной: $n=5$.

сухих веществ составил 4.9%. В условиях гипоксии при соотношении массовых долей створок и мягких тканей в фарше из моллюсков 57.8:42.2%, выход составил — 3.9%, соответственно (табл. 3).

Оценка влияния условий гипоксии на накопление аминного азота в гидролизате из анадары приведена в таблице 4. В условиях нормоксии массовая доля аминного азота в гемолимфе моллюска составляет 8.78%, при гипоксии — 6.40% от массы сухого вещества. При нормоксии содержание аминного азота в гидролизате составляет 1.84% от массы сухого вещества, а в условиях гипоксии снижается до 0.34% (табл. 4).

Оценка влияния условий гипоксии на спектр САК в гидролизате из анадары приведена в таблице 5. В состоянии нормоксии соотношение пула

Таблица 4. Показатели аминного азота в гемолимфе и гидролизате из анадары *Anadara kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии, в пересчете на массу сухого вещества, в зависимости от условий содержания моллюсков

Образец	Объем, мл	Содержание сухих веществ, г	Массовая доля аминного азота, в %	Концентрация $N_{амин.}$, г/мл	Содержание $N_{амин.}$, г
Гемолимфа (нормоксия)	9.4	0.13	8.78	0.0012	0.0115
Гемолимфа (гипоксия)	4.6	0.06	6.40	0.0009	0.0040
Гидролизат (нормоксия)	156	7.79	1.84	0.0009	0.1436
Гидролизат (гипоксия)	78	2.71	0.34	0.0001	0.0092

Примечание. * — В контрольной группе: $n=10$, в экспериментальной: $n=5$.

алифатических, основных и ароматических аминокислот у анадары составило 2:1:0.1, а при гипоксии — 1:1.5:0.2. Отмечено, что при гипоксии происходит перераспределение аминокислотного состава, так пул алифатических аминокислот уменьшается вдвое, при этом вдвое увеличивается содержание ароматических аминокислот и в полтора раза увеличивается содержание основных аминокислот, в основном за счет аргинина (табл. 5).

Таблица 5. Содержание свободных аминокислот в гидролизате из анадары *Anadara kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии

Аминокислоты	При нормоксии, %	При гипоксии, %
Пролин	21.35	3.93
Гистидин	4.09	6.27
Нейтральные	3.81	9.98
Дикарбоновые	27.11	16.76
Серосодержащие	0.37	0.20
Алифатические	28.73	20.81
Основные	10.84	17.93
Ароматические	1.28	2.27
$S_{алиф.}/S_{основ.}/S_{ароматич.}$ *	2:1:0.1	1:1.5:0.2

Примечание. * — соотношение суммы аминокислот — алифатические: основные: ароматические. К алифатическим аминокислотам относятся — аланин, валин, глицин, изолейцин и лейцин; к основным — лизин, аргинин; к ароматическим — тирозин, триптофан и фенилаланин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние гипоксии на состав САК гемолимфы

В составе САК *A. kagoshimensis* отмечено высокое содержание дикарбоновых и основных кислот, что подтверждается аналогичными исследованиями для другого вида анадары *Anadara broughtoni*

[28, 29]. Под воздействием гипоксии в составе аминокислот гемолимфы *A. kagoshimensis* отмечено резкое возрастание концентрации аргинина при существенном снижении содержания остальных аминокислот. При этом снижается содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот почти вдвое, также существенно уменьшаются концентрации серина, глицина и аланина. Отмечены низкие концентрации алифатических аминокислот, метионина и тирозина, практическое отсутствие цистеина и фенилаланина, что характерно и для *A. broughtoni* [29].

Вид *A. kagoshimensis* содержит значительные концентрации гистидина и пролина, в отличие от *A. broughtoni*. Поскольку гистидин выполняет функцию гасителя синглетного молекулярного кислорода, то в гемолимфе моллюска он может использоваться как водорастворимый сквенджер гидроксильного радикала [30]. Кроме того, гистидин входит в молекулу гемоглобина до 10% состава аминокислот [31]. Также гистидин включается в состав гистидиновых дипептидов, участвующих в антиоксидантной системе защиты моллюсков, сходных по строению с карнозином и его производными [32]. Роль пролина в анадаре пока не ясна, однако высокое содержание пролина отмечено также и в мантии другого моллюска — кальмара [28].

Для сравнения с данными, полученными нами ранее [26], приведем содержание массовых долей аминокислот в моллюсках Чёрного моря, обитающих в обычных условиях, и в анадаре (рис. 3). Существенным отличием состава САК гемолимфы анадары от мидии или рапаны является повышенная концентрация пролина и гистидина, содержание которых в анадаре в несколько раз выше, чем

у мидии и рапаны. Также отмечены высокие концентрации аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые также участвуют в процессе катаболизма аминокислот и переносе аммиака из мышечной ткани в гепатопанкреас. Также в анадаре выше содержание основных аминокислот — лизина и аргинина, а также серина (рис. 3). Мидия является богатым источником таурина, алифатических аминокислот — глицина и аланина, серосодержащих аминокислот — цистеина и метионина, а также ароматической аминокислоты — фенилаланина (рис. 3). Рапана отличается высоким содержанием дикарбоновых — аспарагиновой и глутаминовой кислот и основных аминокислот — лизина и аргинина, алифатических аминокислот — валина, лейцина, изолейцина, глицина, ароматических аминокислот — тирозина и фенилаланина, а также метионина, треонина и ГАМК (рис. 3).

Учитывая высокое содержание цитруллина и аргинина [29], увеличение концентрации аргинина почти в три раза при гипоксии может указывать на активизацию цикла орнитина [33], при усилении катаболизма белков и аминокислот, что характерно для моллюсков в условиях гипоксии [34]. Заметим, что у анадары, по сравнению с мидией, накапливается значительное количество мочевины [35].

В наших исследованиях таурин не определяли, однако известно, что это производное метионина составляет в анадаре до 50% от суммы САК [28]. Данное обстоятельство делает анадару перспективным источником для получения БАД, поскольку таурин обладает огромным спектром метаболического действия от детоксикационной функции печени, регуляции кровяного давления, влияния на зрение, до кардиопротективного действия, нейро-

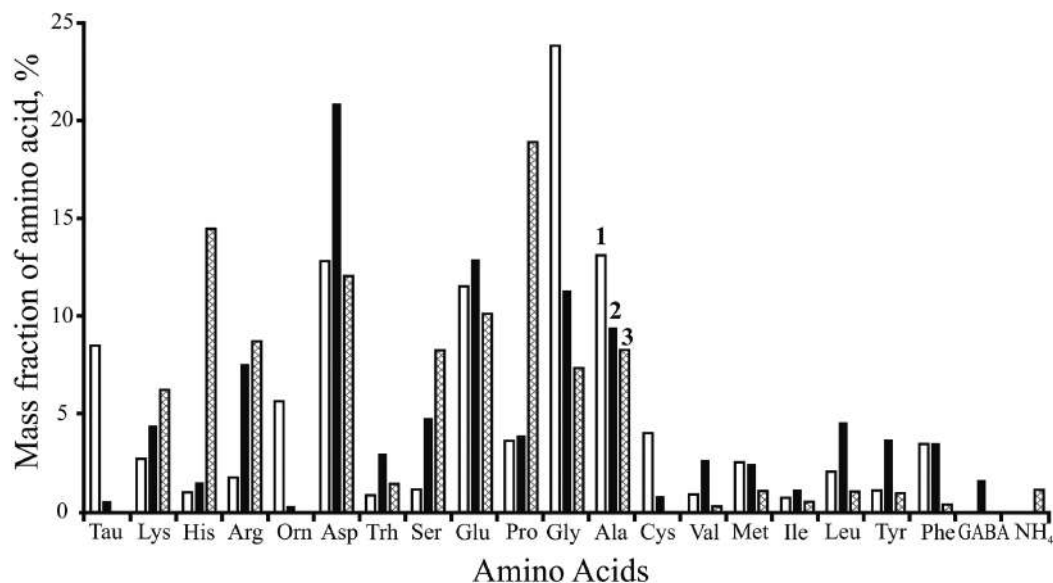


Рис. 3. Содержание свободных аминокислот (массовая доля от общего количества в %) в моллюсках Чёрного моря в условиях нормоксии, где 1 — аминокислоты гемолимфы и мягких тканей мидии *Mytilus galloprovincialis* [26], 2 — аминокислоты мягких тканей рапаны *Rapana venosa* [26], 3 — аминокислоты гемолимфы анадары *Anadara kagoshimensis*.

медиаторной функции и работы головного мозга [36, 37].

Отсутствие цистеина в составе САК анадары, возможно, связано с его активным использованием при синтезе глутатиона, имеющим важное значение в антиоксидантной защите моллюска, о чем свидетельствуют как наличие высокоактивного фермента γ -глутамилтрансферазы (ГГТП, 2.3.2.2) в гепатопанкреасе, так и высокие концентрации глутатиона в ноге [10, 35].

Снижение содержания отдельных видов аминокислот составляет от 2 до 6 раз, что, безусловно, отразится на качестве БАД из гидролизатов и их функциональной и биологической активности, поскольку комплекс САК является антиоксидантом и влияет на иммунитет и другие функции организма человека [39].

Очевидное преобладание в аминокислотном составе анадары по сравнению с мидией и рапаной такого низкомолекулярного скавенджера гидроксильного радикала, как гистидин, и трехкратное возрастание концентрации аргинина, указывает на активизацию цикла орнитина и усиленный синтез такого низкомолекулярного антиоксиданта, как мочевина. Это, безусловно, свидетельствует о наличии мощного низкомолекулярного звена антиоксидантной защиты у анадары, что и позволяет ей выживать в тех условиях, где аборигенные виды уже не могут существовать. Таким образом, можно констатировать, что различия аминокислотного состава анадары и мидии предопределяют успех инвазии анадары в Азово-Черноморский регион в сочетании с отличиями в работе ферментативного звена антиоксидантной защиты.

Влияние гипоксии на состав САК гидролизатов мягких тканей анадары

Изменения в составе САК подтверждают наши предположения об усилении катаболизма белков в тканях моллюсков. При этом в гемолимфе наблюдается усиление работы цикла орнитина, о чем свидетельствует высокая концентрация аргинина. По-прежнему остаются достаточно высокими концентрации пролина и гистидина (табл. 1). Последний, как известно, является основным низкомолекулярным антиоксидантом и участвует в синтезе гистидиновых дипептидов. Потеря азотистых веществ свидетельствует о негативном воздействии гипоксии на анадару, вынужденном переходе к катаболизму белков и аминокислот для поддержания метаболических процессов за счет использования аминокислот (табл. 4), как субстрата в метаболических путях выработки высокоэнергетических соединений в условиях гипоксии [40]. В этих условиях, когда анаэробные процессы катаболизма белков и аминокислот преобладают над синтезом,

изменяется соотношение створка / мягкие ткани. Так, доля мягких тканей анадары при гипоксии составила менее 60% от содержания мягких тканей в моллюске при нормоксии (см. табл. 2).

Снижение содержания аминного азота и содержания САК в гидролизате мягких тканей от 2 до 6 раз в условиях гипоксии свидетельствует о необходимости контролировать условия обитания анадары, чтобы обеспечить получение гидролизата высокого качества, содержащего сбалансированный набор аминокислот. Таким образом, условия гипоксии, безусловно, оказывают влияние на ценность мяса моллюсков, как пищевого объекта и источника получения биологически активных веществ.

Поэтому необходимо изучать годовую динамику изменения массы тканей и условий культивирования анадары, в том числе проводить контроль концентрации кислорода в воде, поскольку эти показатели будут отражаться на содержании белковых, азотистых и сухих веществ в моллюсках и на качестве гидролизатов из них.

Влияние гипоксии на энергетический обмен

Аноксия негативно влияет на энергетический статус тканей анадары, что выражается в снижении содержания в них АТФ и АДФ, а также в уменьшении значений аденилатного энергетического заряда (АЭЗ), фосфорильного потенциала (ФП). Известно, что в первые часы острой кислородной недостаточности уровень АТФ и АДФ снижается на 30–50%, при этом АЭЗ снижается до 0.4 единиц. Это связано либо с развитием компенсационных процессов, обеспечивающих аэробный путь, либо с переключением метаболизма на анаэробный путь. При этом данные изменения сохраняются достаточно длительно, что показывает адаптивный характер низкого энергетического статуса анадары [15, 17]. Поэтому можно предположить, что изменения состояния аденилатного пула ткани моллюска функционально достаточны для обеспечения суббазальных скоростей метаболизма. Реальная ситуация, вероятно, регулируется, с одной стороны, потребностью организма анадары в АТФ, с другой, уровнем перекисного окисления липидов (ПОЛ) и концентрацией активных форм кислорода (АФК), и ёмкостью антиоксидантной защиты. Именно катаболизм белков и аминокислот в гепатопанкреасе, по-видимому, обеспечивает в условиях гипоксии субстраты для цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и цикла орнитина, что позволяет моллюску сохранять двигательную активность и гаметогенез на уровне, необходимом для выживания анадары.

