



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

www.sciencejournals.ru

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



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 5, 2023

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

Роль цАМФ в топографической организации обонятельной системы

Е. В. Бигдай, А. А. Разинова

345

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Активность протеаз в тонком кишечнике атлантического глупыша *Fulmarus glacialis* при инвазии *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae)

М. М. Куклина, В. В. Куклин

361

Метаболическая адаптация гельминтов кишечника рыб: ингибирующая способность по отношению к протеазам у цестод *Triaenophorus nodulosus*

Т. В. Фролова, Г. И. Извекова

370

Ремоделирование внеклеточно регистрируемых потенциалов действия кардиомиоцитов субэпикарда сердца крысы после ишемически-реперфузионного повреждения

*А. В. Степанов, М. Г. Добрецов, Е. В. Новикова, Ю. А. Филиппов,
А. А. Панов, И. В. Кубасов*

378

Прогнозируемая представленность метаболических путей синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот при ожирении у взрослых

*А. В. Шестопалов, Л. А. Ганенко, И. М. Колесникова, Т. В. Григорьева,
И. Ю. Васильев, Ю. Л. Набока, Н. И. Волкова, О. В. Борисенко, С. А. Румянцев*

389

Трансгенерационное влияние пренатального стресса на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков

*Н. Э. Ордян, Е. Д. Шигалугова, О. В. Малышева, С. Г. Пивина,
В. К. Акулова, Г. И. Холова*

403

Ингибирование аутофагии и апоптоза инсулином как основа его нейропротекторного действия на нейроны коры мозга крыс при окислительном стрессе *in vitro*

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

413

Хронические нарушения регуляции глутаматергической трансмиссии в гиппокампе крыс линии Крушинского–Молодкиной, вызванные многократными судорожными припадками

*Е. П. Александрова, А. П. Ивлев, А. А. Куликов, Л. С. Никитина,
М. В. Глазова, Е. В. Черниговская*

427

Contents

Vol. 59, No. 5, 2023

REVIEWS

- The Role of cAMP in the Topographic Organization of the Olfactory System
E. V. Bigday and A. A. Razinova 345

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Protease Activity in The Small Intestine of the Northern Fulmar *Fulmarus glacialis* by Infection of *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae)
M. M. Kuklina and V. V. Kuklin 361
- Metabolic Adaptation of Fish Intestinal Helminths: Inhibitory Ability Towards Proteases in Cestodes *Triaenophorus nodulosus*
T. V. Frolova and G. I. Izvekova 370
- Remodeling of Extracellularly Recorded Action Potentials of Rat Heart Subepicardial Cardio-Myocytes after Ischemia Reperfusion Injury
A. V. Stepanov, M. G. Dobretsov, E. V. Novikova, Yu. A. Filippov, A. A. Panov, and I. V. Kubasov 378
- Prediction of Vitamins and Short-Chain Fatty Acids Synthesis Pathways in Obese Adults
A. V. Shestopalov, L. A. Ganenko, I. M. Kolesnikova, T. V. Grigoryeva, I. Yu. Vasilyev, Yu. L. Nabo-ka, N. I. Volkova, O. V. Borisenko, and S. A. Roumiantsev 389
- Transgenerational Effects of Prenatal Stress on Memory and Expression of the Insulin-Like Growth Factor 2 Gene in the Offspring Brain
N. E. Ordyan, E. D. Shigalugova, O. V. Malysheva, S. G. Pivina, V. K. Akulova, and G. I. Kholova 403
- The Inhibition of Autophagy and Apoptosis by Insulin as a Basis of Its Neuroprotective Action on Rat Brain Cortical Neurons Under Conditions of Oxidative Stress *in vitro*
I. O. Zakharova, L. V. Bayunova, D. K. Avrova, and N. F. Avrova 413
- Chronic Dysregulation of Glutamatergic Transmission in The Hippocampus of Krushinsky–Molodkina Rats Induced by Repeated Epileptiform Seizures
E. P. Aleksandrova, A. P. Ivlev, A. A. Kulikov, L. S. Nikitina, M. V. Glazova, and E. V. Chernigovskaya 427

РОЛЬ цАМФ В ТОПОГРАФИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. Е. В. Бигдай¹, А. А. Разинова^{1,*}

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: annichok@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

В статье анализируются данные литературы, посвященные роли молекулярных обонятельных рецепторов и цАМФ в формировании топографической организации обонятельной сенсорной системы. Сенсорная информация до передачи ее в мозг организована уже в периферическом отделе по принципу “один нейрон—один рецептор”, распространяющийся и на гломерулы в обонятельной луковице (ОЛ), которые подчиняются закону “одна гломерула—один рецептор”. В настоящее время важную роль в формировании сенсорной карты стали приписывать обонятельным рецепторам, играющим двойную роль в организации обонятельной системы, поскольку локализуются как в обонятельных жгутиках, так и в мембране конуса роста аксона одного и того же обонятельного сенсорного нейрона (ОСН), и определяют мишени для аксонов ОСН в ОЛ. Вместе с тем существуют убедительные доказательства центральной роли внутриклеточной сигнальной системы цАМФ в развитии сенсорной карты. Методом генетической мутации с отменой синтеза цАМФ выявили, что аксоны, несущие эту мутацию, никогда не проникают в гломерулярный слой, а остаются в слое обонятельного нерва. При этом аксоны ОСН направляются на ОЛ, но не могут сформировать отчетливые и четко определенные гломерулы, многие из которых становятся гетерогенными, поскольку содержат волокна, принадлежащие ОСН, экспрессирующим обонятельные рецепторы к разным одорантам. Таким образом, цАМФ, синтезируемый в кончике аксона ОСН, под действием сигналов из ОЛ регулирует экспрессию молекул его навигации к своей мишени в ОЛ, а также образует интрабульбарные химические и электрические синапсы, формируя нейронные цепи. Многочисленные клинические и экспериментальные данные позволили заключить, что патогенетические механизмы развития некоторых психических заболеваний связаны с нарушением регуляции цАМФ.

Ключевые слова: обонятельные рецепторы, обонятельные сенсорные нейроны, обонятельная луковица, ринотопическая карта, циклонуклеотид-зависимые каналы, цАМФ

DOI: 10.31857/S0044452923050030, **EDN:** KKSTPE

Список сокращений

- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ОР – обонятельный рецептор
ОЛ – обонятельная луковица
ОЖ – обонятельные жгутики
ОСН – обонятельные сенсорные нейроны
ОЭ – обонятельный нейроэпителлий
АЦ – аденилатциклаза
CNG-каналы – цикло-нуклеотид зависимые каналы
ПК-А – протеинкиназа А
РЕВР1 – фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1
ФДЭ – фосфодиэстераза

ВВЕДЕНИЕ

Восприятие запаха осуществляется ОСН, расположенными в обонятельном нейроэпителлии (ОЭ). ОСН экспрессируют специфический для данной пахучей молекулы (одоранта) ОР. ОСН с ОР для одного и того же одоранта располагаются по поверхности ОЭ в одной из зон, внутри которой они перемешиваются с клетками, экспрессирующими ОР к другим пахучим молекулам, в случайном порядке. Строгий топографический порядок устанавливается в ОЛ. Аксоны ОСН проецируются в определенные области ОЛ (гломерулы), где формируются синапсы с постсинаптическими клетками. Причем аксоны ОСН, в которых локализируются ОР к одному и тому же одоранту, посылают проекции на одну и ту же гломерулу, формируя дискретную сенсорную карту [1–3]. Таким образом, на

уровне ОЛ образуются нейронные сети, связывающие между собой ОСН с гломерулами, а также разные гломерулы между собой и ОЛ с центрами более высокого порядка. Факт того, что аксоны, принадлежащие обонятельным клеткам, несущим одинаковые ОР, конвертируют на специфические гломерулы в ОЛ и формируют таким образом топографическую сенсорную карту, установлен давно. Вместе с тем в настоящее время активно изучаются специфические молекулярные механизмы навигации аксонов к своим мишеням, в которых важную роль выполняют ОР, локализованные в мембране аксонного холмика ОСН, а также цАМФ, синтезируемый в этой области клетки и регулирующий процесс хемотаксиса аксонов. Поэтому важно знать, какие процессы активируются в кончике аксонов, которые регулируют синтез рецепторов к молекулам наведения с участием ОР и цАМФ.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНОВ

Обонятельная система представляет собой очень древнюю и эволюционно высококонсервативную систему. У наземных млекопитающих пахучие молекулы (одоранты) представляют собой летучие, небольшие (как правило, с молекулярной массой менее 400 Да) и преимущественно органические молекулы, растворенные в воздухе [4]. В водной среде молекулы пахучих веществ в основном представляют собой аминокислоты [2, 3].

Одоранты воспринимаются обонятельными клетками, расположенными в основном в ОЭ. В его составе помимо рецепторных имеются базальные и опорные клетки [5]. ОСН являются первичночувствующими (нейросенсорными) рецепторами. От апикального полюса биполярной обонятельной клетки отходит дендрит длиной 20–90 мкм и диаметром 0.8–4.0 мкм, который простирается до апикальной поверхности ольфакторного эпителия. На вершине он образует утолщение – булавку, снабженную ОЖ. В них экспрессируются ОР, которые связываются с одорантами и запускают передачу электрохимического сигнала. От базального полюса ОСН начинается тонкий немиелинизированный и неразветвленный аксон, толщиной 0.1–0.3 мкм. Он, образуя обонятельный нерв, связывающий рецепторные клетки с первичными обонятельными центрами, проецируется непосредственно в ОЛ, место начальной обработки обонятельной информации [4].

2. ОБОНЯТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Согласно современной теории обоняния восприятие запаха начинается с взаимодействия пахучей молекулы с молекулярным ОР, преобразующим химические раздражители из внешнего мира в электрические сигналы. В 1991 г. Виск и Ахел кло-

нировали и охарактеризовали подгруппу мультигенного семейства ОР, связанных с G-белками (GPCR), экспрессия которых была ограничена ОЭ [6–9]. ОР экспрессируются на клеточной поверхности ОЖ, концентрируясь в их дистальной части, и распознают размер, форму и функциональную группу одоранта [10–13].

Все больше накапливается данных в пользу гипотезы о том, что каждый ОСН экспрессирует только один тип ОР из репертуара более чем 1000 генов ОР [11]. Считается, что механизмом, который обеспечивает экспрессию одного типа ОР в каждом ОСН, является взаимоисключающая и моноаллельная экспрессия рецепторных генов. В результате такого генетического паттерна экспрессии ОР возникает правило: “один ОСН – один ОР”. Как было показано методом *in situ* гибридизации, ОР экспрессируются в обонятельных клетках грызунов уже на ранней стадии развития (E12) независимо от созревания клетки, когда периферический отросток еще не прорастает к апикальной поверхности обонятельной клетки, и присутствуют в ней задолго до возникновения обнаружения запаха [14]. Но выбранный паттерн экспрессии данного рецептора сохраняется на протяжении всей жизни клетки [2, 3].

Вместе с тем у позвоночных значительная часть семейства генов для ОР является псевдогенами. На них у гоминидов приходится около 50%, у мышей и собак – 20%, а у приматов – 25–35% генов ОР [13]. Вероятно, улучшение зрительных возможностей сделало обоняние частично излишним, приводя к инактивации функциональных генов [15]. Кроме того, эти различия в рецепторных псевдогенах, по-видимому, отражают поведенческие и экологические различия обонятельных стимулов среди видов [2, 3].

Следует отметить еще одну функцию ОР. Показано, что в ОСН мыши они вовлекаются в механизм реакции на механическое воздействие – ранее неизвестный механизм механотрансдукции. Полагают, что ОР, связанные с G-белком, обладают функцией механических датчиков, которые устанавливают молекулярный механизм, посредством которого афферентный сигнал, связанный с дыханием, поступает из полости носа к мозгу, чтобы синхронизировать активность дельта/тета-диапазона в определенных участках мозга с дыханием [16]. Таким образом, ОР могут быть полимодальными, выполняя роль не только химических, но и механических датчиков. Следовательно, в обонятельной сенсорной системе может кодироваться как информация о запахе, так и о воздушном потоке, которая поступает от ОСН, которые экспрессируют рецепторы с разной чувствительностью к запахам и механическим раздражителям [16, 17].