Полагаем, что именно сопряжение катаболизма аминокислот и белка с ЦТК и циклом орнитина в митохондриальном матриксе служит осно-

вой метаболической пластичности и устойчивости анадады к стрессовым изменениям концентрации кислорода в среде, которые мы отразили в предполагаемой схеме сопряжения работы этих циклов (оригинальный рис. 4а, б).

Неслучайным выглядит компартиментализация пусковых реакций циклов Кребса и мочевины, катализируемых глутаматдегидрогеназой (ГДГ, 1.4.1.2) глутаматдегидрогеназного комплекса (ГДГК), пируватдегидрогеназным комплексом (ПДГК) и карбамоилфосфатсинтетазой (КМФС, 6.3.4.16) в митохондриальном матриксе. Перенос аммиака через митохондриальную мембрану в виде аланина, катализируемый цитозольным пулом аланинаминотрансферазы (АлАТ, 2.6.1.2), реализует сразу две задачи — утилизацию аммиака из цитозоля и блокировку восстановления пирувата в лактат, катализируемую лактатдегидрогеназой (ЛДГ, 1.1.1.27), предотвращающей закисление цитозоля [10].

Внутри митохондрии АлАТ катализирует обратную реакцию с переносом NH_2 группы на α -кетоглутарат и образованием пирувата, декарбоксилируемого ПДГК с образованием Ацетил-КоА и CO_2 . Ацетил-КоА запускает ЦТК, где ферменты в ходе дегидрогеназных реакций окисляют ацетат до CO_2 и вырабатывают АТФ. А глутаматдегидрогеназа ГДГК высвобождает NH_3 для синтеза карбамоилфосфата и запуска цикла орнитина [41].

Изменения состава САК гемолимфы под действием гипоксии в сторону активного накопления продуктов цикла орнитина — накопления аргинина, который является аллостерическим активатором N-ацетилглутаматсинтазы (2.3.1.1), синтезирующей в митохондриях N-ацетил-глутамат, который является аллостерическим активатором карбамоилфосфатсинтазы (КМФС, 6.3.4.16), ключевого фермента в запуске орнитинового цикла. Известно, что в условиях голодания, когда катаболизм белков усиливается, увеличивается продукция аммиака. При этом индуцируется синтез ферментов цикла орнитина. Поскольку аммиак активно связывает в митохондриях протон водорода и превращается в ион аммония, который не может пройти через митохондриальную мембрану. Это тормозит работу цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), что в условиях гипоксии оказывает губительное действие на продукцию аденозинтрифосфата (АТФ) [41].

В цикле мочевины синтезируются также промежуточные субстраты ЦТК — фумарат, который цитозольной малатдегидрогеназой (МДГ, 1.1.1.37) обращается в малат, который, в свою очередь, переносится из цитозоля в митохондриальный пул малата и окисляется в оксалоацетат [10]. Оксалоацетат может образовываться в цитозоле из гликолитического пути и превращаться фосфоенолпируваткар-

боксилазой (ФЕПМК, 2.7.1.40) из фосфоенолпирувата, что также является ключевым ферментом сопряжения гликолиза с ЦТК и другими анаплеротическими путями [35]. Оксалоацетат может трансминироваться аспартатаминотрансферазой (АсАТ, 2.6.1.1) в аспартат, который участвует в образовании аргининсукцината в цикле орнитина.

Такое многоточечное сопряжение катаболизма углеводов, белков с производством АТФ в ЦТК и получением низкомолекулярного антиоксиданта мочевины в цикле орнитина позволяет анададе легко адаптироваться в условиях гипоксии и даже частично обращать ЦТК в обратном направлении от оксалоацетата до сукцината [35]. При этом не происходит значительной потери в выработке АТФ, что позволяет обеспечить ключевую реакцию цикла орнитина — синтез карбамоилфосфата, требующего 2 молекулы АТФ. При обращении ЦТК от оксалоацетата к сукцинату происходит потеря выработки НАДН и H^+ на митохондриальной МДГ, а НАДН с глутаматдегидрогеназного комплекса (ГДГК) используется для восстановления FAD^+ в FADH_2 , образовавшегося в результате фумаратдегидрогеназной реакции и производством АТФ. Таким образом, выработка АТФ в условиях гипоксии может снизиться вдвое по сравнению с нормоксией через частичное обращение ЦТК, происходящее через изменения, отраженные в уравнении 2 энергетического баланса по окислению ацетатного двухуглеродного фрагмента (табл. 6).

Взаимосвязь метаболизма аминокислот и энергетического обмена анадады

Реорганизация тканевого метаболизма на защиту организма от стресса всегда сопровождается кратковременным увеличением количества АФК [42, 43]. Одним из механизмов регуляции повышения уровня АФК выступает синтез мочевины в орнитиновом цикле и направленный на его обеспечение катаболизм белков и аминокислот в гепатопанкреасе анадады [10, 35, 40]. Мочевина выступает в роли низкомолекулярного антиоксиданта, который вступает в реакции с АФК и снижает ПОЛ [14]. Мочевина легко проникает через мембрану эритроцитов и связывается с гемоглобином [44], что приводит к сокращению числа железосодержащих центров ПОЛ и стабилизации мембраны эритроцитов, реализуя тем самым антиоксидантные функции.

Полагаем, что именно сопряжение катаболизма белка и аминокислот с циклом орнитина и ЦТК в митохондриальном матриксе служит основой метаболической пластичности и устойчивости анадады к стрессовым изменениям концентрации кислорода в среде. Компартиментализация пусковых реакций орнитинового цикла, ЦТК и катаболизма

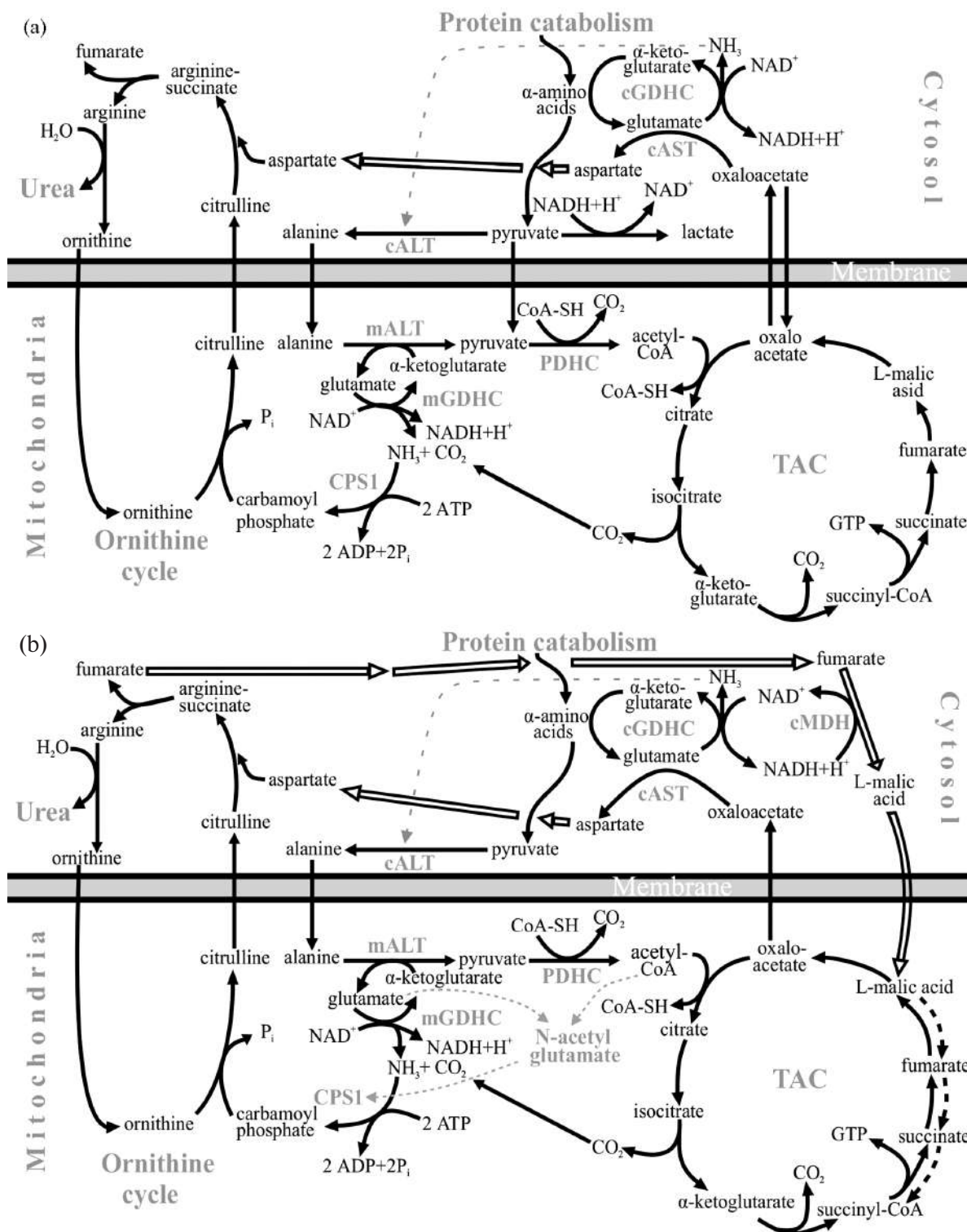


Рис. 4. Схема взаимосвязи катаболизма аминокислот с работой цикла Кребса и циклом мочевины. (а) – В условиях нормоксии, (б) – в условиях гипоксии, которые обеспечивают приспособление анадара *Anadara kagoshimensis* к условиям Черного и Азовского морей (черными стрелками указаны типичные метаболические пути; серым пунктиром – стадии переноса аммиака из цитозоля в митохондрию и в цикл орнитина; двойными стрелками – стадии, сопрягающие работу ЦТК (ТАС) и производящего макроэргических соединений с утилизацией аммиака в цитозоле и синтезом мочевины в цикле орнитина, черные пунктирные – обращенные стадии ЦТК). Использованы следующие обозначения: сGDHC и mGDHC – цитозольный и митохондриальный глутаматдегидрогеназный комплекс, соответственно; сALT и mALT – цитозольный и митохондриальный пул аланинаминотрансферазы; CPS1 – карбамоилфосфатсинтетаза; сAST – цитозольный пул аспаратаминотрансферазы; сMDH – цитозольный пул малатдегидрогеназы; ТАС – цикл трикарбоновых кислот (оригинальная схема составлена Голубь Н.А.).

Таблица 6. Генерация АТФ в цикле трикарбоновых кислот в сопряжении с циклом мочевины у анадары *A. kagoshimensis* при нормоксии и гипоксии

Нормоксия	Гипоксия
1. Pyruvate + CoA-SH + NAD ⁺ → Ac-CoA + NADH + H ⁺ + CO ₂ (катализируется ПДГК)	1. Pyruvate + CoA-SH + NAD ⁺ → Ac-CoA + NADH + H ⁺ + CO ₂ (катализируется ПДГК)
2. Ac-CoA + 3NAD ⁺ FAD ⁺ + GDP + P _i + H ₂ O → 2CO ₂ + 3NADH + FADH ₂ + GTP + 2H ⁺ + CoA-SH	2. Ac-CoA + 2NAD ⁺ + FAD ⁺ + GDP + ADP + 2P _i + H ₂ O → 2CO ₂ + NAD ⁺ + NADH + FADH ₂ + GTP + ATP + 2H ⁺ + CoA-SH
3. GTP + ADP ↔ ATP + GDP	3. GTP + ADP ↔ ATP + GDP
4. 3NADH + FADH ₂ + 2H ⁺ + 0,5O ₂ + 12ADP + GTP + 11 P _i → 12ATP + 3NAD ⁺ + FAD ⁺ + GDP + H ₂ O	4. NADH + FADH ₂ + 2H ⁺ + 0,5O ₂ + 6ADP + GTP + 5 P _i + ATP → 7 ATP + NAD ⁺ + FAD ⁺ + GDP + H ₂ O
Суммарно для трех молекул аланина выработка АТФ составляет	
36 ATP + GDP	21 ATP + GDP
5. 3 Glutamate + 3NAD ⁺ → 3α-ketoglutarate + 3NADH + 3NH ₃ + 3H ⁺	5. 3 Glutamate + 3NAD ⁺ → 3α-ketoglutarate + 3NADH + 3NH ₃ + 3H ⁺
6. 3CO ₂ + 3NH ₃ + 6ATP → 3 CO(NH ₂) ₂ + 6ADP + 6P _i	6. 3CO ₂ + 3NH ₃ + 6ATP → 3 CO(NH ₂) ₂ + 6ADP + 6P _i
Итого за вычетом АТФ на цикл орнитина: 36 ATP – 6 ATP = 30 ATP	Итого за вычетом АТФ на цикл орнитина: 21 ATP – 6 ATP = 15 ATP

аминокислот, катализируемых глутаматдегидрогеназой (ГДГ, 1.4.1.2), пируватдегидрогеназным комплексом (ПДГК) и карбамоилфосфатсинтетазой (КМФС, 6.3.4.16) в митохондриальном матриксе предотвращает превращение токсичного аммиака в аммоний-ион, ингибирующий работу ЦТК.

Перенос аммиака через митохондриальную мембрану в виде аланина, катализируемый цитозольным пулом АлАТ (2.6.1.2), реализует сразу две задачи — утилизацию аммиака из цитозоля и блокировку восстановления пирувата в лактат, катализируемую лактатдегидрогеназой (ЛДГ, 1.1.1.27), предотвращающей закисление цитозоля [10]. Поскольку закисление цитозоля приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, набуханию митохондрий, потери целостности мембран и дегградации митохондрий, а в целом и к гибели моллюсков. Таким образом, показано физиологическое значение низкомолекулярного звена водорастворимых скавенджеров гистидина, глутатиона и мочевины, которые решают задачу оперативного реагирования и регуляции уровня АФК в тканях анадары.

Наличие не только ферментативного звена в антиоксидантной защите, но и низкомолекулярных водорастворимых скавенджеров типа глутатиона, мочевины и аминокислот, а также значительных концентраций каратиноидов способствуют устойчивому распространению вида-вселенца *A. kagoshimensis* из-за получения существенного преимущества перед местными видами двустворчатых моллюсков [45–47]. Кроме того, этому способствует наличие эритроцитарного гемоглобина [7] и значительное содержание каротиноидов в тка-

нях анадары [45]. Все это в комплексе позволяет анадаре выживать в условиях гипоксии и аноксии до 16 сут, что значительно дольше, по сравнению с другими двустворчатыми моллюсками, в частности, в 5–6 раз дольше, чем мидии [35, 48].

Из-за своих биохимических особенностей анадара легко приспособилась к жизни на шельфе Черного и Азовского морей, особенно подверженном терригенному стоку и заиливанию. Моллюск занимает доминирующее положение в бентосных сообществах, адаптируясь к значительным колебаниям кислорода в среде [19]. Это способно сделать его в ближайшем будущем объектом промысла и конхиокультуры на Чёрном море, что позволит получать из нее БАД и функциональные продукты питания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во вселенце в Чёрное и Азовское моря анадаре *Anadara kagoshimensis* найдены 16 протеиногенных аминокислот. В условиях гипоксии метаболизм моллюска реорганизуется в направлении анаэробного катаболизма белков и аминокислот, как источника получения субстратов для цикла трикарбоновых кислот и цикла орнитина. Это приводит к значительному накоплению субстратов, активирующих последний, в частности аргинина, являющегося аллостерическим активатором реакций цикла орнитина и накоплению мочевины в качестве низкомолекулярного антиоксиданта.

Отмечены высокие концентрации гистидина и пролина в гемолимфе и мягких тканях моллюска. Таким образом, у анадары, по сравнению с миди-

ей, выявлены отличия в аминокислотном составе САК и отмечена стимуляция цикла орнитина в условиях гипоксии, которые позволяют ей оперативнее реагировать на изменения уровня АФК. У анадары более развито низкомолекулярное звено антиоксидантной защиты, что позволяет моллюску успешно осваивать экологические ниши, недоступные аборигенным видам. Условия гипоксии снижают долю мягких тканей анадары в соотношении створка/ мягкие ткани/ гемолимфа почти вдвое по сравнению с нормальными условиями обитания, что приводит к ухудшению показателей гидролизатов по содержанию общего азота (белка), сухих веществ, аминного азота и по составу свободных аминокислот. Такие условия содержания моллюсков могут неблагоприятно влиять на накопление, в частности, свободных аминокислот, что скажется на качестве, получаемых на основе гидролизатов из анадары биологически активных добавок. Физиологические и биохимические особенности метаболизма этого вида-вселенца делают его перспективным объектом промысла и конхиокультуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н. А.В. Бородиной за предоставление моллюсков, находящихся в экспериментальных условиях нормоксии и гипоксии.

У.О. Курзенковой за редакцию рисунков в векторной графике и к. м. н. Е.А. Бочаровой за редакционную правку текста и источников литературы.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (Н.А.Г.), планирование эксперимента и определение задач (Н.А.Г., А.А.С., В.И.Р.), постановка эксперимента (Н.А.Г., А.А.С.), определение аминокислот (В.П.К., Е.В.Б.), обработка данных (Н.А.Г., А.В.К., Е.В.Б.), написание и редактирование манускрипта (Н.А.Г., А.А.С., В.И.Р., А.В.К., В.П.К., Е.В.Б.)

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по темам госзадания ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0 и № 121041400077-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katsanevakis S, Gatto F, Zenetos A, Cardoso AC (2013) How many marine aliens in Europe? Management Biol Invas 4(1):37–42. <https://doi.org/10.3391/mbi.2013.4.1.05>
2. Киселева МИ (1992) Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа. / Заика ВЕ, Киселева МИ, Михайлова ТВ и др. Многолетние изменения зообентоса Черного моря. Киев: Наук. думка. 84–99. [Kiseleva MI (1992) Comparative characteristics of bottom communities off the coast of the Caucasus. Long-term changes of the Black Sea zoobenthos. Kiev. Nauk. Dumka. 84–99. (In Russ)].
3. Анистратенко ВВ, Халиман ИА (2006) Двустворчатый моллюск *Anadara inaequalis* (Bivalvia, Arcidae) в северной части Азовского моря: завершение колонизации Азово-Черноморского бассейна. Вестник зоологии 40(6):505–511. [Anistratenko VV, Haliman IA (2006) Bivalve mollusc *Anadara inaequalis* (Bivalvia, Arcidae) in the Northern Part of the Sea of Azov: Completion of Colonization of the Azov-Black Sea Basin. Vestnik zoologii 40(6):505–511. (In Russ)].
4. Krapal AM, Popa OP, Levarda AF, Iorgu EI, Costache M, Crocetta F, Popa LO (2014) Molecular confirmation on the presence of *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Mollusca: Bivalvia: Arcidae) in the Black Sea. Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa" 57(1):9–12. <https://doi.org/10.2478/travmu-2014-0001>
5. Sahin C, Emiral H, Okumus I, Mutlu Gozler A (2009) The Benthic Exotic Species of the Black Sea: Blood Cockle (*Anadara inaequalis*, Bruguiere, 1789: Bivalve) and Rapa Whelk (*Rapana thomasiana*, Crosse, 1861: Mollusc). J Anim Veterin Adv 8(2):240–245.
6. Вялова ОЮ (2011) Современное состояние зооресурсов бентали Азово-Черноморского бассейна. Росто-вые, морфометрические и биохимические характеристики анадары *Anadara inaequalis* в Чёрном море (акватория Голубого Залива, ЮБК) / Болтачев АР, Зуев ГВ, Чесалин МВ и др. Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей. ЭКОСИ-Гидрофизика. 189–192. [Vjalova OJu (2011) The current state of bentali zoological resources of the Azov-Black Sea basin. Growth, morphometric and biochemical characteristics of *Anadara inaequalis* in the Black Sea (Blue Gulf area, SCK). Sevastopol'. JeKOSI-Gidrofizika. 189–192 (In Russ)].
7. Новицкая ВН, Солдатов АА (2011) Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики. Морський екологічний журнал 10(1):56–64. [Novickaja VN, Soldatov AA (2011) Erythroid elements of hemolymph in *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) under conditions of experimental anoxia: functional and morphometric characteristics. Morsk ekol zhurn 10(1):56–64. (In Russ)].
8. Borodina AV, Soldatov AA (2019) The Effect of Anoxia on the Content and Composition of Carotenoids in the

- Tissues of the Bivalve Invader *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Russ J Biol Invas 10(4): 307–314. <https://doi.org/10.1134/S2075111719040027>
9. Soldatov AA, Andreenko TI, Golovina IV, Stolbov AY (2010) Peculiarities of organization of tissue metabolism in mollusks with different tolerance to external hypoxia. J Evol Biochem Physiol 46(4): 341–349. <https://doi.org/10.1134/S0022093010040022>
 10. Golovina IV, Gostuykhina OL, Andreyenko TI (2016) Specific Metabolic Features in Tissues of the Ark Clam *Anadara kagoshimensis* Tokunaga, 1906 (Bivalvia: Arcidae), a Black Sea Invader. Russ J Biol Invas 7(2): 137–145.
 11. Gostuykhina OL, Andreenko TI (2020) Superoxide dismutase and catalase activities in tissues of the Black Sea bivalve mollusks *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789), *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) and *Mytilus galloprovincialis* Lam. as related to adaptation to their habitats. Journal of evolutionary biochemistry and physiology 56(2):113–124. <https://doi.org/10.1134/S0022093020020039>
 12. de Zwaan A, Babarro JMF, Monari M, Cattani O (2002) Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts. Comparative Biochemistry and Physiology Part A – Molecular and Integrative Physiology 131(3):615–624. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00513-x](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00513-x)
 13. Yao C, Somero GN (2013) Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: Cell cycle regulation and DNA repair. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and integrative physiology 165(2):159–168. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.024>
 14. Чеснокова НП, Понукалина ЕВ, Бизенкова МН (2006) Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. Успехи современного естествознания 7:29–36. [Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN (2006) Molekuljarno-kletochnye mehanizmy inaktivacii svobodnyh radikalov v biologicheskikh sistemah [Molecular and cellular mechanisms of free radical inactivation in biological systems]. Uspehi sovremennogo estestvoznaniya 7:29–36. (In Russ)].
 15. Soldatov AA, Sysoeva IV, Sysoev AA, Andreenko TI (2010) Adenylate system of tissues of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis* under experimental anoxia. Hydrobiol J 46: 60–67. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v46.i5.70>
 16. Golovina IV. (2019) Resistance to negative effects and the ratio of energy metabolism enzyme activity in tissues of the Black Sea molluscs *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Marine Biol J 4(3): 37–47. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.3.04>
 17. Soldatov AA, Golovina IV, Kolesnikova EE, Sysoeva IV, Sysoev AA (2022) Effect of Hydrogen Sulfide Loading on the Activity of Energy Metabolism Enzymes and the Adenylate System in Tissues of the *Anadara kagoshimensis* Clam. Inland Water Biol 15(5): 632–640. <https://doi.org/10.1134/S1995082922050194>
 18. Revkov NK (2016) Colonization's features of the Black Sea basin by recent invader *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). Marine Biol J 1(2): 3–17. <https://doi.org/10.21072/MBJ.2016.01.2.01>
 19. Ревков НК, Щербань СА (2017) Особенности биологии двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* в Черном море. Экосистемы 9(39): 47–56. [Revkov NK, Shherban' SA (2017) The biology of the bivalve *Anadara kagoshimensis* in the Black sea. Jekosistemy 9(39): 47–56. (In Russ)].
 20. Dağtekin M, Dalgıç G, Erbay M, Akpınar İÖ, Aydın M, Özdemir S, Cebeci A, Karayücel S (2023) Population abundance and growth parameters of an exotic bivalve species, *Anadara kagoshimensis*, in the Southwestern Black Sea. Turkish J Zool 47(1): 3. <https://doi.org/10.55730/1300-0179.3109>
 21. Acarli S, Lok A, Yigitkurt S (2012) Growth and survival of *Anadara inaequalis* (Bruguière, 1789) in Sufa Lagoon, Izmir, Turkey. Israeli J Aquacult – Bamidgeh 64. <https://doi.org/10.46989/001c.20623>
 22. Anistratenko VV, Anistratenko OYu, Khaliman IA (2014) Conchological variability of *Anadara inaequalis* (Bivalvia, Arcidae) in the Black-Azov Sea basin. Vestnik Zool 48(5): 457–466. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2014-0054>
 23. Романкевич ЕА (ред) (1980) Методы исследования органического вещества в океане. Сборник статей АН СССР, Институт океанологии им. П.П. Ширшова. М. Наука 342 с. [Romankevich EA (red) (1980) Methods of investigation of organic matter in the ocean. Sbornik statej AN SSSR, Institut okeanologii im. P.P. Shirshova. M. Nauka 342 s. (In Russ)].
 24. Голубь НА, Ерохин ВЕ, Солоницына ОР (2005) Исследование химического состава щелочного мидийного гидролизата. Морські біотехнічні системи. Збірник наукових статей НДЦ ЗС України “Державний океанаріум” 3:23–29. [Golub' NA, Erohin VE, Solonitsyna OR (2005) Investigation of the chemical composition of alkaline mussel hydrolysate. Mors'ki biotekhnichni sistemi. Zbirnik naukovih statej NDC ZS Ukrainy “Derzhavnij okeanarium” 3:23–29. (In Russ)].
 25. Збарский БИ (1954) Определение азота аминных групп методом формольного титрования / Збарский БИ, Збарский ИБ, Солнцев АИ Практикум по биологической химии. М: Медгиз, 37–38 [Zbarskij BI (1954) Opredelenie azota aminnyh grupp metodom formol'nogo titrovaniya/ Zbarskij BI, Zbarskij IB, Solncev AI Praktikum po biologicheskoy himii [Workshop on biological chemistry]. M: Medgiz 37–38].
 26. Голубь НА, Ерохин ВЕ, Рябушко ВИ (2015) Биотехнология получения продукта лечебно-профилактического назначения из двустворчатого моллюска мидии. Вестн биотехнол физико-хим биол им. Ю.А. Овчинникова 11(2): 11–19. [Golub' NA, Erohin VE, Ryabushko VI (2015) Biotechnology of obtaining the product of therapeutic and prophylactic appointment from the bivalve mussels. Vest Biotechnol Fiziko-Himichesk Biol im. Ju.A. Ovchinnikova 11(2):11–19. (In Russ)].
 27. Гланц С (1998) Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М., Практика. 459 с. [Glantz S (1998) Ме-