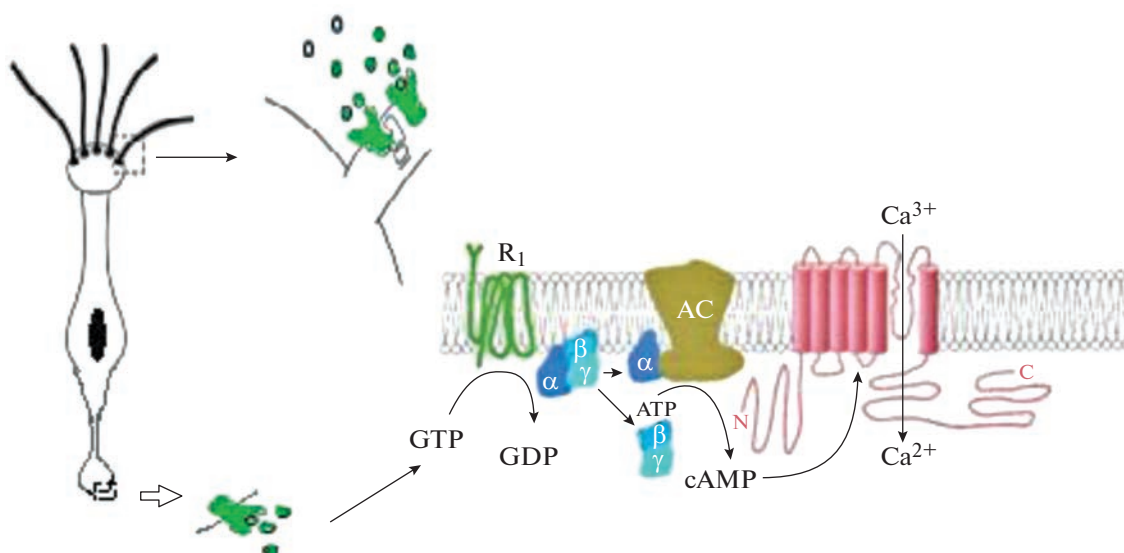


Рис. 1. Схема обонятельной трансдукции. Схема ОСН и схема цАМФ-опосредованного каскада трансдукции в мембране обонятельных жгутиков.

3. МЕХАНИЗМ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Сигнальный каскад, запускаемый запахами, хорошо охарактеризован (рис. 1). Одоранты, связываясь с ОР в мембране ОЖ ОСН, активируют каскад обонятельной трансдукции, который осуществляется через сопряженный с ольфакторным рецептором G-белком [18]. В ОЭ идентифицирован специфический для обоняния G_{olf} -белок. ОЖ обогащены им главным образом в дистальной части, и, хотя его свойства сходны со стимуляторными G-белками в других тканях, он является особой разновидностью для ОЭ. G_{olf} -белок обладает уникальной для ольфакторного G-протеина конфигурацией ГТФ-связывающего сайта, а его альфа-субъединица способна стимулировать аденилатциклазу (АЦ) [2, 13, 19–21].

G_{olf} представляет собой периферический белок цилиарной плазматической мембраны, гетеротример, состоящий из альфа-, бета- и гамма-субъединиц [22, 23].

Белком-мишенью для G_{olf} -белка в каскаде ольфакторной трансдукции является аденилатциклаза. У млекопитающих клонировано и охарактеризовано около 9 близкородственных изоформ аденилатциклазы (АЦ). В ОЖ помимо АЦ 3-го типа (АЦ-3) экспрессируются АЦ 2-го типа (АЦ-2) и АЦ 4-го типа (АЦ-4) [24, 25]. Они активируются различными (непахучими) стимулами. Однако именно АЦ-3 является ключевым ферментом, участвующим в продукции циклического аденозинмонофосфата в обонянии. Впервые ее обнаружили именно в ОЭ, где она локализуется в ОЖ [26].

Активированная АЦ-3 гидролизует АТФ, синтезируя цАМФ (рис. 1) [18, 27–30].

Вместе с тем роль АЦ-3 не сводится к прямому участию в процессе восприятия запаха в качестве компонента механизма обонятельной трансдукции. Свое влияние на обонятельную рецепцию этот фермент способен оказывать косвенным путем, поддерживая структуру ОЖ. В частности, опыты на нокаутных мышах обнаружили, что АЦ-3 вовлекается в регуляцию длины ОЖ, и удаление АЦ-3 нарушает целостность цилиарной структуры, модулируя жгутиковую архитектуру в ОСН [31]. Таким образом, помимо основного компонента в механизме обонятельной трансдукции АЦ-3 играет незаменимую роль в постнатальном созревании ОСН и поддержании ультраструктуры ОЖ у грызунов в течение всего взрослого периода [32, 33]. Дефекты в структуре или функции ОЖ приводят к тяжелым сенсорным нарушениям, проявляющимся в anosмии. Поэтому для терапевтического лечения обонятельных нарушений важно понимать, как в ОСН регулируются цилиарная архитектура (т.е. длина и/или форма) и функция [34, 35]. Одним из таких приемов может быть, вероятно, регуляция активности АЦ-3.

В процессе обонятельной трансдукции в результате гидролиза АТФ синтезируется цАМФ (рис. 1). Он получил характеристику вездесущего вторичного мессенджера, поскольку выполняет разнообразные функции в клетках. Этот циклонуклеотид способен регулировать большое количество клеточных процессов, включая важные механизмы поддержания клеточного гомеостаза, активность различных ферментов, а также ряд специфических функций, связанных с сокращением и расслабле-

нием мышц, секрецией желез, пластичностью нейронов, иммунным ответом, клеточной пролиферацией и апоптозом [36–40]. В ОСН цАМФ в зависимости от своей концентрации может определять морфологию и сохранение ОЖ. Большую роль при этом играет способность цАМФ поддерживать базальные внутрицилиарные уровни (0.1–0.3 мкМ) в отсутствие обонятельной стимуляции [41]. Полагают, что базальная продукция цАМФ связана с последующей транскрипцией генов, сопряженных со жгутиками, что, в свою очередь, регулирует их морфологию, а следовательно, и механизм обонятельной трансдукции [31].

Из вышеизложенного следует, что цАМФ обладает плеiotропными эффектами. Как в таком случае достигается специфичность передачи сигналов в различных типах клеток, включая ОСН, способная вызывать характерный и соответствующий клеточный ответ? Поскольку константа диффузии цАМФ находится в диапазоне 270–780 мкм²/с, цАМФ считался мессенджером дальнего действия, способным распространяться на большие расстояния и передавать информацию в отдаленные места. В настоящее время считают, что этот циклический нуклеотид действует в пределах отдельных субклеточных доменов, которые ограничивают его диффузию [42, 43].

В обонятельной трансдукции цАМФ выполняет миссию внутриклеточного мессенджера, и его дефицит приводит к многообразным нарушениям обонятельной функции [44]. Это означает, что для поддержания нормального процесса восприятия запаха необходимо регулировать уровень внутрицилиарного цАМФ, который зависит как от его синтеза, так и от деградации (рис. 1). Как известно, функцию поддержания внутриклеточных градиентов цАМФ выполняет фосфодиэстераза (ФДЭ), которая так же, как АЦ-3 и цАМФ, вовлекается в механизм обонятельной трансдукции [42, 45].

Таким образом, в ходе обонятельной рецепции стимуляция G_{olf}-белка, сопряженного с ОР, активируя АЦ-3, продуцирует цАМФ. Увеличение его содержания деполаризует рецепторные нейроны посредством открытия циклонуклеотид-зависимых каналов (CNG-каналов) в цилиарной мембране. Было показано, что они играют решающую роль в обонянии. В результате их открытия входящий ток ионов кальция инициирует Ca²⁺-зависимый ток Cl⁻, усиливающий деполаризацию, вызванную Ca²⁺. Результирующая деполаризация генерирует локальный рецепторный потенциал, способный с декрементом распространяться к аксону ОСН [17, 46].

Механизм усиления сигнала имеет важное значение для увеличения обонятельной чувствительности, ведь в интактных обонятельных жгутиках продукция цАМФ невелика (максимально около 200 000 молекул на стимул на клетку). Это означает, что обонятельные клетки обладают низким уси-

лением в энзиматическом каскаде, невыгодным для сигнальной трансдукции, но этот уникальный механизм, как полагают, необходим для снижения потерь АТФ. Однако образование небольшого количества вторичных посредников в обонятельных клетках не уменьшает эффективности процесса внутриклеточной сигнализации. С одной стороны, большой вклад вносят ОЖ, имеющие высокое отношение объема к поверхности. За счет жгутиков плотность рецепторной поверхности ОЭ у быка составляет 20 см³/см². С другой стороны, в обонятельную трансдукцию вовлекается нелинейное усиление благодаря последовательному открытию CNG-каналов и Ca²⁺-зависимых Cl⁻-каналов, используя Ca²⁺ в качестве третичного посредника [47].

Возникающий в дистальной области ОЖ рецепторный потенциал, распространяясь по ОСН, генерирует потенциал действия в аксонном холмике ОСН, и нервные импульсы распространяются в ОЛ. Аксоны ОСН образуют прямые проекции из ОЭ в ОЛ, где они конвергируют на гломерулы. Из ОЛ аксоны нейронов второго порядка посылают прямые проекции в ипсилатеральную пириформную и энторинальную кору, миндалину, гиппокамп и орбитофронтальную кору.

4. ТОПОГРАФИЯ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ

Ринотопическая карта в ОЭ

У грызунов в основном ОЭ лишь малая часть от всей популяции ОСН реагирует на один и тот же одорант. Так, исследования с помощью *in situ* гибридизации показали, что как у рыб, так и у грызунов, ген каждого ОР экспрессируется в небольшой клеточной фракции. Три различных субсемейства генов для ОР обнаружены только в 0.1–0.2% клеток [48]. На изолированных обонятельных клетках тритона методом пэтч-клэмп выявили, что из 1569 тестируемых клеток только 1.6% реагировали на лилиаль, а из 896 ОСН только 1.7% – на лираль. Из общего числа рецепторных клеток ОЭ клетки, чувствительные к лиралу и лилиалу, занимают около 2% [49]. Это означает, что рецепторные нейроны, реагирующие на один и тот же запах, занимают небольшую часть от всех рецепторных клеток в составе ОЭ. Методами генетического анализа при гибридизации *in situ* с использованием зондов, специфических к ОР, в эпителии носа крысы были топологически идентифицированы обонятельные клетки, специфически экспрессирующие определенный подтип мембранного рецептора [50].

Топографически группы сенсорных нейронов, экспрессирующих один и тот же ОР, располагаются в больших, но ограниченных зонах вдоль дорсо-медиальной и вентролатеральной эпителиальной оси. Внутри одной зоны ОСН, экспрессирующие разные ОР, смешиваются [2, 3], образуя простран-

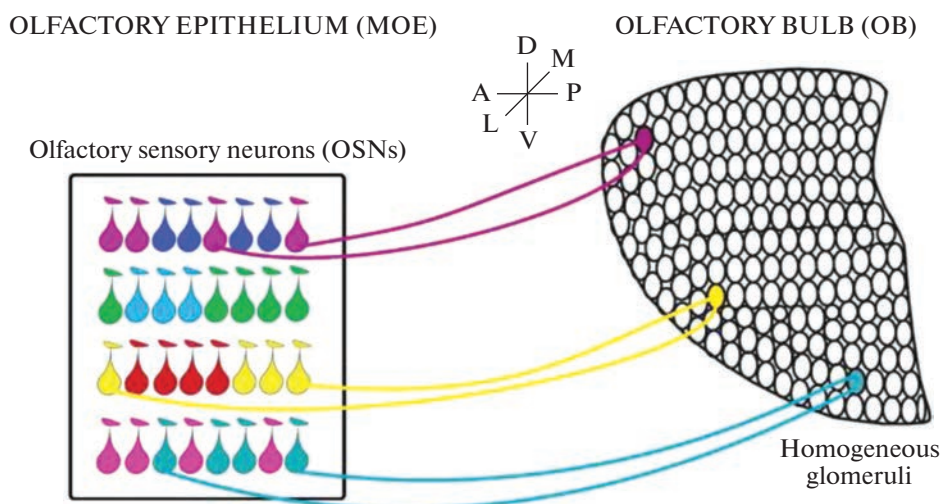


Рис. 2. Ринотопическая карта в ОЭ (olfactory epithelium). Проекция ОСН (olfactory sensory neurons) на ОЛ (olfactory bulb). ОСН (olfactory sensory neurons), экспрессирующие данный ОР (обозначены каплями одинакового цвета), ограничены одной из частично перекрывающихся зон, в которых ОЭ делится вдоль дорсо-вентральной (DV) оси. Внутри каждой зоны ОСН (olfactory sensory neurons), экспрессирующие разные ОР (обозначены каплями разных цветов), перемешаны. ОСН (olfactory sensory neurons), экспрессирующие ОР того же типа, образуют гломерулы (заштрихованные круги того же цвета, что и соответствующие ОСН (olfactory sensory neurons)) в специфических локусах ОЛ (olfactory bulb). Имеется соответствие между зональной организацией эпителия по ходу дорсо-вентральной (D-V) оси [2].

ственные группы. В этих зонах выделяют дополнительные ОР I и II класса, причем ОР II класса экспрессируются по всей поверхности ОЭ, тогда как экспрессия ОР I класса ограничивается дорсальной частью ОЭ [1]. То есть, обонятельные клетки, имеющие ген одного и того же рецептора, окружены обонятельными клетками с геном другого ОР, и эти группы не перемешиваются между зонами. В результате уже на уровне ОЭ создаются условия, обеспечивающие в дальнейшем проецирование аксонов, принадлежащих ОСН с ОР к данному одоранту, в определенную зону ОЛ. Следовательно, на поверхности ОЭ рецепторные клетки образуют “пространственные карты запахов” [48]. Таким образом, сенсорная информация до передачи ее в мозг организована в периферическом отделе, поскольку определенной зоной ограничены рецепторные клетки, реагирующие на свой специфический пахучий стимул [51, 52].