- diko-biologicheskaya statistika [Primer of biostatistics]. Per. s angl. M., Praktika, 1998. 459 s. (In Russ)].
28. Пивненко ТН, Ковалёв НН, Запорожец ТС, Беседнова НН, Кузнецова ТА (2015) Ферментативные гидролизаты из гидробионтов Тихого океана как основа для создания биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания. Владивосток. Дальнаука 160 с. [Pivnenko TN, Koval'ov NN, Zaporozhec TS, Besednova NN, Kuznecova TA (2015) Enzymatic hydrolysates from hydrobionts of the Pacific Ocean as a basis for the creation of biologically active food supplements and functional food products. Vladivostok. Dal'nauka 160 s. (In Russ)].
 29. Табакаева ОВ, Табакаев АВ (2016) Оценка двустворчатого моллюска *Anadara Brotona* как источника белка и минеральных элементов в питании человека. Пищ промышлен 8: 58–61. [Tabakaeva OV, Tabakaev AV (2016) Assessment of bivalve mollusk of *Anadara broughtoni* as a source of protein and minerals in human nutrition. Pishh Promyshl 8: 58–61. (In Russ)].
 30. Mizukawa H, Okabe E (1997) Inhibition by singlet molecular oxygen of the vascular reactivity in rabbit mesenteric artery. British J Pharmacol 121(1): 63–70. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701103>.
 31. Хлыбова СВ, Циркин ВИ (2006) Свободный L-гистидин как один из регуляторов физиологических процессов. Вятский мед вестн 3–4. [Hlybova SV, Cirkin VI (2006) Free L-histidine as one of the regulators of physiological processes. Vjatskij Med Vestn 3–4. (In Russ)].
 32. Табакаева ОВ, Черных АГ (2013) Антиоксидантные свойства продуктов переработки двустворчатых моллюсков Дальневосточного региона. Пищевая промышленность. 9:34–36. [Tabakaeva OV, Chernyh AG (2013) Antioxidant properties of products of processing of bivalve mollusks of the Far East region. Pishh promyshl 9: 34–36. (In Russ)].
 33. Kuvaeva ZI, Lopatik DV, Markovich MM et al. (2012) Synthesis of L-ornithine L-aspartate from L-arginine. Pharmaceutical Chem J 46(8): 495–497. <https://doi.org/10.1007/s11094-012-0833-x>
 34. Фокина НН, Нефедова ЗА, Немова НН (2011) Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (Обзор). Труды Карельского Научного Центра Российской Академии Наук 3:121–130. [Fokina NN, Nefedova ZA, Nemova NN (2011) Biochemical adaptations of marine bivalves to anoxic conditions (Review)]. Trudy Karel'skogo Nauchnogo Centra Rossijskoj Akademii Nauk 3:121–130. (In Russ)].
 35. Солдатов АА, Андреев ТИ, Головина ИВ (2008) Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequivalvis* Bruguiere. Доклады Национальной Академии Наук Украины 4:161–165. [Soldatov AA, Andreenko TI, Golovina IV (2008) Peculiarities of the organization of tissue metabolism in the bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis* Bruguiere. Doklady Nacional'noj Akademii Nauk Ukrainy 4:161–165. (In Russ)].
 36. Аюшин НБ (2001) Таурин: фармацевтические свойства и перспективы получения из морских организмов. Известия ТИНРО 129: 129–145. [Ajushin NB (2001) Taurine: pharmaceutical properties and prospects for obtaining from marine organisms. Izvestija TINRO 129: 129–145. (In Russ)].
 37. Басалай ОН, Радковец АЮ, Бушма МИ (2017) Таурин: регулятор метаболизма и лекарственное средство. Медицинские новости 5: 3–7. [Basalaj ON, Radkovec AJu, Bushma MI (2017) Taurine: the metabolic regulator and the drug. Medicinskie novosti 5: 3–7].
 38. Гостюхина ОЛ, Головина ИВ (2012) Особенности системы антиоксидантной защиты черноморских моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara inaequivalvis* Br. Український біохімічний журнал 84(3): 31–36. [Gostjulina OL, Golovina IV (2012) Peculiarities of antioxidant defense system organization of the Black sea mollusks *Mytilus galloprovincialis* Lam. and *Anadara inaequivalvis* Br. Ukraïns'kij biohimichnij zhurnal 84(3): 31–36. (In Russ)].
 39. Давидович ВВ, Пивненко ТН (2001) Аминокислоты двустворчатых моллюсков: биологическая роль и применение в качестве БАД. Известия ТИНРО 129: 146–153. [Davidovich VV, Pivnenko TN (2001) Amino acids of bivalve molluscs: biological role and use as a dietary supplement. Izvestija TINRO 129: 146–153. (In Russ)].
 40. Андреев ТИ, Солдатов АА, Головина ИВ (2009) Особенности реорганизации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) в условиях экспериментального голодания. Морской экологический журнал 8(3): 15–24. [Andreenko TI, Soldatov AA, Golovina IV (2009) Characteristics of tissue metabolism reorganization in bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789) under experimental starvation conditions. Morskoy ekologicheskij zhurnal 8(3): 15–24. (In Russ)].
 41. Ленинджер А (1985) Основы биохимии / В 3-х т. 2. Пер. с англ. М. Мир 368 с. [Lenindzher A (1985) Osnovy biohimii [Principles]/ V 3-h t. 2. Per. s angl. M. Mir 368 s. (In Russ)].
 42. Истомина АА, Довженко НВ, Челомин ВП (2011) Реакция антиоксидантной системы на аноксию и реоксигенацию у морского двустворчатого моллюска *Scapharca broughtoni*. Вестн Моск гос обл универс 3: 12–16. [Istomina AA, Dovzhenko NV, Chelomin VP (2011) Antioxidant Defenses During Anoxia And Aerobic Recovery In Marine Bivalvia *Scapharca Broughtoni*. Vestn Mosk Gos Obl Univer 3:12–16. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18384/2224-0209-2011-3-440>
 43. Карбышев МС, Абдуллаев ШП (2018) Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие. ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России. Москва. Издательство ХХ 60 с. [Karbyshv MS, Abdullaev ShP (2018) Biohimija oksidativnogo stressa: uchebno-metodicheskoe posobie. FGBOU VO RNIMU imeni N.I. Pirogova Minzdrava Rossii. Moskva. Izdatel'stvo HH 60 s.].
 44. Кения МВ, Лукаш АИ, Гуськов ЕП (1993) Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе. Успехи современной биологии 113(4): 456–470. [Kenija MV, Lukash AI, Gus'kov EP (1993) Rol' nizkomolekuljarnyh antioksidantov pri okislitel'nom stressе. Uspehi sovremennoj biologii 113(4): 456–470. (In Russ)].

45. Soldatov AA, Gostyukhina OL, Borodina AV, Golovina IV (2013) Qualitative composition of carotenoids, catalase and superoxide dismutase activities in tissues of the bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* (Bruguiere, 1789). J Evol Biochem Physiol 49(4): 255–263. <https://doi.org/255–63.10.1134/S0022093013040026>
46. Soldatov AA, Gostyukhina OL, Borodina AV, Golovina IV (2017) Glutathione Antioxidant Complex and Carotenoid Composition in Tissues of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). J Evol Biochem Physiol 53: 289–297. <https://doi.org/10.1134/S0022093017040056>
47. Gostyukhina OL, Andreenko TI (2020) Enzymatic and Low-Molecular Weight Parts of Antioxidant Complex in Two Species of Black Sea Mollusks with Different Resistance to Oxidative Stress: *Mytilus galloprovincialis* Lam. and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Biol Bull Rev 10: 38–47. <https://doi.org/10.1134/S2079086420010041>
48. Nakano T, Yamada K, Okamura K (2017) Duration rather than frequency of anoxia causes mass mortality in ark shell *Anadara kagoshimensis*. Marine Poll Bull 125(1–2): 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.073>

EFFECT OF HYPOXIA ON AMINO ACID CONTENT IN HAEMOLYMPH AND PROTEIN HYDROLYSATE OF THE BIVALVE MOLLUSK *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906)

N. A. Golub ^{a, #}, A. A. Soldatov ^a, V. I. Ryabushko ^a, A. V. Kuznetsov ^a,
V. P. Kurchenko ^b, and E. V. Budkevich ^c

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

^b Belarusian State University, Minsk, Belarus

^c North Caucasian Federal University, Stavropol, Russia

[#] e-mail: *ngolub66@gmail.com

Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) is a bivalve alien species of the Black Sea and of the Azov Sea. The amino acid composition of hemolymph and protein hydrolysates of the mollusc soft tissues was studied. The content of 16 proteinogenic amino acids in the samples was determined by ion-exchange chromatography followed by ninhydrin detection. High concentrations of histidine and proline were observed in the hemolymph and soft tissues of the mollusc. Experimental hypoxia revealed qualitative and quantitative changes in the content of free amino acids in both hemolymph and soft tissue hydrolysates. In particular, the pool of aliphatic amino acids decreased twice and the pool of aromatic amino acids increased. The mass fraction of soft tissues almost halved under hypoxia, compared to normal conditions, which corresponded to 4.7% in the experiment and 8.2% in the control. This leads to a deterioration of the hydrolysates in total and amine nitrogen as well as in dry matter (0.34 and 1.84% of dry matter in hypoxia and normoxia). It has been shown that the metabolism of molluscs is reorganized under hypoxic conditions towards anaerobic catabolism of amino acids and proteins as a source of substrates for the citric acid and ornithine cycles. This leads to a significant accumulation of arginine, which is an allosteric activator of ornithine cycle reactions, and an accumulation of urea, which is a low-molecular-weight antioxidant. Thus, a low-molecular-weight part of the antioxidant defense system in the form of a high content of free radical scavengers like histidine and urea is formed in *A. kagoshimensis*, which may contribute to the success of the invasion of this mollusc in the Black Sea and of the Azov Sea. The issues of the influence of hypoxia on the quality of shellfish as raw materials for obtaining dietary supplements are considered.

Keywords: *Anadara kagoshimensis*, alien species, hypoxia, protein hydrolysate, amino acid metabolism, Black Sea, Azov Sea

РОЛЬ ОПОРНОЙ АФФЕРЕНТАЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ МЫШЕЧНЫХ СИНЕРГИЙ ПРИ ЛОКОМОЦИЯХ

© 2024 г. С. А. Моисеев^{1,*}

¹ *Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, г. Великие Луки, Россия*

* *E-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru*

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Изучали особенности формирования мышечных синергий при выполнении локомоций в условиях полной и частичной разгрузки веса тела. Извлечение мышечных синергий выполнено с применением метода главных компонент. Установлено, что стабильность мышечных модулей и стереотипные паттерны их временной активации при различной степени афферентации обусловлены реализацией моторных программ синергий. Выявлено, что только наличие, но не мощность афферентного потока от рецепторного комплекса нижних конечностей вносит существенный вклад в формирование меж-конечностных синергетических паттернов и регуляцию степени вовлечения мышц в синергии. Различные временные профили в структуре синергий обусловлены избыточностью организации управляющих структур, благодаря которой осуществляется надежное управление локомоциями. Сохранение стабильного компонентного состава основной мышечной синергии может являться целевой переменной двигательного контроля, в связи с чем ее вариативность при многократных реализациях движения оказывается низкой.

Ключевые слова: мышечные синергии, опорная афферентация, моторная программа, локомоции, стратегии двигательного контроля, вариативность

DOI: 10.31857/S0044452924010111, EDN: ZETQUD

ВВЕДЕНИЕ

В регуляции локомоций важная роль принадлежит нейрональным сетям, локализованным в структурах спинного мозга, которые получили название генераторов шагательных движений (паттернов). Существование таких генераторов показано в исследованиях с участием животных и человека с применением стимуляционных воздействий, путем активации мышечных рецепторов или при воздействии на нейрональные локомоторные сети, локализованные в ростральных сегментах поясничного отдела спинного мозга [1, 2]. В естественных условиях активность сегментарного интернейронного аппарата может быть запущена командами вышележащих центров, однако этот аппарат может запускаться активностью его собственных нейронов, и, если сеть запущена, она осуществляет заложенную в ней программу. Программа включает выработку соответствующей комбинации и последовательности импульсов к рабочим мышцам, определяя попеременную активацию мышц антагонистов в структуре билатерального шагательного цикла. Эти процессы могут быть организованы по принципу синергии, что позволяет упростить обработ-

ку афферентации и сократить число управляемых параметров движений [3, 4].

В регуляции позы и локомоций млекопитающих опорная афферентация играет ведущую роль. Ее устранение приводит к снижению активности тонических двигательных единиц (ДЕ) мышц экстензоров, не компенсируемое другими сенсорными входами, а также изменению порядка рекрутирования ДЕ в мотонейронных пулах спинного мозга [5, 6]. Процессы, происходящие на уровне двигательных единиц, обуславливают изменение моторных программ синергий, что отражается на их пространственных и временных профилях активации [7, 8]. Результаты исследований организации локомоторных синергий у человека оказываются противоречивы. Сообщается о модуляции временных паттернов активации синергий при ходьбе в условиях аксиальной разгрузки веса тела в водной среде [9]. Однако, мышечные синергии, приобретенные в наземных условиях, оказываются в высокой степени устойчивы при изменении уровня гравитации [10, 11].

Таким образом, значимость опорной афферентации в процессе формирования локомоторных синергий во многом остаётся не определе-

на. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение роли опорной афферентации в процессе формирования стереотипного локомоторного паттерна при ходьбе. Конкретные задачи включали: определение паттернов пространственной и временной структуры мышечной активации (синергий) в условиях частичной и полной вертикальной разгрузки веса тела. Планировалось проследить модификацию синергий в структуре локомоторного цикла при разных по величине мышечных усилиях. Предполагали, что снижение сигнализации от рецепторов опорной поверхности стоп при вертикальной вывеске, а также увеличение мощности афферентного потока от нижних конечностей при возрастании интенсивности выполняемой работы не отразится на количестве мышечных синергий и их временной организации. Однако ожидали, что облегчение аксиальной нагрузки снизит стабильность временной структуры синергий, что отразится на ее межиндивидуальной вариативности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 8 испытуемых 18–24 лет без двигательных нарушений в анамнезе. Исследования проведены на базе научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта в лаборатории физиологии нервной и мышечной систем. Каждый участник представил добровольное письменное информированное согласие на участие в исследованиях. Протокол исследований предполагал ходьбу по тредбану “Venus” (HP Cosmos, Австрия) с постоянной скоростью вращения ленты 3 км/ч, оборудованном устройством пневматической вывески веса тела (рис. 1).

Экспериментальные условия включали обычную ходьбу (без вывески), ходьбу с 25-и 50-и процентной вывеской веса тела, ходьбу при полной вывеске веса тела (в этом случае испытуемые визуально ориентировались на ленту тредбана и совершали имитацию ходьбы в воздухе). Отдельное условие подразумевало проталкивание пассивной ленты тредбана, держась за перекладину перед собой. Испытуемые в каждом экспериментальном условии выполняли ходьбу в течение 60 сек. Интервалы между ходьбой в разных условиях определялись по субъективному ощущению полного восстановления испытуемого и в среднем составляли 1–2 мин, в этих он находился в положении сидя.

Регистрировали электромиограммы (ЭМГ) восьми поверхностных мышц нижних конечностей, билатерально: передней большеберцовой

мышцы, медиальной головки икроножной мышцы, двуглавой мышцы бедра, прямой мышцы бедра. В работе применялся биомонитор ME6000 (Финляндия) с частотой опроса 2000 Гц. Отведение ЭМГ осуществляли одноразовыми самоклеющимися электродами с токопроводящим гелем и активной площадью контакта 2.5 см², 36×45 мм (Swaromed, Австрия). Электроды накладывались биполярно, при этом активный располагался в области проекции двигательной точки исследуемой мышцы, а референтный прикреплялся по ходу её волокон с межэлектродным расстоянием 2 см, электрод заземления на каждом канале располагался после референтного на расстоянии 2 см [12]. ЭМГ фильтровались полосовым фильтром с полосой пропускания 30–450 Гц, силой подавления 60 дБ с нулевой задержкой, затем усреднялись в интервалах 0.002 с и повторно применяли фильтр низких частот 15 Гц, используя программное обеспечение MegaWin. К отфильтрованным ЭМГ применяли экспоненциальное сглаживание ($\alpha=0.01$). Синхронно с ЭМГ регистрировали гониограммы (гониометры располагались на обоих коленных суставах) для выделения при дальнейшем анализе отдельных шагательных циклов. Начало шагательного цикла считали от момента наибольшего значения величины угла в коленном суставе правой ноги, конец цикла — по наименьшему. Первые два цикла шага от начала регистрации пропускали, а последующие восемь включали в анализ. Такой подход применяли во всех экспериментальных условиях.

Зарегистрированные ЭМГ, гониограммы экспортировали в Statistica (StatSoft, Inc., version 10) и формировали матрицу исходных данных (X), размерностью ($I \times J$), где I — число точек (измерений в момент времени — 500 для каждого экспериментального условия, шага, испытуемого), а J — число независимых переменных (вариационных рядов ЭМГ — 8). В матрице создавали дополнительные переменные, позволяющие идентифицировать периоды шагательного цикла и принадлежность данных к определенному испытуемому и шагу. Все вариационные ряды были интерполированы относительно единой точки отсчета и стандартизированы к единице стандартного отклонения.

Для извлечения синергий использовали метод главных компонент в среде Statistica, используя стандартный модуль “Advanced/Multivariate — PCA”. Исходная матрица разлагалась на произведение двух матриц — матрицы счетов и матрицы нагрузок. Матрица нагрузок определяет пространственную структуру синергий и включает весовые коэффициенты для каждой переменной [13]. Фактически, значение коэффициента указывает на степень прямолинейности в изменениях сигнала, т. е. является мерой их синхронизма, что являет-

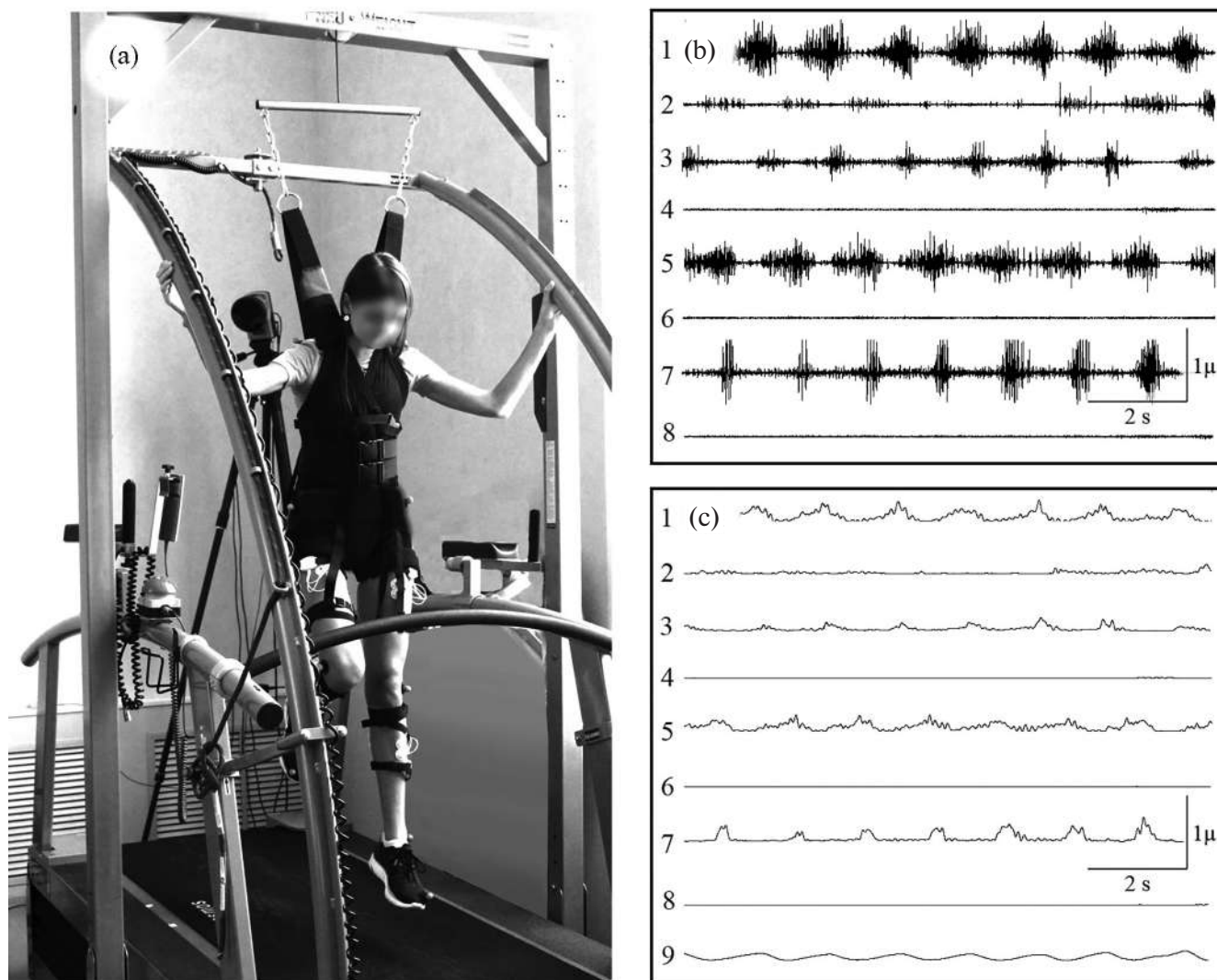


Рис. 1. Устройство вертикальной вывески веса тела (а), образец интерференционной (б) и обработанной (с) электромиограммы мышц нижних конечностей при ходьбе. 1 — передняя большеберцовая мышца пр., 2 — икроножная медиальная мышца пр., 3 — прямая мышца бедра пр., 4 — двуглавая мышца бедра пр., 5–8 — те же мышцы левой нижней конечности, 9 — гониограмма.

ся характерной чертой синергии. Матрица счетов определяет временную организацию выявленных компонент и представляется в виде коэффициентов активации. Изменение коэффициентов активации на временной шкале свидетельствует о возрастании либо снижении активности синергии, обусловленное синхронной активацией ее компонентов. Анализировали получаемые в результате разложения матрицы следующие параметры: собственные значения (eigenvalues), количество извлекаемых компонент (синергий), процент общей дисперсии, учитываемый каждым фактором в общем наборе данных (VAF), весовые коэффициенты извлеченных компонент, векторы синергий и коэффициенты активации. Рассматривали компоненты с собственными значениями не менее единицы и с долей учитываемой дисперсии не менее 5%.

Математико-статистическая обработка данных выполнена в Statistica 10.0 и включала расчет среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (SE), стандартного отклонения (SD), коэффициентов вариативности (CV). Для оценки достоверности различий при сравнении весовых коэффициентов применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc анализом по критерию Fisher LSD. Статистически значимыми различиями считали значения критерия $p < 0.05$. Для сравнения коэффициентов активации применяли анализ максимальных значений кросс-корреляционных функций (r) с учетом смещения относительно нуля, где 1 — полное соответствие, 0 — отсутствие взаимосвязи. Векторы синергий считали различными, если величина весового коэффициента начала и окончания вектора превышали единицу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате разложения матриц были получены три компонента во всех экспериментальных условиях. Доля объясняемой дисперсии в среднем по группе при отсутствии вывески составляла 82.33 ± 3.17 , а коэффициенты вариативности не превышали 6.68%. При вывеске в 25% и 50% веса тела этот показатель не превышал 86.33% при низкой вариативности в диапазоне от 2.90% до 8.48%. При полной вывеске VAF составляла 79.01 ± 1.52 , вариативность также оценивалась как очень низкая. При проталкивании пассивной ленты тредбана VAF составлял 85.66%. Существенных различий по данному показателю в разных экспериментальных условиях выявлено не было ($p > 0.05$).