Таким образом, ОЭ представляет собой мозаику ОР, реагирующих на различные одоранты. Экспрессия ОР является непрерывной и перекрывается в различных зонах по всей дорсомедиальной и вентролатеральной оси ОЭ [2, 3]. При этом ОЖ разных клеток могут перекрываться. Поэтому в пределах одной зоны цилиарная сеть может содержать сложный ассортимент ОР, принадлежащих различным ОЖ.

Топография обонятельной луковицы

Как было отмечено, уже на уровне ОЭ создаются условия, обеспечивающие проецирование аксо-

нов, принадлежащих ОСН с ОР к данному одоранту, в определенную зону ОЛ. В результате в ней достигается пространственный порядок (рис. 2). Здесь аксоны нейронов, экспрессирующих один и тот же ОР, конвергируют, образуя синапсы с постсинаптическими клетками в гломерулах на медиальной и латеральной стороне каждой ОЛ. Конвергенция подобных аксонов с образованием гломерул в ОЛ была напрямую визуализирована посредством направленного мутагенеза на генетически модифицированной линии мышей P2-IRES-*Tau-LacZ*. У этой линии эндогенный P2-ОР коэкспрессировался с репортерным геном *Tau-lacZ*, в результате легко идентифицировались P2-нейроны в ОЭ и соответствующих гломерулах в ОЛ [53]. В последующих исследованиях замена *Tau-LacZ* зеленым флуоресцентным белком (GFP) позволила напрямую визуализировать ОСН и соответствующие гломерулы [2]. Таким образом, на уровне ОЛ происходит пространственное разделение сенсорных афферентов, организуя обонятельную топографическую карту, которая определяет качество и интенсивность сенсорных стимулов [54]. А принцип “один нейрон – один рецептор” распространяется и на гломерулы, которые подчиняются закону “одна гломерула – один рецептор”. В результате такой организации отличительной чертой зрелых гломерул является то, что они образованы исключительно волокнами ОСН, экспрессирующими один и тот же ОР. Такие гломерулы обозначают как гомогенные клубочки [52, 55].

Гломерулу определяют как функциональную единицу, которая обрабатывает сенсорную инфор-

мацию, связанную с тем ОР, который экспрессируется в ОСН, посылающим свой аксон в данную гломерулу. Эти функциональные единицы образуют “обонятельные колонки”, в которых пространственная сегрегация сенсорных афферентов формирует топографическую карту ОЛ (рис. 2) [1, 2, 56, 57].

В экспериментах по функциональной визуализации выявили, что одорант кодируется пространственным паттерном активированных гломерул в соответствии с архитектурой топографической карты и характером комбинаторного кода [58, 59]. Следовательно, для правильного кодирования запахов необходимы конкретное расположение и организация гломерул на карте ОЛ (рис. 2). А это, в свою очередь, связано с тем, что каждый клубочек получает информацию только от одного типа ОР, и его спектр реакций на запах определяется лиганд-связывающими свойствами этого рецептора в ОСН [1]. Из этого следует, что гломерула является центральным представителем различных ОР с высокой специфичностью в организации ольфакторных проекций и функциональной специализацией. ОР занимают определенные области в ОЛ и тесно вовлекаются в механизмы формирования этого паттерна проекции. Полагают, что ОР обеспечивают навигацию конуса роста аксонов в ОЛ [53, 60].

Поскольку ОСН, которые экспрессируют один и тот же рецептор, с исключительной точностью конвергируют к специфическим клубочкам на поверхности ОЛ: один на медиальной и один на латеральной стороне каждой ОЛ, пространственный порядок в ней достигается быстро. Этот паттерн конвергенции аксонов формирует анатомическую основу обонятельной сенсорной карты [11].

Таким образом, информация о молекуле одоранта обрабатывается локальными нейрональными цепями, в которых участвуют синаптические взаимосвязи внутри гломерулы, а также между ними в ОЛ. Образованное внутрибугорное звено обеспечивает второй уровень топографии ОЛ [2, 3].

Из вышесказанного следует: фундаментальным шагом в обонятельном кодировании считают преобразование молекулярных характеристик одоранта в пространственную карту активности нейронов. Суть процесса кодирования информации о запахе заключается в том, что вызываемая пахучим стимулом активность рецепторных нейронов, распределенных по всему ОЭ, трансформируется в пространственно организованный паттерн входа в гломерулы ОЛ. Далее эта карта ввода, вероятно, преобразуется синаптической обработкой внутри клубочков и между ними по мере того, как обонятельная информация передается на нейроны второго порядка (выходные) в ОЛ [59]. Полагают, что изменение эффективности дендро-дендритических синаптических соединений между специфическими подгруппами митральных и пучковых

клеток может быть одним из основных механизмов обонятельной памяти.

5. МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ФОРМИРОВАНИЯ СЕНСОРНОЙ КАРТЫ

Роль обонятельных рецепторов

В настоящее время на основе серий генетических экспериментов важную роль в формировании сенсорной карты стали приписывать ОР. Было показано, что для создания топографической карты качества запаха ольфакторные нейроны, экспрессирующие данный ОР, посылают свои проекции точно к 2 из 1800 гломерул в ОЛ. Но делеции или *non-sense* мутации в гене ОР P2 приводят к блужданию аксонов этих клеток. Они отклоняются от своего маршрута, а не сходятся на конкретной гломеруле. При замещении гена P2 кодирующей областью гена P3 приводят к проекции аксонов P3 → P2 на гломерулу клубочкового слоя P3 дикого типа. Следовательно, изменения последовательности ОР приводят к изменению конвергенции сенсорных нейронов и нарушению сенсорной карты [51, 61]. Таким образом, рецептор одоранта играет информативную роль в установлении топографической карты.

Согласно современным представлениям, одни и те же ОР локализируются как в ОЖ ОСН, так и в мембране конуса роста аксона этого рецепторного нейрона. Доказательством этого послужили иммуногистохимические исследования и исследования с двойным мечением с использованием линий трансгенных мышей. На серийных срезах ОЛ линий *mOR37*-трансгенных мышей эксперименты с двойной меткой показали, что отдельные иммунореактивные клубочки соответствуют гломерулам, на которые нацелены нейроны, экспрессирующие определенный член подсемейства рецепторов *mOR37*. Эти данные указывают на то, что белки ОР действительно присутствуют в аксональных отростках и ОЖ обонятельных нейронов. Таким образом, получены убедительные подтверждения представлений о том, что ОР участвуют в молекулярных процессах, лежащих в основе нацеливания обонятельных аксонов на ОЛ. Следовательно, ольфакторные рецепторы, расположенные в разных областях обонятельной клетки, обладают разными функциями: обнаруживают запахи в ОЭ и обеспечивают электрохимическое сопряжение для последующей генерации потенциалов действия, распространяющихся в ОЛ, тогда как эти же ОР на аксональном конусе роста, определяют мишени для аксонов ОСН в ОЛ [62].

Конус роста ОСН рассматривают как автономный компартмент, где локально транслируются и экспрессируются молекулы, участвующие в навигации аксона, наделяя окончание аксона способностью быстро реагировать на сигналы, встречаю-

щиеся на пути к его цели. Поэтому уникальная особенность организации обонятельной системы состоит в том, что ОР в ней играют двойную роль [2, 3, 63].

Механизм, лежащий в основе роли ОР в навигации аксона, изучен недостаточно. В одной из моделей предполагают, что ОР функционирует как рецептор наведения аксонов, способный распознавать молекулярные сигналы, происходящие из клеток в ОЛ, предоставляя аксону информацию для хемотаксиса. Согласно другой модели, для конвергенции сходных аксонов с образованием клубочков в специфических локусах в ОЛ в первую очередь необходимо создать взаимодействие между аксонами, экспрессирующими один и тот же ОР (гомотипическими аксонами). Полагают, что обе эти модели могут сосуществовать, но, возможно, на разных этапах процесса регуляции аксонального наведения. На разных стадиях могут доминировать разные механизмы [11].

Сигнальный путь, связанный с цилиарными ОР, хорошо известен. Он вовлекает цАМФ и Ca^{2+} . Функциональные характеристики ОР на аксональных конусах роста стали исследовать гораздо позже. Пространственно-временной анализ динамики цАМФ и Ca^{2+} в ОСН *in vitro* и *in situ* выявил, что ольфакторные рецепторы в конусе роста, так же, как и в ОЖ, способны связывать запахи и активировать аналогичный механизм трансдукции, вовлекающий стимуляцию АЦ-3, синтез цАМФ, который обеспечивает приток Ca^{2+} через CNG-каналы. Однако в этой зоне ОСН ионы кальция включаются в процесс экзоцитоза медиатора глутамата, а локальное повышение цАМФ инициирует активацию и транслокацию протеинкиназы А (ПК-А) в ядро. Эти данные свидетельствуют также о том, что Ca^{2+} и цАМФ, связанный с ОР аксонов, может оказывать свое действие в двух разных местах. Во-первых, локально, регулируя динамику цитоскелета для модуляции удлинения и поворота конуса роста аксона. Во-вторых, в ядре, посредством активации ПК-А для регулирования экспрессии молекул, участвующих в процессе наведения аксонов [11, 64]. Таким образом, были определены функциональные свойства ОР на конусе роста. Они играют роль в конвергенции аксонов и формировании сенсорной карты.

Эти данные свидетельствуют о том, что цАМФ, образующийся в результате активации ОР в аксонах, может оказывать свое действие в двух разных местах: локально, в области пресинапса, и в ядре [65]. Полагают, что локальный синтез цАМФ, инициируемый аксональными ОР, указывает на роль цАМФ в регуляции наведения аксонов, поскольку Gs-опосредованные сигналы цАМФ регулируют транскрипцию генов, кодирующих молекулы наведения аксонов, которые, в свою очередь, определяют расположение клубочков. Известно, что эти

вторичные мессенджеры играют ключевую роль в удлинении и повороте аксонов в нескольких системах, включая обонятельную [26, 33, 66].

Топографическое строение ОЛ требует четкого соответствия между ОСН, экспрессирующими данный ОР, со специфической гломерулой в ольфакторной луковице. Таким образом, формирование обонятельной карты зависит от тесной координации между экспрессией определенных навигационных молекул и определенных ОР. Однако механизм активации и функции рецептора запаха на конце аксона до сих пор неизвестен. Полагают, что существуют различные, специфические для мишени наборы рецепторов наведения, экспрессируемых в каждой категории нейронов [67]. Утверждают, что аксональные ОР могут действовать как сигналы наведения аксонов, активируясь молекулами, экспрессируемыми в ОЛ. Первым предполагаемым лигандом для них методом масс-спектрометрии был идентифицирован фосфатидилэтанолламин-связывающий белок 1 (РЕВР1). РЕВР1 представляет собой небольшую молекулу (около 21 кДа), экспрессирующуюся в нейронах и ненейронных клетках во многих областях мозга [61, 68]. В ОЛ мышей и крыс РЕВР1 локализуется в основном в перигломерулярных клетках, взаимодействующих с входящими сенсорными аксонами. Свидетельством того, что РЕВР1 является лигандом для аксональных ОР, послужили данные, в которых было показано, что его аппликация на кончик аксона ОСН и клетки НЕК, экспрессирующих специфические ОР, вызывала в этой области увеличение содержания Ca^{2+} . Однако несмотря на то, что получены убедительные доказательства непосредственного участия аксональных ОР в навигации аксонов ОСН к их мишени [68], непонятно, являются ли они одорантами для этих ОР, и нет сведений о том, синтезируются ли подобные сигнальные молекулы, обладающие аналогичным запахом, в обонятельной слизи. То есть пока остается неясным, как это происходит на молекулярном уровне.

Полагают, чтобы управлять нацеливанием аксона ОСН, ОР взаимодействуют с несколькими молекулярными сигналами наведения. При этом ОР играют инструктивную роль в формировании сенсорной карты, в которой необходимо не только найти место для аксонов, экспрессирующих одинаковые ОР, но расположить эти гломерулы в определенном порядке в ОЛ. В этом процессе участвуют такие лиганды, как эфрины, особенно эфрин А3 и А5, и соответствующие им рецепторы Eph, а также рецептор Neuropilin1 (Nrp1) и его лиганд Semaphorine3A (Sema3A). Они экспрессируются на конусе роста аксонов ОСН и определяют гломерулярную локализацию вдоль переднезадней бульбарной оси [2, 66]. Сигналами для навигации ОСН вдоль дорсо-вентральной оси служат молекулы Robo-2-Slit-1. Robo-2, рецептор хеморепеллен-

тов Slit, экспрессируется с высоким дорсомедиальным и низким вентролатеральным градиентом в ОЛ. Slit-1-Robo2 способствуют дорсальному нацеливанию ОСН. Slit-1 и Slit-3 необходимы для правильной иннервации вентральных бульбарных областей [2]. Neuropilin2 (Nrp2)-Semaphorine3F (Sema3F) также направляет аксоны к дорсальной области ОЛ [2]. Известно, что эти молекулы действуют как сигналы наведения аксонов для нескольких типов нейронов во время развития [69].

Необходимо отметить, что способность к пространственной сегрегации сенсорных афферентов вдоль переднезадней оси сильно коррелирует с экспрессией определенного типа ОР. ОСН, экспрессирующие один и тот же ОР, конвергируют с образованием гломерул на определенной стороне (медиальной или латеральной) каждой ОЛ. Таким образом, формируются две симметричные карты клубочков [2, 3]. Глобулярное расположение вдоль дорсо-вентральной оси ОЛ определяется местом ОСН в ОЭ. То есть ОСН, расположенные в самой дорсальной эпителиальной зоне, проецируют свои аксоны на самую дорсальную бульбарную часть, а ОСН в самой вентральной области ОЭ проецируют аксоны в вентральную область ОЛ [48, 70, 71].