Анализ коэффициентов активации первой выявленной компоненты показал высокое соответствие внутрииндивидуальных и внутригрупповых профилей, здесь коэффициенты кросскорреляционных функций составляли 0.72 ± 0.15 , а максимальные значения достигали 0.99. Высокие коэффициенты были также установлены и при других условиях, за исключением полной вывески веса тела, где они оказались несколько ниже и составляли в среднем по группе 0.69 ± 0.11 . Также при проталкивании ленты тредбана коэффициенты при сравнении межиндивидуальных значений оказались средними и достигали 0.66 ± 0.12 . Во всех экспериментальных условиях коэффициенты вариативности внутригрупповых профилей активации первой синергии оценивались как средние и не превышали 44.92%. Визуальный анализ паттернов данного компонента показал наличие положительного пика активации в начале и отрицательный пик в третьей четверти цикла шага, что было характерно для всех условий ходьбы за исключением полной вывески. В последнем случае положительный пик был отмечен в конце, а отрицательный приходился на середину шагательного цикла (рис. 2).

Рассматривая второй извлеченный компонент можно отметить наличие двух различных профилей активации во всех экспериментальных условиях за исключением 50-процентной вывески веса тела (рис. 2). Качественный анализ их временной структуры указывает на возрастание активности синергии до середины и дальнейшее снижение активности до конца цикла шага. Второй профиль демонстрировал ту же тенденцию, но с противоположным направлением. При вывеске 50% веса тела был отмечен единственный профиль с положительным пиком активации во второй четверти цикла шага. Коэффициенты кросскорреляционных функций при сопоставлении профилей второй синергии демонстрировали, преимущественно, среднее соответствие и на-

ходились в диапазоне от 0.49 ± 0.15 до 0.63 ± 0.08 . Коэффициенты вариативности во всех условиях были средними и не превышали 63.18%. Наименьшая вариативность была отмечена при 50% и 25% вывеске веса тела.

Третья выявленная мышечная синергия демонстрировала средневариативные внутригрупповые профили активации, однако, в их структуре можно выделить по одному паттерну, чаще с двумя пиками, приходящимися на разные периоды цикла шага (рис. 2). Сопоставительный анализ профилей показал среднее соответствие, коэффициенты кросскорреляционных функций находились в диапазоне от 0.40 ± 0.10 до 0.55 ± 0.14 , а CV достигали 57.73%. Самое низкое соответствие было отмечено при полной вывеске — 0.32 ± 0.03 , а CV составляли 24.46%.

Первая мышечная синергия в условиях обычной ходьбы включала активность практически всех исследуемых мышц, за исключением прямой мышцы бедра левой ноги, где весовые коэффициенты составляли 0.60 ± 0.07 в среднем по группе (рис. 3). Коэффициенты других мышц превышали пороговый уровень 0.7 и в некоторых случаях, например, для передней большеберцовой мышцы левой стороны достигали 0.88 ± 0.01 .

В ситуации с 25% вывеской веса тела наблюдалась схожая картина по данной мышечной синергии. Так, весовые коэффициенты большинства мышц превышали пороговый уровень и достигали 0.89 ± 0.01 , лишь для прямой мышцы бедра правой нижней конечности они были несколько ниже — 0.61 ± 0.03 . Коэффициенты вариативности при анализе вовлечения мышц в данную синергию оценивались как низкие — не более 15.11%, а для некоторых мышц, например, прямой бедра левой — очень низкие (1.66%). Статистически значимые различия весовых коэффициентов в сравнении с условиями ходьбы без вывески были обнаружены только в активности прямой мышцы бедра левой ноги ($p < 0.05$). При 50% вывеске веса тела наблюдалось существенное возрастание вовлечения в синергию прямой мышцы бедра правой и снижение для двуглавой мышцы той же конечности ($p < 0.05$). Их коэффициенты составляли 0.82 ± 0.04 и 0.32 ± 0.12 соответственно. Для последней была отмечена большая вариативность вовлечения в синергию, CV достигали 78.13%. Весовые коэффициенты других мышц находились в диапазоне от 0.65 ± 0.09 до 0.91 ± 0.01 . Следует отметить, что чем выше степень вовлечения мышц в синергию, тем ниже коэффициенты вариативности. Например, CV передней большеберцовой и икроножной мышц правой стороны не превышали 3.50%, а весовые коэффициенты были максимальными в сравнении с другими мышцами — 0.89 ± 0.01 и 0.91 ± 0.01 соответственно (рис. 3).

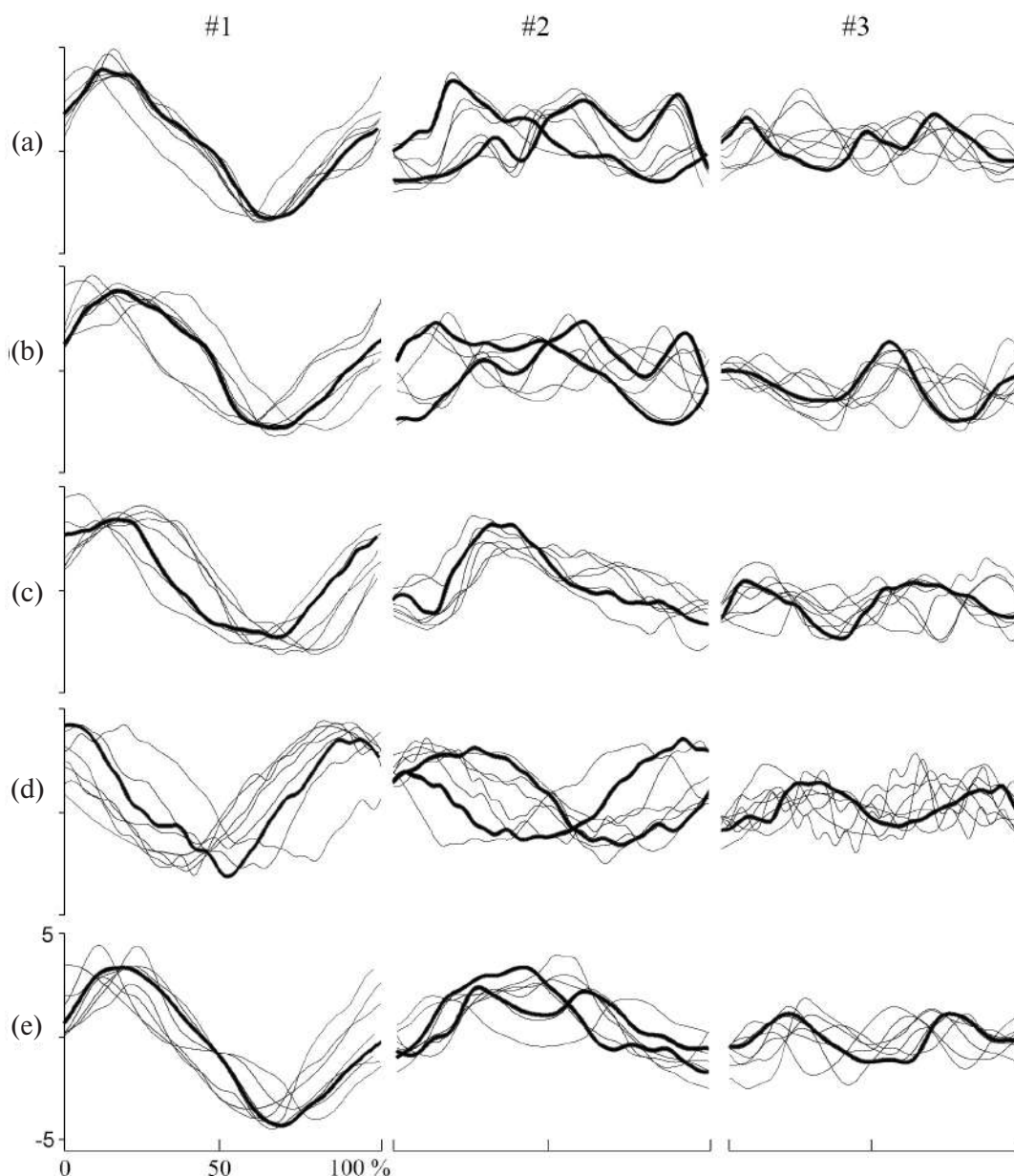


Рис. 2. Паттерны временной активации мышечных синергий при ходьбе в условиях разной степени вывески веса тела. По оси абсцисс — прогресс цикла шага, по оси ординат — у. е. #1, 2, 3 — номер компоненты (синергии). Тонкие линии — усредненные внутрииндивидуальные профили, жирные линии — среднegrupповой профиль. Степень вывески веса тела: (a) — без вывески, (b) — 25%, (c) — 50%, (d) — 100%, (e) — проталкивание ленты пассивного тредбана.

При полной вывеске веса тела пороговой величины вовлечения в синергию достигали только прямая мышца бедра правой, и мышцы голени левой стороны. Другие исследуемые мышцы демонстрировали среднее включение в синергию, коэффициенты находились в диапазоне от 0.46 ± 0.18 до 0.68 ± 0.18 . Относительно условий ходьбы без вывески было установлено меньшее вовлечение в активность передней большеберцовой мышцы обеих нижних конечностей, а также икроножной правой ($p < 0.05$). Включение в синергию прямой мышцы бедра, наоборот, возрастало, где коэф-

фициенты достигали 0.71 ± 0.10 ($CV=28.84\%$) в среднем по группе (рис. 3). Вариативность весовых коэффициентов мышц в данной синергии оценивалась как низкая или средняя и в целом не превышала 78.90%, а самые низкие значения были установлены для прямой мышцы бедра левой нижней конечности — 20.46%. При проталкивании ленты пассивного тредбана установлено высокое вовлечение в первую мышечную синергию всех мышц, за исключением двуглавой бедра правой, где коэффициенты составляли 0.67 ± 0.04 . Коэффициенты других мышц в таких условиях

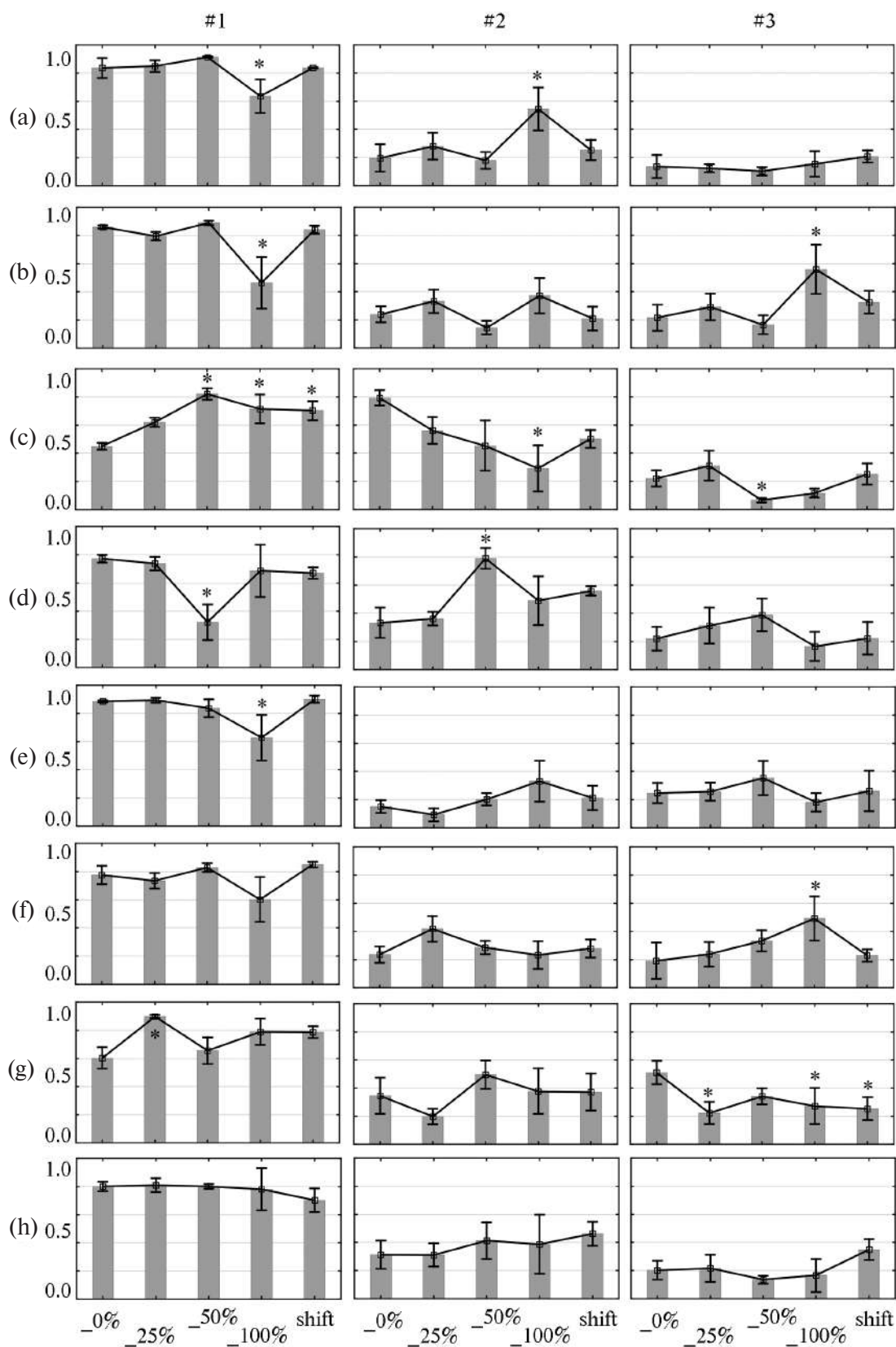


Рис. 3. Весовые коэффициенты мышечных синергий при ходьбе в условиях разной степени вывески веса тела. По оси абсцисс – степень вывески, по оси ординат – коэффициенты. #1, 2, 3 – номер компонента (синергии). * – Статистически значимые различия при $p < 0.05$ относительно ходьбы без вывески (0%). Сплошной линией показаны “векторы синергий”. Скелетные мышцы: (a) – передняя большеберцовая мышца пр., (b) – икроножная медиальная мышца пр., (c) – прямая мышца бедра пр., (d) – двуглавая мышца бедра пр., (e), (f), (g), (h) – те же мышцы левой нижней конечности.