Таким образом, формирование обонятельной карты представляет собой многоэтапный процесс. Для этого процесса необходимы молекулы клеточной адгезии, экспрессия которых коррелирует с экспрессией ОР. Ими оказались молекулы адгезии Kirrel2/Kirrel3 и лиганды Ephrin-A и EphA. Они участвуют в конечном процессе привлечения аксонов, экспрессирующих один и тот же рецептор, для формирования индивидуальных гломерул [52].

Следует отметить, что в механизме наведения аксонов ОР играют инструктивную роль, дальнейшую функцию на себя берет цАМФ. Он активирует ПК-А, транслоцирующуюся в ядро для синтеза молекулярных рецепторов, реагирующих с молекулами наведения и молекулами адгезии. цАМФ в конусе роста, как уже отмечалось, синтезируется в результате активации ОР, расположенного в этой области ОСН. Доказано, что ОР в ОЖ и кончике аксона аналогичны. Однако пока неясно, если этим лигандом является тот же одорант, который активирует ОР на ОЖ, то как он оказывается в области конуса роста?

Область-мишень в ОЛ в значительной степени определяют факторы навигации, связанные с эпителиальной областью или “зоной”, в которой экспрессируется ОР. Если эти условия нарушаются на уровне рецепторного аппарата, это может привести к неправильному формированию нейронных связей в центральных отделах обонятельной сенсорной системы, а, следовательно, к нарушению обоняния. Возможно, этим можно объяснить ослабление обоняния вплоть до его отсутствия у людей, перенесших COVID-19. С одной стороны, у них

преобладают незрелые рецепторные нейроны в ОЭ, а следовательно, меньше экспрессируется ОР. С другой стороны, у них может нарушаться синтез факторов наведения [72].

Как уже было сказано выше, ОР играют две разные роли в функционировании ОСН: обнаруживают пахучие молекулы и определяют выбор аксонов-мишеней в ОЛ. Таким образом, ОР не только преобразовывают химические раздражители из внешнего мира в электрические сигналы, но и определяют передачу этой информации в мозг, направляя формирование нейронной цепи в ОЛ посредством хемотаксиса кончика аксона в градиенте концентрации хемоаттрактанта. Следует отметить, что ОР как “хемосенсорный рецептор” функционирует также в сперме, где он модулирует движения жгутиков, влияющие на хемотаксис сперматозоидов [73, 74]. ОР участвует в хемотаксисе самих ОЖ, увеличивая вероятность взаимодействия с одорантом, а, следовательно, обонятельную чувствительность [11, 17, 63]. Эти данные свидетельствуют о том, что хемотаксические функции ОР сохраняются и, таким образом, используются несколькими системами для регуляции процессов, включающих подвижность и навигацию [75]. Однако процесс формирования обонятельной топографической карты эффективен, если имеются для этого важные условия – аминокислотная последовательность ОР, уровень экспрессии рецепторного белка и время его экспрессии, которые являются важными детерминантами сортировки. Для конвергенции аксонов ОСН в гломерулах необходимо также сопряжение ОР с G-белком [34]. Нарушения сортировки аксонов в ОЛ, связанные с мутацией G_{olf} , могут приводить к дисфункции обоняния. Вероятно, это может являться одной из причин ослабления обоняния при шизофрении, при которой мутирует G_{olf} [76, 77].

Таким образом, уникальной особенностью организации обонятельной системы является двойная роль ОР: они улавливают запахи в эпителии носа и играют инструктивную роль в конвергенции аксонов ОСН в специфических локусах, т.е. гломерулах ОЛ.

Роль цАМФ

Факт того, что аксоны, принадлежащие обонятельным клеткам, несущим одинаковые ОР, конвергируют на специфические гломерулы в ОЛ и формируют таким образом топографическую сенсорную карту, установлен давно. Вместе с тем в настоящее время активно изучаются специфические молекулярные механизмы навигации аксонов к своим мишеням. Помимо роли, которую играют в этом процессе ОР, локализованные в аксонном холмике, внимание исследователей к хемотаксису

аксонов привлекает участие цАМФ, синтезируемого в этой области ОСН.

Из вышеизложенного следует, что внутриклеточный сигнальный путь на конусе роста аксонов аналогичен таковому на ОЖ [11, 61, 63, 64, 68, 78].

Существуют убедительные доказательства центральной роли цАМФ в развитии сенсорной карты [33, 79, 80]. Методом генетической мутации с отменной синтеза цАМФ выявили, что аксоны, несущие эту мутацию, никогда не проникали в гломерулярный слой, а оставались в слое обонятельного нерва. Эта линия мышей была полностью лишена обоняния, и у них было изменено слияние сенсорных аксонов с образованием гломерул. Формирование и организация клубочков нарушались таким образом, что аксоны ОСН нацеливались на ОЛ, но не могли сформировать отчетливые и четко определенные гломерулы. Кроме того, многие клубочки были гетерогенными, поскольку содержали волокна, принадлежащие ОСН, экспрессирующим ОР к разным одорантам [66, 80, 81].

Это означает, что цАМФ, синтезируемый в кончике аксона ОСН под действием сигналов из ОЛ, регулирует экспрессию молекул его навигации к своей мишени в ОЛ [33, 81]. Одним из источников бульбарных сигналов, как полагают, являются ранние дифференцирующиеся проекционные нейроны, митральные клетки [82]. Каким образом цАМФ регулирует направленное движение аксона в градиенте концентрации хемоаттрактанта, т.е. хемотаксис аксона? Одним из предлагаемых специфических механизмов регуляции аксонального хемотаксиса является регуляция посредством изменения уровней цАМФ. Таким путем регулируются транскрипция и экспрессия таких молекул наведения аксонов, как *Ngr1* и *Sema3A*, *Kirrel2/3*, эфрин-А/*EphA* [1, 78, 83]. При этом ОСН, экспрессирующие разные ОР, могут содержать разные уровни цАМФ. Именно от этого будет зависеть экспрессия тех молекул наведения, которые будут нацеливать аксоны в заданном направлении: по переднезадней или дорсо-вентральной оси ОЛ [84]. Процессы транскрипции осуществляются в ядре. Выше уже говорилось о том, что помимо локального действия цАМФ может функционировать на ядерном уровне. Активация аксональных ОР и повышение уровней цАМФ на кончике аксона активируют транслокацию ПК-А в ядро. Здесь этот ключевой фермент цАМФ-сигнального пути регулирует экспрессию генов молекул навигации аксона [11, 63].

Таким образом, цАМФ играет центральную роль в установлении нейронных связей в ОЛ. Если будут созданы соответствующие связи, нейрон продолжит свое созревание и выживет. Однако если соединения не установлены, возможно, из-за неправильного нацеливания, нейрон погибает под действием каспазы-8 [11].

Вместе с тем необходимо учитывать и то обстоятельство, что ОСН живут около 35 дней и погибают. Затем пул рецепторных клеток восстанавливается из базальных клеток. То есть ОЭ подвергается нейрогенезу на протяжении всей жизни [85, 86]. Поэтому для организации обонятельной топографической карты важен контроль за ее постоянным уточнением. Этот процесс регулируется сложным взаимодействием между активностью нейронов и молекулярными сигналами. Суть его заключается в том, что экспрессию рецепторов на поверхности растущих аксонов контролирует активность ОСН. Это позволяет аксонам дифференцированно изменять свои реакции на различные молекулы адгезии и наведения, экспрессируемые на аксонах, глии, внеклеточном матриксе и внутри ОЛ [84]. Нейронная активность, вызываемая стимуляцией одорантом, служит для непрерывного уточнения гломерулярной карты, тем самым предотвращая накопление ошибок навигации [87]. Однако вызванная запахом нейронная активность оказывает лишь ограниченное влияние на конвергенцию на клубочки, и, следовательно, на топографию ОЛ [11]. Она не оказывает существенного влияния на формирование сенсорной карты, что продемонстрировано в экспериментах на нескольких трансгенных линиях мышей, несущих генетические мутации таких ключевых элементов пути обонятельной трансдукции, как *CNG*-каналы [78, 88] или G_{olf} [89]. При мутации в генах, кодирующих *CNG*-каналы и G_{olf} , исчезают реакции на одоранты, но синтез цАМФ сохраняется, обеспечивая нормальное развитие сенсорной карты. Из этого следует, что если в ОСН сохраняется способность продуцировать цАМФ, то сохраняется возможность организации бульбарной топографической карты.

Оказалось, что важную роль в уточнении и поддержании топографической организации ОЛ играет спонтанная афферентная активность [63, 90–92]. Было установлено, что она играет важную роль не только в развитии, но и в поддержании топографии ОЛ и в обработке сенсорной информации [52, 90]. Нарушение спонтанной афферентной активности изменяет исходное нацеливание аксонов обонятельных клеток на ольфакторную луковицу [11].

Источником спонтанной активности служит наличие электропроводности в ОСН в “покое”. Известно, что мембраны ОСН земноводных в отсутствие пахучей стимуляции (“покой”) обладают электропроводностью порядка 158 пСм, которая обусловлена проницаемостью для ионов калия и кальция [93, 94]. В мембране ОСН обнаружены 4 типа K^+ -каналов с разной электропроводностью [95]. Однако от 20 до 40% электропроводности цилиарной мембраны связаны с токами, текущими через *CNG*-каналы, открытыми в “покое”. В изолированных нестимулируемых обонятельных клетках рыб, лягушек, крыс генерируются спон-

танные потенциалы действия с частотой 100 в 1 мин. С ними связывают чувствительность к слабым стимулам [93]. Показано, что в “покое” ОЖ двигаются. У земноводных движения совершаются с участием механочувствительных, потенциал-зависимых и CNG-Са-каналов, открытых в отсутствие одорантов [17]. При этом спонтанная активация ОР в спонтанной активности ОСН не участвует. Эксперименты на специально созданной трансгенной линии мышей, экспрессирующих бета-адренергические рецепторы, доказали, что спонтанная активность ОСН поддерживается цАМФ [96].

Таким образом, в покоящихся ОСН, вероятно, благодаря двигательной активности ОЖ поддерживается определенный уровень цАМФ, участвующий в уточнении и поддержании топографической организации ОЛ [97].

Нейронные сети в ОЛ

В ОЛ образуются специфические связи, необходимые для нормальной работы мозга. В ней информация о запахе, закодированная в обонятельной карте, обрабатывается в локальных нейронных цепях, а затем передается митральными и пучковыми клетками в различные области обонятельной коры.

Развитие обонятельной карты регулируется сложным взаимодействием в пространстве и времени между молекулами навигации аксонов и активностью нейронов. Отличительной чертой зрелых гломерул (что представляет собой отличительную особенность в организации ОЛ) является то, что они иннервируются волокнами, экспрессирующими исключительно один и тот же ОР. Аксоны ОСН образуют синаптические соединения с несколькими мишенями в ОЛ, включая юктагломерулярные, митральные и пучковые клетки, образуя внутригломерулярную сеть [1].

Различные типы клеток ОЛ образуют столбчатую структуру, при этом каждая гломерула вносит свой вклад в свою собственную колонку клеток. Поэтому “обонятельную колонку” определяют как функциональную единицу ОЛ. Эксперименты с сенсорной депривацией показали, что внутрибугарная карта сохраняет высокий уровень пластичности на протяжении всей жизни. Аналогичный гломерулярной обонятельной карте уровень точности повторяется в карте второго порядка, состоящей из центральных нейронов [11].

Обонятельная кора интерпретирует карты запахов от ОЛ и переводит обонятельную информацию в поведенческие реакции. Каким образом? Синаптические входы от ОСН получают два типа проекционных нейронов в каждом клубочке: митральные и пучковые клетки. Поскольку каждая митральная/пучковая клетка посылает один первичный дендрит в специфическую гломерулу, каждая клетка специа-

лизуется для обработки обонятельных входов от одного вида ОР [57].

Синаптическая передача с аксонов ОСН на мишени в ОЛ осуществляется с участием цАМФ. Свои эффекты он проявляет посредством активации обонятельных пресинаптических CNG-каналов. Показано, что высокие концентрации цАМФ ингибируют синаптическую передачу с обонятельного нерва на эти мишени. Но циклонуклеотиды могут как подавлять, так и стимулировать синаптическую передачу посредством активации зависимых от них каналов. Поэтому CNG-каналы способны модулировать нейротрансмиссию. Следовательно, помимо регуляции сенсорной трансдукции цАМФ может играть более широкую роль в ЦНС, нацеливая аксоны в нужном направлении и образуя интрабугарные химические синапсы [46].

Вместе с тем методом электронно-микроскопической реконструкции было показано, что в ОЛ формируются электрические синапсы. Щелевые контакты образуются между дендритами митральных и юктагломерулярных клеток и дендритами перигломерулярных клеток и между дендритами митральных и юктагломерулярных клеток и дендритами других типов интернейронов [98]. Это означает, что в формирование нейронных сетей в ОЛ помимо химических включаются электрические синапсы, которые способствуют синхронности нейрональной активности в ОЛ, формируя локальные интрагломерулярные нейронные цепи [98–101]. И здесь цАМФ играет важную роль в установлении синаптических связей, а следовательно, в формировании нейронных цепей. Это связано с тем, что цАМФ регулирует механизм транспорта щелевых соединений для биогенеза функциональных электрических синапсов. На них приходится почти 20% связи в зрелой нервной системе [102].

Гломерула – функциональная единица для обработки обонятельной информации. Тонкая настройка уровней выходного сигнала от каждой гломерулы важна для процесса обработки ольфакторной информации в обонятельной сенсорной системе. Взаимодействие между нейрональными элементами в гломеруле может быть одним из основных механизмов, регулирующих этот уровень выходного сигнала [98]. Внутригломерулярные взаимодействия могут изменять силу сигнала в постсинаптических нейронах и изменять пространственный паттерн активности, вызванной запахом. Возбуждающие связи в клубочках в форме как щелевых, так и химических синаптических соединений могут приводить к усилению сигнала. Внутриклубочковое торможение может служить механизмом контроля усиления, действующим пресинаптически на синапсы ОСН или через постсинаптическое торможение основных клеток [1].

Если нарушается организация сенсорной карты в ОЛ, то могут изменяться связи между гомологичными гломерулами. В результате возможного неполного уточнения или неправильного нацеливания аксональных проекций внутрибульбарная связь может быть менее точной, а результирующая топографическая карта более размытой на ранних стадиях развития. Причиной неправильного формирования связей внутри ОЛ является ослабление спонтанной активности клеток. Как было сказано выше, нарушенная спонтанная активность влияет на уровни таких вторичных мессенджеров, как Ca^{2+} и циклические нуклеотиды, которые, как известно, играют критическую роль в нацеливании аксонов в ОЛ [90, 103]. Следовательно, можно предположить, что образование внутрибульбарных нейрональных цепей и организация анатомических и функциональных карт ОЛ будут зависеть от цАМФ. Их изменения будут влиять на обонятельное поведение [90]. Это означает, что дисфункция внутриклеточной сигнальной системы цАМФ в ОСН может влиять на обоняние.

Так, например, при шизофрении в обонятельном сенсорном эпителии обнаруживается значительное снижение экспрессии АЦ-3, а следовательно, сниженная продукция цАМФ. Неслучайно эти пациенты страдают пониженной обонятельной чувствительностью [104]. Кроме того, при некоторых психических заболеваниях затрудняется процесс распознавания запахов, свидетельствуя об ослаблении когнитивной функции [105]. Это связано с тем, что ОЭ тесно связан с важными лимбическими и нейроэндокринными областями головного мозга. Таким образом, механизмы обучения и памяти и механизмы обонятельного восприятия имеют общий анатомический субстрат. Цитоархитектурные аномалии в нем приводят к ослаблению обучения и памяти. Поэтому структурные нарушения в них будут сопровождаться обонятельной дисфункцией, а при ослаблении обоняния, в свою очередь, ухудшается познавательная деятельность, рабочая память, развивается депрессия, изменяются эмоции [106, 107].

В процессе запоминания, как известно, устанавливаются новые синаптические связи с образованием новых нейронных сетей. Синаптогенез не обходится без цАМФ. Его недостаток, по-видимому, формирует грубую связность сенсорной карты, отражающуюся на обонянии и способности к запоминанию информации [97, 102]. Нейронная сеть организована более сложно в центральном отделе обонятельного анализатора. Из ОЛ информация о запахе передается на обонятельную кору, в которую проецируют свои аксоны митральные и пучковые клетки. При этом информация о разных одорантах передается к определенным зонам коры, и в зависимости от области могут по-разному интерпретировать бульбарную карту запахов. То есть в пириформной коре выявили наличие простран-

ственной организации, или кластеобразование, нейронов передней пириформной коры, возникающее от одного типа ОР у мышей. Следовательно, пространственное представительство одорантов в ОЛ может сохраняться в обонятельной коре [108]. Так, например, в обонятельном бугорке вместе с прилежащим вентральным полосатым телом формируется мотивационное поведение, связанное с запахом пищи и страхом. Выходные нейроны обонятельного бугорка проецируют свои аксоны на вентральный паллидум, нейроны которого, в свою очередь, посылают аксоны к дофаминергическим нейронам в вентральной области покрышки. Следовательно, информация о запахе пищи, обработанная в обонятельном бугорке, по-видимому, влияет на дофаминергические цепи ожидания вознаграждения [56]. Таким образом, целостность нейронных связей будет определять обонятельное поведение и, в конечном итоге, выживание вида. Пириформная кора сохраняет топографическую организацию пространственного кодирования запаха, которое возникает в гломерулах ОЛ.

Многие психические расстройства, к которым относится, например, шизофрения, связывают с нарушением синаптогенеза и пластичности [109]. В экспериментах на мышах с нокаутом показано, что при потере щелевых контактов развиваются дефекты электрических синапсов в мозжечке, вызывающие нарушения двигательной функции. Отсутствие электрических синапсов в гиппокампе нарушает процессы долгосрочной потенциации, сопровождаясь ослаблением обучения и памяти. Отсутствие щелевых контактов в коре приводит к десинхронизации корковых интернейронов и нарушению функции коры в зрительной и обонятельной сенсорных системах. Дисфункция электрических синапсов способствует этиологии таких расстройств, как аутизм и эпилепсия [110]. Следовательно, можно предположить, что в их основе лежит нарушение функции внутриклеточной системы цАМФ в нейронах. Подтверждением этого служит анализ многочисленных клинических и экспериментальных данных, который привел исследователей к выводу, что патогенетические механизмы развития шизофрении связаны с нарушением регуляции цАМФ [111].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение пахучих сигналов из окружающей среды и формирование соответствующих поведенческих реакций в ответ на эти сигналы характеризуют функцию обонятельной сенсорной системы. ОСН, расположенные в полости носа, проецируют аксоны, которые синаптически соединяются с дендритами нейронов второго порядка в ОЛ, которые, в свою очередь, передают собранную информацию в области мозга более высокого порядка. Образующиеся соединения между рецепторными

клетками и ОЛ удивительно точны. Аксоны ОСН, экспрессирующие один и тот же ОР, иннервируют специфические клубочки внутри сложной трехмерной структуры ОЛ, локализующихся в определенных координатах в ее дорсо-вентральной, переднезадней и медиолатеральной осях.

Таким образом, связи между ОСН и специфическими для данного ОР гломерулами, образующие “обонятельные колонки”, межглобулярные связи и связи между ОЛ и обонятельными центрами более высокого порядка образуют нейронные сети, в формировании которых участвует цАМФ. Их нарушение в результате разрегулирования системы цАМФ вызывает нарушение функции нейронов ЦНС с последующим дефицитом когнитивной функции при психических заболеваниях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была профинансирована за счет средств государственного бюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (Е.В.Б.), написание статьи (Е.В.Б.), редактирование и подготовка финальной версии обзора (Е.В.Б., А.А.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murthy, Venkatesh N (2011) Olfactory maps in the brain. *Annu Rev Neurosci* 34: 233–258. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113738>
- Francia S, Lodovichi C (2021) The role of the odorant receptors in the formation of the sensory map. *BMC Biol* 19 (1): 174. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01116-y>
- Carr WES (1988) The Molecular Nature of Chemical Stimuli in the Aquatic Environment. In: Atema, J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN (eds) *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Springer. New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3714-3_1
- Бронштейн АА (1977) Обонятельные рецепторы позвоночных. Л. Наука. [Bronshstein AA (1977) Olfactory receptors in vertebrates. L. Nauka. (In Russ)].
- Cunningham AM, Manis PB, Reed RR, Ronnet GV (1999) Olfactory receptor neurons exist as distinct subclasses of immature and mature cells in primary culture. *Neurosci* 93: 1301–1312.
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175–187.
- Zhang R, Wang P, Yu S, Hansbro P, Wang H (2020) Computerized screening of G-protein coupled receptors to identify and characterize olfactory receptors. *J Toxicol Environment Health Part A* 83: 1–11. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1709305>
- Yu Y, Ma Z, PJ, Xu L, Li W, Belloir C, Topin J, Briand L, Golebiowski J, Cong X (2022) Extracellular loop 2 of G protein-coupled olfactory receptors is critical for odorant recognition. *J Biol Chem* 298: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102331>
- Kurian SM, Naressi RG, Manoel D, Barwich AS, Malnic B, Saraiva LR (2021) Odor coding in the mammalian olfactory epithelium. *Cell Tissue Res* 383 (1): 445–456. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03327-1>
- Ikegami K, de March CA, Nagai MH, Ghosh S, Do M, Sharm R, Bruguera ES, Lu YE, Fukutania Y, Vaidehid N, Yohd M, Matsunami H (2020) Structural instability and divergence from conserved residues underlie intracellular retention of mammalian odorant receptors. *PNAS* 117: 2957–2967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915520117>
- Lodovichi C, Belluscio L (2012) Odorant Receptors in the Formation of the Olfactory Bulb Circuitry. *Physiology* 27: 200–212. <https://doi.org/10.1152/physiol.00015.2012>
- Omura M, Takabatake Y, Lempert E, Benjamin-Hong S, D'Hulst C, Feinstein P (2022) A genetic platform for functionally profiling odorant receptors in olfactory cilia *ex vivo*. *Science Signal* 15: eabm6112. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abm6112>
- Hayden S, Teeling EC (2014) The Molecular Biology of Vertebrate Olfaction. *Anat Record* 297: 2216–2226. <https://doi.org/10.1002/ar.23031>
- Kim B-R, Rha M-S, Cho H-J, Yoon J-H, Kim C-H (2023) Spatiotemporal dynamics of the development of mouse olfactory system from prenatal to postnatal period. *Front Neuroanat* 17: 1157224. <https://doi.org/10.3389/fnana.2023.1157224>
- Barry WA, Janet M (2005) Young Olfaction: Diverse Species, Conserved Principles Review. *Neuron* 48: 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.022>
- Connelly T, Yua Y, Grosmaître X, Wang J, Santarelli LC, Savigner A, Qiao X, Wang Z, Storm DR, Ma M (2017) G protein-coupled odorant receptors underlie mechanosensitivity in mammalian olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 590–595. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418515112>
- Bigdaj EV, Fufachev DK, Petrov PR, Samojlov VO (2017) Mechanisms of Electromechanical and Electrochemical Coupling in Olfactory Cilia of the Frog (*Rana temporaria*). *Biophysics* 62: 240–246. <https://doi.org/10.1134/S0006350917020051>
- Liu Q, Li S, Lu C, Yu CR, Huang L (2018) G protein γ subunit G γ 13 is essential for olfactory function and aggressive behavior in mice. *Neuroreport* 29: 1333–1339. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001122>
- Li R-C, Molday LL, Lin C-C, Yau K-W (2022) Low signaling efficiency from receptor to effector in olfactory transduction: A quantified ligand-triggered GPCR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119: e2121225119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121225119>
- Genovese F, Reisert J, Kefalov VJ (2021) Sensory Transduction in Photoreceptors and Olfactory Sensory Neurons: Common Features and Distinct Characteristics.