находились в диапазоне от 0.70 ± 0.21 до 0.90 ± 0.02 . Значимые различия в сравнении с условиями обычной ходьбы были выявлены только для прямой мышцы бедра правой нижней конечности ($p < 0.05$), где установлено большее вовлечение ее в синергию.

Вторая и третья мышечные синергии демонстрировали по большей части низкие и средние весовые коэффициенты в разных экспериментальных условиях, а также среднюю и высокую вариативность. В этой связи остановимся на описании основных закономерностей, связанных с изменениями условий реализации локомоций. Так, при обычной ходьбе во вторую синергию в наибольшей степени была вовлечена прямая мышца бедра правой стороны — 0.79 ± 0.05 , а вариативность здесь была самой низкой в сравнении с другими мышцами — 11.66%. Средние коэффициенты были зарегистрированы для двуглавой мышцы бедра обеих нижних конечностей, а также для прямой мышцы бедра левой стороны. Другие мышцы демонстрировали низкое включение в синергию. Наиболее значимые различия в весовых коэффициентах были установлены для передней большеберцовой и двуглавой мышцы бедра правой ноги в условиях полной вывески веса тела. Так, коэффициенты первой достигали 0.54 ± 0.15 , а второй — 0.48 ± 0.17 . В целом для всех мышц второй синергии отмечен высокий уровень вариативности их включения, для некоторых мышц *CV* достигали 112.31%. В третьей мышечной синергии наибольшие различия в сравнении с условиями обычной ходьбы были установлены для икроножной мышцы правой нижней конечности. В условиях полной вывески весовые коэффициенты данной мышцы существенно превышали таковые при обычной ходьбе и достигали 0.55 ± 0.17 ($p < 0.05$), а вариативность оценивалась как средняя. Также отмечено достоверное возрастание вовлечения в синергию икроножной мышцы левой стороны (0.49 ± 0.15) и снижение прямой мышцы бедра. В целом вариативность весовых коэффициентов третьей мышечной синергии оценивалась как высокая, в большей степени это отмечалось для прямой мышцы бедра обеих нижних конечностей — 125.77% и 141.13%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы предполагали, что снижение сигнализации от рецепторов опорной поверхности стоп, связанное с вертикальной вывеской веса тела, равно как увеличение мощности афферентного потока вследствие выполнения нагрузки большей интенсивности не отразится на количестве извлекаемых мышечных синергий. И действительно, три мышечных синергии были нами извлечены во всех

экспериментальных условиях локомоций. Такая закономерность не является неожиданной, на стабильность количества используемых мышечных модулей в процессе поддержания позы и локомоции указывают многие исследователи. Например, постоянное количество мышечных синергий было получено у группы испытуемых до и после длительного отсутствия гравитационного воздействия [14]. Было установлено, что при разном уровне поддержки вертикального положения в группе новорожденных детей мышечная деятельность при ходьбе может быть описана четырьмя синергиями [15]. В условиях выполнения разных задач, связанных с ходьбой в водной среде, было обнаружено, что используются одни и те же мышечные модули [16]. Таким образом, изменения условий локомоций, а именно снижение гравитационной нагрузки практически не оказывает воздействие на количество используемых в процессе управления структурой шага мышечных синергий.

Мы ожидали, что изменение условий ходьбы существенно не повлияет на паттерны временной организации выявляемых мышечных модулей. Литературные данные дают противоречивые сведения, так в опытах на животных было показано изменение коэффициентов активации большинства синергий при отсутствии афферентации [7, 17]. В условиях ходьбы с частичным погружением в воду была показана зависящая от задачи модуляция временных паттернов активации мышечных синергий у человека [9]. Некоторые исследования, наоборот, указывают на высокую стабильность временной организации мышечных синергий в различных условиях локомоций. Например, после длительного пребывания в условиях невесомости профили активации большинства мышечных синергий оказываются аналогичны, полученным до полета в космос [14]. Схожие результаты приводят при исследовании поструральной устойчивости в условиях гипо- и гипергравитации. Сообщается, что мышечные синергии и сегментарные стратегии (вероятно, синергии на кинематическом уровне), приобретенные в наземных условиях, оказываются в высокой степени устойчивы при изменении уровня гравитации [10, 11]. Наши исследования, в части рассмотрения временной структуры извлеченных мышечных модулей, показывают высокое сходство организации первой мышечной синергии при различной степени вывески веса тела. При отсутствии контакта с опорой паттерны активации существенно различались в сравнении с ходьбой по поверхности, преимущественно, по расположению основного пика. Таким образом, частичная разгрузка веса тела, несмотря на изменения силы афферентного потока от опорных поверхностей стоп, практически не влияет на временные профили активации основной синергии,

однако, полное отсутствие афферентации формирует иной временной локомоторный паттерн. Представляется целесообразным привлечь к объяснению данного факта концепцию центральных генераторов паттернов [18, 19]. Несмотря на то, что в основе положений концепции лежат результаты экспериментов на животных, некоторые принципы организации нейрональных сетей спинного мозга при управлении структурой локомоций (в том числе синергетических эффектов) могут быть привлечены к объяснению закономерностей формирования стереотипного локомоторного паттерна у человека. Выходными сигналами центральных генераторов являются программы, т. е. упорядоченная активация скелетных мышц, объединенных в структурные образования — модули, вероятно, активируемые единым центральным управляющим сигналом. Таким образом, понятие двигательной программы и синергии в данной интерпретации являются эквивалентными. Из клинических наблюдений за восстановлением функций травмированного спинного мозга следует, что многие заложенные центральные программы спинальных нейрональных сетей сохраняются и могут быть запущены у человека [20]. Это подтверждается исследованиями с применением электростимуляции определенных участков здорового или поврежденного спинного мозга человека. Так электростимуляция спинного мозга в проекции L1 и L2, а также T11-T12 позвонков способствовала возобновлению постуральной и локомоторной функции у людей с частичной или полной травмой спинного мозга, а сенсорная информация является ключевым моментом обеспечения оптимальной возбудимости спинальных нейрональных структур для инициации ритмической и позной компоненты локомоций [21, 22]. В этой связи логично, что временная структура основной мышечной синергии при локомоции демонстрирует стереотипные паттерны активации в условиях наличия контакта с опорой, поскольку реализуется моторная программа, определяемая ее собственной внутренней организацией.

Обращает на себя внимание наличие двух различных профилей активации второй мышечной синергии в структуре цикла шага практически во всех условиях ходьбы. Это может быть связано с двумя фундаментальными явлениями: вариативностью, как механизма отбора наиболее адекватного способа реализации двигательной задачи в управляющей системе; и избыточностью организации ЦНС, благодаря которой осуществляется надежное управление физиологическими функциями. Несмотря на то, что избыточность, сформулированная Н.А. Бернштейном, была обозначена для уровня исполнительного аппарата, вероятно, она может проявляться и на уровне моторных про-

грамм синергий. Подтверждение этому было продемонстрировано в опытах на животных с раздражением двух разных командных областей среднего мозга (мезенцефалической и диэнцефалической), способных независимо инициировать активность спинальных генераторов [23].

Альтернативной концепцией организации управления локомоциями является двухуровневая сетевая структура, включающая две независимо функционирующие части, определяющие временной ход активации мышечных групп (модулей) — ритмогенерирующая и вовлечение отдельных мышц в такие модули — паттернообразующая [24, 17]. Роль афферентной обратной связи в работе паттернообразующего механизма проследивается при рассмотрении весовых коэффициентов в структуре отдельно взятой синергии и, сопоставляя распределение мышечных нагрузок (векторов синергий) одноименных мышц между отдельными модулями. Нами установлено перераспределение активности большинства мышц между модулями и показана особая роль сгибателей бедра в синергии при увеличении мощности афферентного потока. При возрастании мышечных усилий практически не было изменений в пространственно-временной структуре синергий. Мы наблюдали похожие реакции системы управления локомоциями при воздействии на нее чрескожной электрической стимуляции спинного мозга. Регистрировали изменение реципрокных синергетических взаимоотношений одноименных мышц нижних конечностей в структуре синергий, преимущественно, при нахождении конечности в безопорном положении. Особенно ярко эти изменения проявлялись на уровне частотно-временного кода синергий [25]. Пространственно-временная ритмическая стимуляция, нацеленная на активацию флексорных и экстензорных мотонейронных пулов, изменяла характеристики шагательных движений здоровых лиц при ходьбе по тредбану. Наиболее выраженный эффект стимуляции наблюдался при активации флексорных пулов в периоде переноса цикла шага, что отражалось на увеличении амплитуды сгибания в тазобедренном суставе и увеличении подъема колена, а также возрастании амплитуды ЭМГ флексорных мышц [26]. Эти закономерности и полученные нами данные свидетельствуют о том, что работа ритмогенерирующей части сетевой спинальной структуры, управляющей локомоцией, мало зависит от величины и характера проприоцептивной и опорной афферентации, а сигналы от рецепторов опорных поверхностей стоп (их наличие, но не мощность афферентного потока) вносят существенный вклад в формирование межконечностных синергетических паттернов и регуляцию степени вовлечения скелетных мышц в каждую синергию.

Замечено, что чем больше весовые коэффициенты мышцы, тем ниже показатель вариативности межпробных измерений, иначе говоря, выше стабильность включения ее в синергию. Возможно объяснение данной закономерности может быть отражено во взгляде на проблему избыточности элементов двигательного контроля — принципе изобилия [27, 28]. Согласно принципу, избыточные переменные не устраняются, а используются для стабилизации важных переменных, характерных для задачи. Инструментарий для оценки степени стабильности таких переменных основан на концепции неуправляемого многообразия (uncontrolled manifold — UCM) и оценке дисперсии в двух пространствах переменных — важных для успешной реализации двигательной задачи и менее важных — не влияющих на результат [29]. Отсюда следует определение синергии как организации элементарных переменных с целью стабилизации существенной переменной функционирования, специфической для данной задачи [30]. Такое определение подразумевает относительно высокую вариабельность моделей активации мышц, угловых характеристик суставов между испытаниями, а целевая переменная (контролируемая) будет оставаться неизменной (низковариативной). Если рассматривать ходьбу в разной степени вывески с опорой, обозначив целевую переменную как эффективное перемещение сегментов тела нижних конечностей, то действительно более высокая вариативность включения мышц в синергии при межпробных измерениях может отражать принцип изобилия и положения концепции UCM. Проще говоря, ходьба в полной вывеске не связана с риском падения и движения конечностей не определяют сохранение вертикального положения тела, поэтому менее контролируются управляемой системой и оказываются более вариативны. Однако если названный принцип переложить на структуру самих синергий, то низкая вариативность весовых коэффициентов выявляемых компонент может свидетельствовать о важности сохранения стабильности состава синергии в условиях ходьбы с опорой. Именно стабильность включения мышц в структуру основной мышечной синергии может являться целевой, контролируемой переменной.

ВЫВОДЫ

Стабильный набор и стереотипные паттерны временной активации основной мышечной синергии при различной мощности афферентного потока от рецепторов нижних конечностей обусловлены реализацией моторных программ синергий, формируемых центральными генераторами, обладающими собственной внутренней организацией.