- Front Cell Neurosci 15: 761416.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.761416>
21. *Cong X, Ren W, Pacalon J, Xu R, Xu L, Li X, de March CA, Matsunami H, Yu H, Yu Y, Golebiowski J* (2022) Large-Scale G Protein-Coupled Olfactory Receptor–Ligand Pairing. *ACS Cent Sci* 8: 379–387.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01495>
 22. *Jimenez RC, Casajuana-Martin N, Garcia-Recio A, Alcántara L, Pardo L, Campillo M, Gonzalez A* (2021) The mutational landscape of human olfactory G protein-coupled receptors. *BMC Biology* 19: 21.
<https://doi.org/10.1186/s12915-021-00962-0>
 23. *Li F, Ponissery-Saidu S, Yee KK, Wang H, Chen M-L, Iguchi N, Zhang G, Jiang P, Reisert J, Huang L* (2013) Heterotrimeric G Protein Subunit G 13 Is Critical to Olfaction. *J Neurosci* 33: 7975–7984.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5563-12.2013>
 24. *Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GCK, Lowe G, Gagar A, Xia Z, Gold GH, Storm DR* (2000) Disruption of the Type III Adenylyl Cyclase Gene Leads to Peripheral and Behavioral Anosmia in Transgenic Mice. *Neuron* 27: 487–497.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00060-x)
 25. *Ostrom KF, LaVigne JE, Brust TF, Seifert R, Dessauer CW, Watts VJ, Ostrom RS* (2022) Physiological roles of mammalian transmembrane adenylyl cyclase isoforms. *Physiol Rev* 102 (2): 815–857.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2021>
 26. *Hanoune J, Defer N* (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 145–174.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145>
 27. *Bakalyar HA, Reed RR* (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250: 1403–1406.
<https://doi.org/10.1126/science.2255909>
 28. *Devasani K, Yao Y* (2022) Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS. *Fluids Barriers CNS* 19: 23.
<https://doi.org/10.1186/s12987-022-00322-2>
 29. *Liu X, Zhou Y, Li S, Yang D, Jiao M, Liu X, Wang Z* (2020) Type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium participates in depression-like and anxiety-like behaviours. *J Affect Disord* 268: 28–38.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.02.041>
 30. *Qiu L, LeBel RP, Storm DR, Chen X* (2016) Type 3 adenylyl cyclase: a key enzyme mediating the cAMP signaling in neuronal cilia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 8: 95–108.
 31. *Challis RC, Tian H, Yin W, Ma M* (2016) Genetic Ablation of Type III Adenylyl Cyclase Exerts Region-Specific Effects on Cilia Architecture in the Mouse Nose. *PLoS One* 11: e0150638.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150638>
 32. *Ou Y, Ruan Y, Cheng M, Moser JJ, Rattner JB, van der Hoorn FA* (2009) Adenylate cyclase regulates elongation of mammalian primary cilia. *Exp Cell Res* 315: 2802–2817.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.06.028>
 33. *Chesler AT, Zou D-J, Le Pichon CE, Peterlin ZA, Matthews GA, Pei X, Miller MC, Firestein S* (2007) A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1039–1044.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0609215104>
 34. *Kulaga HM, Leitch CC, Eichers ER, Badano JL, Lese-mann A, Hoskins BE, Lupski JR, Beales PL, Reed RR, Katsanis N* (2004) Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet* 36: 994–998.
<https://doi.org/10.1038/ng1418>
 35. *Mair RG, Gestel RC, Blank DL* (1982) Changes in morphology and physiology of olfactory receptor cilia during development. *Neuroscience* 7: 3091–3103.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90232-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90232-9)
 36. *Cao G, Lam H, Jude JA, Karmacharya N, Kan M, Jester W, Koziol-White C, Himes BE, Chupp GL, An SS, Panettieri RA Jr* (2022) Inhibition of ABCC1 Decreases cAMP Egress and Promotes Human Airway Smooth Muscle Cell Relaxation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 66(1): 96–106.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0345OC>
 37. *Erofeeva N, Meshalkina D, Firsov M* (2023) Multiple Roles of cAMP in Vertebrate Retina. *Cells* 12 (8): 1157.
<https://doi.org/10.3390/cells12081157>
 38. *Patra, C, Foster K, Corley JE, Dimri M, Brady MF* (2022) Biochemistry, cAMP. In: *StatPearls*. StatPearls Publ.
 39. *Slika H, Mansour H, Nasser SA, Shaito A, Kobeissy F, Orekhov AN, Pintus G, Eid AH* (2023). Epac as a tractable therapeutic target. *Eur J Pharmacol* 945: 175645.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175645>
 40. *Boczek, T, Cameron EG, Yu W, Xia X, Shah SH, Castillo Chabeco B, Galvao J, Nahmou M, Li J, Thakur H, Goldberg JL, Kapiloff MS* (2019) Regulation of Neuronal Survival and Axon Growth by a Perinuclear cAMP Compartment. *J Neurosci* 39 (28): 5466–5480.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-18.2019>
 41. *Pun RYK, Kleene SJ* (2003) Contribution of Cyclic-Nucleotide-Gated Channels to the Resting Conductance of Olfactory Receptor Neurons. *Biophys J* 84: 3425–3435.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70064-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70064-2)
 42. *Zaccolo M, Di Benedetto G, Lissandron V, Mancuso L, Terrin A, Zamparo I* (2006) Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signaling. *Biochem Soc Trans* 34: 495–497.
<https://doi.org/10.1042/BST0340495>
 43. *Di Benedetto G, Iannucci LF, Surdo NC, Zanin S, Conca F, Grisan F, Gerbino A, Lefkimmatis K* (2021) Compartmentalized Signaling in Aging and Neurodegeneration. *Cells* 10 (2): 464.
<https://doi.org/10.3390/cells10020464>
 44. *Turetsky BI, Moberg PJ* (2009) An odor-specific threshold deficit implicates abnormal intracellular cyclic AMP signaling in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 166: 226–233.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07071210>
 45. *Ronnett GV, Moon C* (2002) G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol* 64: 189–222.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082701.102219>
 46. *Murphy GJ, Isaacson JS* (2003) Presynaptic Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels Modulate Neurotransmission in the Mammalian Olfactory Bulb. *Neuron* 37: 639–647.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00057-6)

47. *Takeuchi H, Kurahashi T* (2005) Mechanism of Signal Amplification in the Olfactory Sensory Cilia. *J Neurosci* 25: 11084–11091. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1931-05.2005>
48. *Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB* (1994) A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* 4: 588–596. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90061-2)
49. *Takeuchi H, Kurahashi T* (2003) Identification of second messenger mediating signal transduction in the olfactory receptor cells. *J Gen Physiol* 122: 557–567. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308911>
50. *Breer H* (1993) Olfactory receptor cells: recognition and transduction of chemical signals. *Cytotechnology* 11: 13–16. <https://doi.org/10.1007/BF00749052>
51. *Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, Sakano H* (2003) Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302: 2088–2094. <https://doi.org/10.1126/science.1089122>
52. *Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H* (2006) A Neuronal Identity Code for the Odorant Receptor-Specific and Activity-Dependent Axon Sorting. *Cell* 127: 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.031>
53. *Mombaerts P* (1996) Targeting olfaction. *Curr Opin Neurobiol* 6: 481–486. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(96\)80053-5](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(96)80053-5)
54. *Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufal F* (2009) Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annu Rev Physiol* 71: 115–140. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100608>
55. *Rodriguez-Gil DJ, Bartel DL, Jaspers AW, Mobley AS, Imamura F, Greer CA* (2015) Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5821–5826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417955112>
56. *Mori K, Sakano H* (2011) How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annu Rev Neurosci* 34: 467–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>
57. *Firestein S* (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413: 211–218. <https://doi.org/10.1038/35093026>
58. *Belluscio L, Lodovichi C, Feinstein P, Mombaerts P, Katz LC* (2002) Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb. *Nature* 419: 296–300. <https://doi.org/10.1038/nature01001>
59. *Wachowiak M, Cohen LB* (2001) Representation of Odorants by Receptor Neuron Input to the Mouse Olfactory Bulb. *Neuron* 32: 723–735. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(2001009\)426:1<68::aid-cne5>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1096-9861(2001009)426:1<68::aid-cne5>3.0.co;2-z)
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00506-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00506-2)
60. *Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA* (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 22: 2469–2477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02469.2002>
61. *Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R* (1998) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93: 47–60. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81145-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81145-9)
62. *Strotmann J, Levai O, Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H* (2004) Olfactory Receptor Proteins in Axonal Processes of Chemosensory Neurons. *J Neurosci* 24: 7754–7761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2588-04.2004>
63. *Lodovichi C* (2020) Role of Axonal Odorant Receptors in Olfactory Topography. *Neurosci Insights* 15: 2633105520923411. <https://doi.org/10.1177/2633105520923411>
64. *Maritan M, Monaco G, Zamparo I, Zaccolo M, Pozzan T, Lodovichi C* (2009) Odorant receptors at the growth cone are coupled to localized cAMP and Ca²⁺ increases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3537–3542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813224106>
65. *Greer PL, Greenberg ME* (2008) From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 59: 846–860. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002>
66. *Imai T, Suzuki M, Sakano H* (2006) Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314: 657–661. <https://doi.org/10.1126/science.1131794>
67. *Dang P, Fisher SA, Stefanik DJ, Kim J, Raper JA* (2018) Coordination of olfactory receptor choice with guidance receptor expression and function in olfactory sensory neurons. *PLoS Genet* 14: e1007164. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007164>
68. *Zamparo I, Francia S, Franchi SA, Redolfi N, Costanzi E, Kerstens A, Fukutani Y, Battistutta R, Polverino de Lauro P, Munck S, De Strooper B, Matsunami H, Lodovichi C* (2019) Axonal odorant receptors mediate axon targeting. *Cell Rep* 29: 4334–4348. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.099>
69. *Takeuchi H, Sakano H* (2014) Neural map formation in the mouse olfactory system. *Cell Mol Life Sci* 71: 3049–3057. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1597-0>
70. *Astic L, Saucier D* (1986) Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res Bull* 16: 445–454. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(86\)90172-3](https://doi.org/10.1016/0361-9230(86)90172-3)
71. *Tsuboi A, Miyazaki T, Imai T, Sakano H* (2006) Olfactory sensory neurons expressing class I odorant receptors converge their axons on an antero-dorsal domain of the olfactory bulb in the mouse. *Eur J Neurosci* 23: 1436–1444. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04675.x>
72. *Бигдай ЕВ, Самойлов ВО* (2020) Обонятельная дисфункция как индикатор ранней стадии заболевания COVID-19. *Интеграция физиол* 1: 187–195. [*Bigdai EV, Samoilov VO* (2020) Olfactory dysfunction as an early indicator of COVID-19 disease. *Integrat fiziol* 1: 187–195. (In Russ)]. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-3-187-195>
73. *Kaupp UB, Alvarez L* (2016) Sperm as microswimmers – navigation and sensing at the physical limit. *Eur Phys J*

- Spec Top 225: 2119–2139.
<https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60097-1>
74. *Ali MA, Wang Y, Qin Z, Yuan X, Zhang Y, Zeng C* (2021) Odorant and Taste Receptors in Sperm Chemotaxis and Cryopreservation: Roles and Implications in Sperm Capacitation, Motility and Fertility. *Genes* 12 (4): 488.
<https://doi.org/10.3390/genes12040488>
75. *Oh SJ* (2018) System-Wide Expression and Function of Olfactory Receptors in Mammals. *Genomics Inform* 16: 2–9.
<https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.1.2>
76. *Borgmann-Winter KE, Wang H-Y, Ray R, Willis BR, Moberg PJ, Rawson NE, Gur RE, Turetsky BI, Hahn C-G* (2016) Altered G Protein Coupling in Olfactory Neuroepithelial Cells From Patients With Schizophrenia. *Schizophr Bull* 42: 377–385.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbv129>
77. *Бигдай ЕВ, Самойлов ВО, Синегубов АА* (2021) Комплексные нарушения обонятельной сенсорной системы при шизофрении. *Успехи физиол наук* 52: 93–104. [*Bigdai EV, Samoilov VO, Sinegubov AA* (2021) Complex disorders of the olfactory sensory system in schizophrenia. *Uspekhi fiziol nauk* 52: 93–104. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179821020028>
78. *Zheng C, Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Mombaerts P* (2000) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 26: 81–91.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81140-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81140-X)
79. *Sakano H* (2020) Developmental regulation of olfactory circuit formation in mice. *Dev Growth Differ* 62: 199–213.
<https://doi.org/10.1111/dgd.12657>
80. *Col JAD, Matsuo T, Storm DR, Rodriguez I* (2007) Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system. *Development* 134: 2481–2489.
<https://doi.org/10.1242/dev.006346>
81. *Zou D-J, Chesler AT, Le Pichon CE, Kuznetsov A, Pei X, Hwang EL, Firestein S* (2007) Absence of adenylyl cyclase 3 perturbs peripheral olfactory projections in mice. *J Neurosci* 27: 6675–6683.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0699-07.2007>
82. *Key B, ST John J* (2002) Axon Navigation in the Mammalian Primary Olfactory Pathway: Where to Next. *Chem Senses* 27: 245–260.
<https://doi.org/10.1093/chemse/27.3.245>
83. *Nakashima A, Ihara N, Shigeta M, Kiyonari H, Ikegaya Y, Takeuchi H* (2019) Structured spike series specify gene expression patterns for olfactory circuit formation. *Science* 365: eaaw5030.
<https://doi.org/10.1126/science.aaw5030>
84. *Cho JH, Prince JEA, Cloutier J-F* (2009) Axon guidance events in the wiring of the mammalian olfactory system. *Mol Neurobiol* 39: 1–9.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8047-7>
85. *van der Linden CJ, Gupta P, Bhuiya AI, Riddick KR, Hos-sain K, Santoro SW* (2020) Olfactory Stimulation Regulates the Birth of Neurons That Express Specific Odorant Receptors. *Cell Rep* 33: 1–26.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108210>
86. *Durante MA, Kurtenbach S, Sargi ZB, Harbour JW, Choi R, Kurtenbach S, Goss GM, Matsunami H, Goldstein BJ* (2020) Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans. *Nature Neurosci* 23 (3): 323–326.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-0587-9>
87. *Dang, P, Fisher SA, Stefanik DJ, Kim J, Raper JA* (2018) Coordination of olfactory receptor choice with guidance receptor expression and function in olfactory sensory neurons. *PLoS Genetics* 14 (1): e1007164.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007164>
88. *Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Vassalli A, Mombaerts P* (2004) Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta2-adrenergic receptor. *Cell* 117: 833–846.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.013>
89. *Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R* (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20: 69–81.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80435-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80435-3)
90. *Lorenzon P, Redolfi N, Podolsky MJ, Zamparo I, Franchi SA, Pietra G, Voccaccio A, Menin A, Murthy VN, Lodovichi C* (2015) Circuit formation and function in the olfactory bulb of mice with reduced spontaneous afferent activity. *J Neurosci* 35: 146–160.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0613-14.2015>
91. *Redolfi N, Lodovichi C* (2021) Spontaneous afferent activity carves olfactory circuits. *Front Cell Neurosci* 15: 637536.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2.021.637536>
92. *Qiu Q, Wu Y, Ma L, Xu W, Hills M Jr, Ramalingam V, Yu CR* (2021) Acquisition of innate odor preference depends on spontaneous and experiential activities during critical period. *eLife* 10: e60546.
<https://doi.org/10.7554/eLife.60546>
93. *Kleene SJ* (2008) The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem Senses* 33: 839–859.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjn048>
94. *Lindemann B* (2001) Predicted profiles of ion concentrations in olfactory cilia in the steady state. *Biophys J* 80: 1712–1721.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76142-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76142-5)
95. *Miyamoto T, Restrepo D, Teeter J* (1992) Voltage-dependent and odorant-regulated currents in isolated olfactory receptor neurons of the channel catfish. *J Gen Physiol* 99: 505–529.
<https://doi.org/10.1085/jgp.99.4.505>
96. *Nakashima A, Takeuchi H, Imai T, Saito H, Kiyonari H, Abe T, Chen M, Weinstein LS, Yu CR, Storm DR, Nishizumi H, Sakano H* (2013) Agonist-independent GPCR activity regulates anterior-posterior targeting of olfactory sensory neurons. *Cell* 154: 1314–1325.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.033>
97. *Song HJ, Ming GL, Poo MM* (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388: 275–279.
<https://doi.org/10.1038/40864>
98. *Kosaka T, Kosaka K* (2005) Intraglomerular dendritic link connected by gap junctions and chemical synapses in the mouse main olfactory bulb: Electron microscopic serial section analyses. *Neuroscience* 131: 611–625.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004>
99. *Vaughn MJ, Haas JS* (2022) On the Diverse Functions of Electrical Synapses. *Front Cell Neurosci* 16: 910015.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.910015>

100. Schubert C, Schulz K, Träger S, Plath A-L, Omriouate A, Rosenkranz SC, Morellini F, Friese MA, Hirnet D (2022) Neuronal Adenosine A1 Receptor is Critical for Olfactory Function but Unable to Attenuate Olfactory Dysfunction in Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci* 16: 912030. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.912030>
101. Tavakoli A, Schmaltz A, Schwarz D, Margrie TW, Schaefer AT, Kollo M (2018) Quantitative Association of Anatomical and Functional Classes of Olfactory Bulb Neurons. *J Neurosci* 38(33): 7204–7220. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0303-18.2018>
102. Palumbos SD, Skelton R, McWhirter R, Mitchel A, Swann I, Von Stetin SHS, Miller DM (2021) cAMP controls a trafficking mechanism that maintains the neuron specificity and subcellular placement of electrical synapses. *Development Cell* 56: 3235–3249. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.011>
103. West AE, Greenberg ME (2011) Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005744. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005744>
104. Chen X, Xu J, Li B, Guo W, Zhang J, Hu J (2018) Olfactory impairment in first-episode schizophrenia: a case-control study, and sex dimorphism in the relationship between olfactory impairment and psychotic symptoms. *BMC Psychiatry* 18 (1): 199. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1786-8>
105. Dahmani L, Patel RM, Yang Y, Chakravarty MM, Fellows LK, Bohbot VD (2018) An intrinsic association between olfactory identification and spatial memory in humans. *Nat Commun* 9: 4162. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06569-4>
106. Zald DH, Pardo JV (1997) Emotion, olfaction, and the human amygdala: amygdala activation during aversive olfactory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4119–4124. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.4119>
107. Le Coz M, Lévêque L, Da Silva MP, Le Callet P (2022) From Olfaction to Emotions: An Interactive and Immersive Experience. In: *ACM IMX Workshop EmotionIMX: Considering Emotions in Multimedia Experience – ACM Int Confer on Interact Media Exp: IMX*. 127–133. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20069384.v1>
108. Zelano C, Sobel N (2005) Humans as an animal model review for systems-level organization of olfaction. *Neuron* 48: 431–454. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.009>
109. Obi-Nagata K, Temma Y, Hayashi-Takagi A (2019) Synaptic functions and their disruption in schizophrenia: From clinical evidence to synaptic optogenetics in an animal model. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 95: 179–197. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.014>
110. Martin E, Lasseigne AM, Miller AC (2020) Understanding the Molecular and Cell Biological Mechanisms of Electrical Synapse Formation. *Front Neuroanat* 14: 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00012>
111. Tardito D, Tura GB, Bocchio L, Bignotti S, Pioli R, Racagni G, Perez J (2000) Abnormal levels of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits in platelets from schizophrenic patients. *Neuropsychopharmacology* 23: 216–219. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00161-X)

THE ROLE OF cAMP IN THE TOPOGRAPHIC ORGANIZATION OF THE OLFACTORY SYSTEM

E. V. Bigday^a and A. A. Razinova^{a,#}

^aSt. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

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

The article analyzes the literature data on the role of molecular olfactory receptors (OR) and cAMP in the formation of the topographic organization of the olfactory sensory system. Before its transmission to the brain, sensory information is already organized in the peripheral region according to the “one neuron—one receptor” principle, which also extends to the glomeruli in the olfactory bulb, which obey the “one glomerulus—one receptor” law. At present, an important role in the formation of the sensory map has been attributed to ORs, which plays a dual role in the organization of the olfactory system, since they are localized both in the olfactory cilia (OC) and in the membrane of the axon growth cone of the same olfactory sensory neuron (OSN), and determine the target for the axons of the OSN in the olfactory bulb (OB). However, there is strong evidence for the central role of the intracellular cAMP signaling system in sensory map development. Using the method of genetic mutation with the abolition of cAMP synthesis, it was revealed that the axons carrying this mutation never penetrate the glomerular layer, but remain in the layer of the olfactory nerve. At the same time, OSN axons target the OB but fail to form distinct and well-defined glomeruli, many of which become heterogeneous because they contain fibers belonging to OSNs expressing ORs for different odorants. Thus, cAMP synthesized in the tip of the RSN axon, under the action of signals from the OB, regulates the expression of molecules of its navigation to its target in the OB, and also forms intrabulbar chemical and electrical synapses, forming neuronal circuits. Numerous clinical and experimental data have led to the conclusion that the pathogenetic mechanisms of the development of some psychiatric diseases are associated with dysregulation of cAMP.

Keywords: olfactory receptors, olfactory sensory neurons, olfactory bulb, rhinotopic map, cyclonucleotide-dependent channels, cAMP

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ В ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ АТЛАНТИЧЕСКОГО ГЛУПЫША *FULMARUS GLACIALIS* ПРИ ИНВАЗИИ *TETRABOTHRIOUS MINOR* (CESTODA: TETRABOTHRIOIDAE)

© 2023 г. М. М. Куклина^{1,*}, В. В. Куклин¹

¹Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Россия

*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 23.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Изучено влияние инвазии *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae) на протеолитическую активность в слизистой оболочке тонкого кишечника атлантического глупыша *Fulmarus glacialis*. Рассмотрены аспекты изменения общей активности протеаз и протеаз различных подклассов (металлопротеаз, сериновых и цистеиновых протеаз) при инвазии тетработтриидами, проведена оценка способности *T. minor* инактивировать протеазы из слизистой оболочки кишечника птиц и коммерческий трипсин. Установлено, что в местах локализации *T. minor* (проксимальных и медиальных фрагментах тонкого кишечника) протеолитическая активность снижена за счет уменьшения активности сериновых протеаз и металлопротеаз. Обнаружена обратная зависимость значений протеолитической активности в слизистой оболочке тонкого кишечника хозяина от показателей заражения цестодами — чем выше интенсивность инвазии *T. minor*, тем ниже активность протеаз, в том числе металлопротеаз и сериновых протеаз. Отмечены способность гомогенатов *T. minor* ингибировать активность протеаз из слизистой оболочки кишечника глупыша и активность коммерческого трипсина разной концентрации.

Ключевые слова: *Tetrabothrius minor*, *Fulmarus glacialis*, активность протеаз, трипсин, сериновые протеазы, ингибирование

DOI: 10.31857/S0044452923050054, **EDN:** NDDTWL

ВВЕДЕНИЕ

Атлантические глупыши — морские птицы, большую часть своей жизни проводящие в море и появляющиеся на побережье только в период размножения [1]. Глупыши добывают корм в поверхностных горизонтах воды на глубине не более 1 м, а основу их рациона составляют головоногие моллюски, отходы рыбного промысла, рыба и полихеты [1, 2]. В баренцевоморском регионе колонии глупышей отмечены в Северной части Баренцева моря на архипелагах Новая Земля и Земля Франца-Иосифа [3, 4].

По данным паразитологических исследований установлено, что в гельминтофауне атлантических глупышей Баренцева моря доминируют черви *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae) [2]. Высокие показатели инвазии *T. minor* у глупышей отмечены и в западной, и в восточной частях открытой акватории Баренцева моря, а также в его прибрежных районах. Ленточные черви *T. minor* используют атлантического глупыша в качестве окончательного хозяина. Тетработтрииды локализуются в тонком кишечнике птиц, активно растут и продуцируют большое количество яиц для успешной реализации

жизненного цикла. В комфортной среде кишечника с постоянной температурой и питательными веществами цестоды, тем не менее, должны активно противостоять воздействию как иммунной системы, так и пищеварительных ферментов хозяина.

По данным ранее проведенных исследований отмечены определенные изменения в обмене веществ атлантических глупышей при заражении *T. minor* [5]. В плазме крови повышались концентрации общего белка, мочевой кислоты, гамма-глобулинов, модифицированной формы альбумина и активности трансаминаз у птиц, инвазированных половозрелыми цестодами. Указанные изменения биохимических показателей крови свидетельствуют об активизации белкового обмена и иммунной системы, а также об интоксикации организма хозяина при длительном паразитировании цестод *T. minor*.

Инвазия цестодами вызывает у позвоночных животных заметные изменения в активности пищеварительных протеаз [6–10]. Так, повышение активности протеаз зафиксировано при паразитировании цестод, сколекс которых оснащен мощным прикрепительным аппаратом с крупными за-

якоривающимися крючьями. В частности, увеличение протеолитической активности наблюдалось в кишечнике моевок (*Rissa tridactyla*) при заражении *Alcataenia larina*, в кишечнике щуки (*Esox lucius*) при заражении *Triaenophorus nodulosus* [8, 9]. Снижение активности протеаз показано для большинства случаев инвазии цестодами, сколекс которых оснащен только присосками или ботридиями [9–13]. Более того, установлено, что общее снижение активности протеаз происходит, прежде всего, за счет уменьшения активности сериновых протеаз (трипсина и химотрипсина) [9, 10].

Цель работы – определение общей активности протеаз и их подклассов (сериновых и цистеиновых протеаз, металлопротеаз) в слизистой оболочке тонкого кишечника атлантического глупыша *F. glacialis* при инвазии цестодами *T. minor*, а также изучение способности *T. minor* ингибировать протеолитическую активность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Атлантический глупыш *F. glacialis* и ленточные черви *T. minor* послужили в качестве материала исследования. Птицы ($n = 10$) отловлены на акватории Баренцева моря в июле 2015 г. Глупышей добывали с разрешения Федеральной службы по надзору в сфере природопользования России (№ 14/2015). Соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные руководящие принципы по уходу и использованию животных.

Птиц усыпляли хлороформом и взвешивали. Желудочно-кишечный тракт вырезали, отделяли печень и тонкий кишечник, которые затем очищали от брыжеек и жира и взвешивали. Тонкий кишечник делили на три фрагмента: проксимальный (от пилорического сфинктера), медиальный и дистальный. Химус собирали и использовали для паразитологического анализа. Слизистую оболочку каждого отдела снимали шпателем для биохимического анализа. Процедуру вскрытия птиц проводили при температуре +4°C.

Паразитологический анализ. Из каждого фрагмента тонкого кишечника извлекали обнаруженных ленточных червей, подсчитывали их количество, проводили систематическую идентификацию и определяли степень их зрелости. Устанавливали интенсивность инвазии (ИИ – количество экземпляров данного вида паразита в одной особи хозяина), рассчитывали экстенсивность инвазии (ЭИ – отношение количества птиц, зараженных паразитом данного вида, к общему количеству птиц в выборке) и среднюю интенсивность инвазии (СИИ). ИИ и СИИ вычисляли как для особей птиц, так и для каждого фрагмента тонкого кишечника. Обнаруженных червей использовали для экспериментальных исследований. Для этого гельминтов трижды

промывали охлажденным раствором Рингера для теплокровных животных и взвешивали.

Приготовление гомогенатов червей и слизистой оболочки кишечника птиц. Навески слизистой кишечника и ленточных червей гомогенизировали в охлажденном растворе Рингера для теплокровных животных в соотношении 1:20 (для слизистой кишечника) и 1:10 (для ленточных червей). Затем полученные гомогенаты центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при 4°C на центрифуге Centurion Scientific CR4000R (Britain). Полученные супернатанты использовали для определения протеолитической и ингибиторной активностей.

Определение протеолитической активности. Активность протеаз (АП) (трипсин КФ 3.4.21.4, химотрипсин КФ 3.4.21.1 и дипептидазы КФ 3.4.12.18) в гомогенате слизистой кишечника и активность коммерческого трипсина (MP Biomedicals, USA) измеряли с использованием 0.3% раствора азоказеина (Sigma, USA) в качестве субстрата, приготовленного на 0.05 М трис-НСI буфере, pH 7.5 [14]. К 0.5 мл гомогената слизистой оболочки добавляли 1.0 мл 0.3% раствора азоказеина. Смесь инкубировали при 40°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 1.0 мл 0.3М ТХУ. Затем центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли в кювете толщиной 1 см при длине волны 440 нм на спектрофотометре Jenway 6305 un/vis (Britain).