Формирование двух различных профилей временной активации синергии в структуре локомоторного цикла при разной степени вывески веса тела определяется избыточностью организации управляющих структур, благодаря которой осуществляется надежное управление физиологическими функциями. Сохранение стабильного компонентного состава основной мышечной синергии может являться целевой переменной двигательного контроля, в связи с чем ее вариативность при многократных реализациях движения оказывается низкой.

Реализация программ синергий ритмогенерирующей частью нейрональной сети спинного мозга мало зависит от величины и характера проприоцептивной и опорной афферентации. Только наличие, но не мощность афферентного потока от рецепторного комплекса нижних конечностей вносит существенный вклад в формирование межконечностных синергетических паттернов и регуляцию степени вовлечения мышц в синергии.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все исследования выполнены с соблюдением требований и принципов биомедицинской этики, сформулированных в Хельсинской декларации 1964 г., и одобрены комитетом по биоэтике ФГБОУ ВО «ВЛГАФК», протокол № 4 от 13.09.2022 г. Каждый участник представил добровольное письменное информированное согласие на участие в исследованиях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гурфинкель ВС, Левик ЮС, Казенников ОВ, Селионов ВА (1998) Существует ли генератор шагательных движений у человека? Физиол чел 24(3): 42–50. [Gurfinkel' VS, Levik YUS, Kazennikov OV, Selionov VA (1998) Sushchestvuet li generator shagatel'nyh dvizhenij u cheloveka? Fiziol chel 24(3): 42–50. (In Russ)]
2. Gorodnichev RM, Pivovarova EA, Pukhov A, Moiseev SA, Savokhin AA, Moshonkina TR, Shcherbakova NA, Kilimnik VA, Selionov VA, Kozlovskaya IB, Edzherton R., Gerasimenko YP (2012) Transcutaneous Electrical Stimulation of the Spinal Cord: A Noninvasive Tool for the Activation of Stepping Pattern Generators in Humans. Hum Physiol 38(2): 158–167. <https://doi.org/10.1134/S0362119712020065>
3. Бернштейн НА (1966) Очерки по физиологии движений и физиологии активности. М.: Медицина. 349 с. [Bernshtejn NA (1966) Ocherki po fiziologii dvizhenij i fiziologii aktivnosti. M.: Medicina. 349 s. (In Russ)]
4. Гельфанд ИМ, Гурфинкель ВС, Фомин СВ, Цетлин МЛ (1966) Модели структурно-функциональной организации некоторых биологических систем. М.: Наука 322 с. [Gel'fand IM, Gurfinkel' VS, Fomin SV, Cetlin ML (1966) Modeli strukturno-funkcional'noj organizacii nekotoryh biologicheskikh sistem. M.: Nauka 322 s. (In Russ)]
5. Шенкман БС, Мирзоев ТМ, Козловская ИБ (2020) Тоническая активность и гравитационный контроль постуральной мышцы. Авиакосмическая и экологическая медицина 54(6): 58–72. [Shankman BS, Mirzoev TM, Kozlovskaya IB (2020) Tonic activity and gravitational control of the postural muscle. Aerospace and Environmental Medicine 54(6): 58–72. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-6-58-72>
6. Козловская ИБ (2017) Гравитация и позно-тоническая двигательная система/ Авиакосм и эколог мед 51(3):5. [Kozlovskaya IB (2017) Gravitaciya i pozno-tonicheskaya dvigatel'naya sistema/ Aviakosm i ekolog med 51(3):5. (In Russ)] <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2017-51-3-5-21>
7. Cheung VC, d'Avella A, Tresch MC, Bizzi E (2005) Central and sensory contributions to the activation and organization of muscle synergies during natural motor behaviors. J Neurosci 25 (27): 6419–6434. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4904-04.2005>
8. Rybak IA, Dougherty KJ, Shevtsova NA (2015) Organization of the Mammalian Locomotor CPG: Review of Computational Model and Circuit Architectures Based on Genetically Identified Spinal Interneurons (1,2,3). eNeuro 2(5): ENEURO.0069–15.2015. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0069-15.2015>
9. Yokoyama H, Kato T, Kaneko N, Kobayashi H, Hoshino M, Kokubun T, Nakazawa K. (2021) Basic locomotor muscle synergies used in land walking are finely tuned during underwater walking. Sci Rep 11(1): 18480. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98022-8>
10. Holubarsch J, Helm M, Ringhof S, Gollhofer A, Freyler K, Ritzmann R (2019) Stumbling reactions in hypo and hyper gravity – muscle synergies are robust across different perturbations of human stance during parabolic flights. Sci Rep 9(1): 10490. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47091-x>
11. Vernazza-Martin S, Martin N, Massion J (2000) Kinematic synergy adaptation to microgravity during forward trunk movement. J Neurophysiol 83(1): 453–464. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.1.453>. PMID: 10634887
12. Altenburger K, Bumke O, Foerster O (1937) Allgemeine neurologie. Handbuch der Neurologie. Verlag von Julius Springer. Berlin. S.747.
13. Moiseev S, Pukhov A, Mikhailova E, Gorodnichev R (2022) Methodological and computational aspects of extracting extensive muscle synergies in moderate-intensity locomotions. J Evol Biochem Phys 58: 88–97. <https://doi.org/10.1134/S0022093022010094>
14. Hagio S, Ishihara A, Terada M, Tanabe H, Kibushi B, Higashibata A, Yamada S, Furukawa S, Mukai C, Ishiooka N, Kouzaki M (2022) Muscle synergies of multidirectional postural control in astronauts on Earth after a long-term stay in space. J Neurophysiol 127(5): 1230–1239. <https://doi.org/10.1152/jn.00232.2021>
15. Kerkman JN, Zandvoort CS, Daffertshofer A, Dominici N (2022) Body Weight Control Is a Key Element of Motor Control for Toddlers' Walking. Front Netw Physiol 2: 844607. <https://doi.org/10.3389/fnetp.2022.844607>
16. Yokoyama H, Kato T, Kaneko N, Kobayashi H, Hoshino M, Kokubun T, Nakazawa K (2021) Basic locomotor muscle synergies used in land walking are finely tuned during underwater walking. Sci Rep 11(1): 18480. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98022-8>
17. Rybak IA, Dougherty KJ, Shevtsova NA (2015) Organization of the Mammalian Locomotor CPG: Review of Computational Model and Circuit Architectures Based on Genetically Identified Spinal Interneurons (1,2,3). eNeuro 2(5): ENEURO.0069–15.2015. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0069-15.2015>
18. Балабан ПМ, Воронцов ДД, Дьяконова ВЕ, Дьяконова ТЛ, Захаров ИС, Коршунова ТА, Орлов ОЮ, Павлова ГА, Панчин ЮВ, Сахаров ДА, Фаликман МВ (2013) Центральные генераторы паттерна. Журн высш нервн деяте им ИП Павлова 63(5): 520–541. [Balaban PM, Vorontsov D, Diakonova VE, Diakonova T L, Zakharov I S, Korshunova TA, Orlov O Yu, Pavlova GA, Panchin Yu V, Sakharov DA, Falikman MV (2013) Central pattern generators. J High Nerv Activ named IP Pavlov 63(5): 520–541. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0044467713050031>
19. Аршавский ЮИ, Делягина ТГ, Орловский ГН (2015) Центральные генераторы: механизм работы и их роль в управлении автоматизированными движениями. Журн высш нервн деяте им ИП Павлова 65(2): 156–187. [Arshavsky YI, Delyagina TK, Orlovsky GN (2015) Central generators: the mechanism of operation and their role in the management of automated move-

- ments. *J High Nerv Activ* named IP Pavlov 65(2):156–187. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0044467715020033>
20. *Сентаготай Я, Арбиб М* (1976) Концептуальные модели нервной системы. — Москва. Мир. 198 с. [*Sentagotai Ya, Arbib M* (1976) Conceptual models of the nervous system. — Moscow. Mir. 198 p. (In Russ)].
 21. *Томиловская ЕС, Мошонкина ТР, Городничев РМ, Шигуева ТА, Закирова АЗ, Пивоварова ЕА, Савохин АА, Селионов ВА, Семенов ЮС, Бревнов ВВ, Китов ВВ, Герасименко ЮП, Козловская ИБ* (2013) Механическая стимуляция опорных зон стоп: неинвазивный способ активации генераторов шагательных движений у человека. *Физиол чел* 39(5): 34–41. [*Tomilovskaya ES, Moshonkina TR, Gorodnichev RM, Shigueva TA, Zakirova AZ, Pivovarova EA, Savokhin AA, Selionov VA, Semenov JUS, Brevnov BB, Kitov BB, Gerasimenko YP, Kozlovskaya IB* (2013) Mechanical stimulation of the support zones of the feet: a non-invasive method of activating generators of walking movements in humans. *Hum Physiol* 39(5): 34–41. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0131164613050159>
 22. *Gerasimenko Y, Edgerton R, Harkema V, Kozlovskaya I* (2020) Gravity dependent mechanisms of sensorimotor regulation of posture and locomotion. *Aerospace Environment Med* 54: 27–42.
 23. *Орловский ГН* (1969) Спонтанная и вызванная локомоция таламической кошки. *Биофизика* 14(5): 1095–1102. [*Orlovsky GN* (1969) Spontaneous and induced locomotion of the thalamic cat. *Biophysics* 14(5): 1095–1102. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0044467715020033>
 24. *McCrea DA, Rybak IA* (2008) Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57(1): 134–146.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.006>
 25. *Моисеев СА, Городничев РМ* (2023) Особенности синергетического взаимодействия скелетных мышц нижних конечностей под воздействием электрической стимуляции спинного мозга. *Физиол чел* 49(1): 91–103. [*Moiseev SA, Gorodnichev RM* (2023) Features of synergetic interaction of skeletal muscles of the lower extremities under the influence of electrical stimulation of the spinal cord. *Hum Physiol* 49(1): 91–103. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0131164622100319>
 26. *Городничев РМ, Пухов АМ, Моисеев СА, Иванов СМ, Маркевич ВВ, Богачева ИН, Гришин АА, Мошонкина ТР, Герасименко ЮП* (2021) Регуляция фаз шагательного цикла при неинвазивной электрической стимуляции спинного мозга. *Физиол чел* 47(1): 73–83. [*Gorodnichev RM, Pukhova M, Moiseev SA, Ivanov SM, Markevich V, Bogacheva YIN, Grishin A, Moshonkina T R, Gerasimenko YP* (2021) Regulation of the phases of the walking cycle with noninvasive electrical stimulation of the spinal cord. *Hum Physiol* 47(1): 73–83. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0131164621010057>
 27. *Latash ML* (2012) The bliss (not the problem) of motor abundance (not redundancy). *Exp Brain Res*. 217(1): 1–5.
<https://doi.org/doi: 10.1007/s00221-012-3000-4>.
 28. *Latash M* (2016) Structured variability as a signature of biological processes. *Voprosy Psikhologii*, 2016(3): 120–126.
 29. *Scholz JP, Schöner G* (1999) The uncontrolled manifold concept: identifying control variables for a functional task. *Exp Brain Res* 126(3):289–306.
<https://doi.org/doi: 10.1007/s002210050738>
 30. *Латаш МЛ* (2020) Физика живого движения и восприятия. Москва. Когито-Центр. 358 с. [*Latash ML* (2020) Physics of Living Motion and Perception. Moscow. Kogito-Center. 358 p. (In Russ)].

THE ROLE OF SUPPORTING AFFERENTATION IN THE FORMATION OF MUSCLE SYNERGIES PATTERNS IN LOCOMOTION

S. A. Moiseev^{a, #}

^a *Velikiye Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikiye Luki, Russia*

[#] *e-mail: sergey_moiseev@vlgafo.ru*

The features of the spatial-temporal structuring of intermuscular interaction during locomotion in conditions of full and partial unloading of body weight were studied. The extraction of muscle synergies was performed using the principal component analysis. It is established that the stability of muscle modules and stereotypical patterns of their temporary activation with varying degrees of afferentation are due to the implementation of motor synergy programs. It was revealed that only the presence, but not the power of the afferent flow from the receptor complex of the lower extremities makes a significant contribution to the formation of inter-extremity synergetic patterns and regulation of the degree of involvement of muscles in synergy. The formation of various time profiles in the structure of synergies is due to the redundancy of the organization of control structures, thanks to which reliable management of physiological functions is carried out. The implementation of synergy programs weakly depends on the magnitude and nature of proprioceptive and supportive afferentation. Only

the presence, but not the power, of the afferent flow from the receptor complex of the lower extremities makes a significant contribution to the formation of interfacial synergetic patterns and the regulation of the degree of muscle involvement in synergy.

Keywords: muscle synergies, motor program, support afferentation, locomotion, motor control strategy, variability