Одновременно проводили реакции для определения подклассов протеаз. Использовали ингибиторы: 100 мМ PMSF (фенил-метил-сульфонил-флуорид) (Sigma, USA), растворенный в DMSO (диметилсульфоксид) (Sigma, USA) – ингибитор сериновых протеаз; 0.5 М ЭДТА (Sigma, USA), растворенный в 1 М NaOH – ингибитор металлопротеаз; 1 мМ E-64 (Sigma, USA) – ингибитор цистеиновых протеаз. К 0.5 мл гомогената слизистой оболочки добавляли 50 мкл определенного ингибитора, перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем проводили измерения протеолитической активности с использованием 0.3% раствора азоказеина.

Активность ферментов представлена в виде условных единиц (усл. ед.) (разность оптической плотности субстрата и холостой пробы на грамм влажной массы ткани слизистой кишечника за час). Рассчитано соотношение (%) подклассов протеаз.

Определение ингибирующей способности червей. Для изучения ингибирующей активности червей использовали их гомогенаты *T. minor*, а в качестве источника протеаз служили гомогенаты слизистой оболочки кишечника атлантического глупыша и коммерческий трипсин (MP Biomedicals, USA) в концентрации 0.005, 0.01, 0.015 и 0.02 мг/мл, приготовленные на 0.05 М трис-НСI буфере, pH 7.5. Для определения ингибиторной активности к 0.5 мл го-

могената слизистой или к 0.5 мл раствора трипсина с определенной концентрацией добавляли 100 мкл гомогената ленточных червей, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Одновременно в контрольную пробу добавляли специфичный ингибитор сериновых протеаз (100 мМ PMSF) в объеме 100 мкл, а в холостую пробу – аналогичный объем раствора Рингера для теплокровных животных. Протеолитическую активность во всех пробах измеряли с использованием 0.3% раствора азо-казеина. Результаты представлены в процентах от исходных значений протеаз (гомогенат слизистой кишечника и раствор трипсина).

Статистическая обработка результатов. Результаты морфометрических измерений, показатели активностей ферментов и СИИ представлены в виде среднего значения ± ошибки средней (±SE). Статистический анализ выполнен с помощью программных пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., Талса, Оклахома, США). Сравнения между значениями активностей ферментов в тонком кишечнике атлантического глупыша, СИИ, массы червей, а также морфометрических измерений птиц проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Взаимосвязь между долей сериновых протеаз в слизистой оболочке кишечника и долей инактивации протеаз гомогенатами цестод *T. minor* проверяли с помощью корреляционного анализа. Зависимость между ингибирующей способностью и концентрацией трипсина изучали при помощи регрессионного анализа, а достоверность различий между влиянием гомогенатов половозрелых и молодых червей на активность трипсина проверяли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что в тонком кишечнике атлантического глупыша паразитировали ленточные черви *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae). Экстенсивность инвазии составила 100%, интенсивность инвазии варьировала от 79 до 696 экз. Большая часть червей обнаружена в проксимальном фрагменте кишечника (рис. 1), СИИ в проксимальном фрагменте превышала СИИ в медиальном отделе более чем в 8 раз ($p < 0.01$). Отмечено, что в проксимальном фрагменте паразитировали неполовозрелые особи *T. minor*. Их стробилы имели небольшой размер: длина изменялась от 1 до 5.7 см, а средняя масса червей в проксимальном фрагменте кишечника составляла 0.65 ± 0.15 г. В медиальном фрагменте обнаружены главным образом половозрелые цестоды *T. minor*, в их стробилах были членики со зрелыми яйцами. Длина стробил превышала 20 см, средняя масса червей в медиальном фрагменте составляла 0.24 ± 0.05 г. В дистальном фрагменте кишечника встречались одиночные экземпляры цестод.

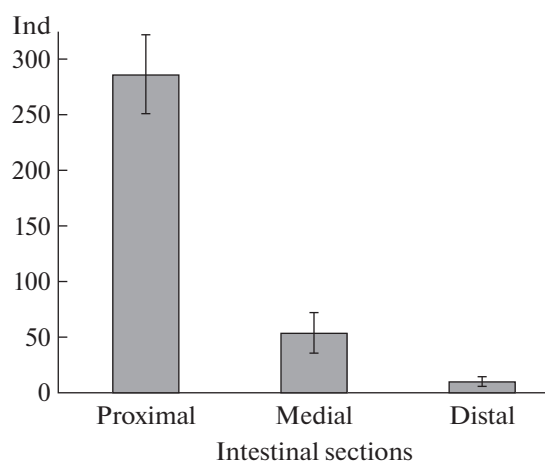


Рис. 1. Распределение ленточных червей *Tetrabothrius minor* в тонком кишечнике атлантического глупыша. На графике представлены показатели средней интенсивности инвазии *T. minor* для каждого фрагмента кишечника.

Проведено сравнение значений активностей протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах тонкого кишечника с аналогичными показателями дистального фрагмента (рис. 2). Установлено, что в слизистой кишечника проксимального и медиального фрагментов активности протеаз имели более низкие значения ($p < 0.05$). Отмечены различия в значениях активности подклассов протеаз и в их соотношении для каждого фрагмента кишечника. Зафиксировано снижение активностей сериновых протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах, металлопротеаз – в проксимальном фрагменте, цистеиновых протеаз – в медиальном фрагменте относительно параметров дистального фрагмента ($p < 0.05$).

Как уже отмечалось выше, все исследованные глупыши заражены цестодами *T. minor*, поэтому для проведения сравнительного анализа птицы были разделены на две группы в соответствии с показателями инвазии – ИИ и СИИ (табл. 1). Выделены глупыши с низкими (группа I) и высокими (группа II) параметрами заражения. СИИ у птиц из группы II превышало СИИ у птиц из группы I в 3.7 раза ($p < 0.05$). У птиц группы II были ниже значения массы тела, а массы их тонкого кишечника и слизистой оболочки кишечника, напротив, выше по сравнению с аналогичными показателями у птиц группы I ($p < 0.05$).

Установлено, что АП слизистой оболочки кишечника в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника у птиц с высокими показателями заражения (группа II) была ниже (более чем в два раза) по сравнению с АП птиц группы I ($p < 0.05$) (табл. 2). Аналогичная тенденция прослежена для сериновых протеаз и металлопротеаз ($p < 0.05$). Следует отметить отсутствие активности цистеи-

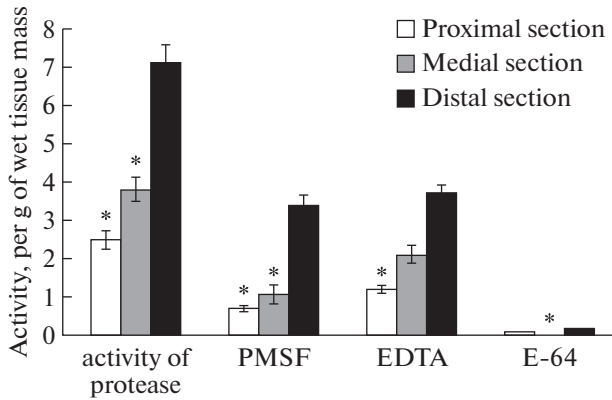


Рис. 2. Активность протеаз вдоль тонкого кишечника атлантического глупыша. Влияние ингибиторов на активность протеаз слизистой тонкого кишечника атлантического глупыша (проксимальный, медиальный и дистальный фрагменты). PMSF – сериновые протеазы, EDTA – металлопротеазы, E-64 – цистеиновые протеазы. Сравнительный анализ результатов представлен относительно показателей дистального фрагмента ($p < 0.05$).

новых протеаз в слизистой кишечника проксимального и медиального фрагментов у птиц из группы I. У птиц из группы II во всех трех фрагментах отмечена активность цистеиновых протеаз. Не зафиксировано статистически достоверных различий между значениями активностей протеаз и их подклассов (металлопротеаз, сериновых и цистеиновых протеаз) в слизистой оболочке кишечника дистального фрагмента у птиц из групп I и II. Процентное соотношение подклассов протеаз (металлопротеазы, сериновые и цистеиновые протеазы) в дистальном фрагменте кишечника не отличалось у глупышей независимо от интенсивности инвазии (рис. 3). Доли сериновых протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника не имели достоверных различий у птиц из обеих групп. У птиц из группы II доля прочих протеаз была выше в местах локализации червей (проксимальный и медиальный фрагменты) по сравнению

с аналогичными параметрами у птиц из группы I ($p < 0.05$).

Экспериментальные исследования показали, что гомогенаты цестод *T. minor* способны ингибировать активность протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника атлантического глупыша. В среднем гомогенатом червей ингибируется $8.1 \pm 0.8\%$ активности протеаз, функционирующих в слизистой оболочке кишечника. В то же время при воздействии PMSF на слизистую кишечника отмечено снижение активности протеаз на $28.1 \pm 3.1\%$. По итогам изучения способности *T. minor* ингибировать активность протеаз из разных фрагментов тонкого кишечника глупыша максимальный процент инактивации гомогенатами цестод *T. minor* зарегистрирован для протеаз из слизистой дистального фрагмента кишечника (рис. 4). Согласно результатам корреляционного анализа показателей инактивации протеаз слизистой кишечника гомогенатами цестод *T. minor* и ингибитором сериновых протеаз (PMSF), выявлена слабая положительная корреляция между долей сериновых протеаз в слизистой кишечника и долей инактивации протеаз гомогенатами цестод *T. minor* ($r = 0.37$).

В ходе экспериментального исследования установлено, что гомогенаты как неполовозрелых, так и половозрелых цестод *T. minor* способны ингибировать активность трипсина (рис. 5). Регрессионный анализ и вычисленный коэффициент детерминации установили зависимость изменения степени инактивации трипсина от его концентрации в среде ($R^2 = 0.89$ для неполовозрелых червей, $R^2 = 0.85$ для половозрелых червей). Сравнение значений двух прямых регрессии показало, что ингибиторная активность цестод *T. minor* не зависела от стадии зрелости червей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования установлено, что в тонком кишечнике атлантического глупыша паразитировали ленточные черви *T. minor* с высокими показателями инвазии (ЭИ – 100%, ИИ 79–696 экз.).

Таблица 1. Характеристики групп атлантического глупыша с различными показателями заражения ленточными червями *Tetrabothrius minor*

Признаки	I группа	II группа
ИИ, экз.	79–234	368–696
СИИ, экз.	143.4 ± 25.7	$537.8 \pm 49.9^*$
Масса червей, г	0.5 ± 0.07	$1.1 \pm 0.19^*$
Масса тела глупыша, г	839.0 ± 30.2	$775.0 \pm 43.3^*$
Масса печени глупыша, г	34.8 ± 2.8	42.4 ± 1.7
Масса тонкого кишечника глупыша, г	32.2 ± 2.0	$42.4 \pm 2.6^*$
Масса слизистой тонкого кишечника глупыша, г	3.8 ± 0.23	$6.1 \pm 0.7^*$

* Достоверность различия показателей относительно показателей птиц группы I, $p < 0.05$.

Таблица 2. Активность протеаз в тонком кишечнике атлантического глупыша в зависимости от показателей заражения *Tetrabothrius minor*: группа I (ИИ 79–234 экз.) и группа II (ИИ 368–696 экз.)

Группы птиц	Фрагменты кишечника		
	Проксимальный	Медиальный	Дистальный
Общая активность протеаз, усл. ед.			
группа I	3.8 ± 0.7	6.0 ± 1.4	7.5 ± 0.8
группа II	1.7 ± 0.5*	2.3 ± 0.9*	6.5 ± 2.5
Активность сериновых протеаз, усл. ед.			
группа I	0.9 ± 0.2	1.7 ± 0.5	3.6 ± 0.9
группа II	0.5 ± 0.1*	0.8 ± 0.4*	3.0 ± 0.8
Активность металлопротеаз, усл. ед.			
группа I	2.1 ± 0.3	3.7 ± 0.9	4.1 ± 0.6
группа II	0.6 ± 0.3*	1.1 ± 0.4*	3.4 ± 1.8
Активность цистеиновых протеаз, усл. ед.			
группа I	0	0	0.12 ± 0.06
группа II	0.1 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.1 ± 0.03

* Достоверность различия показателей относительно показателей птиц группы I, $p < 0.05$.

В местах локализации *T. minor* в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника птиц отмечено снижение активности протеаз по сравнению с показателями дистального фрагмента. С одной стороны, этот факт (повышение активности протеаз в проксимально-дистальном направлении) может свидетельствовать о неравномерном распределении протеаз вдоль тонкого кишечника глупыша. Имеется информация о том, что распределение активности протеаз вдоль тонкого кишечника отличается у разных видов птиц и зависит от их возраста, спектра питания, сезона [8, 11–13, 15–17]. Повышение активности протеаз вдоль тонкого кишечника в проксимально-дистальном направлении отмечено у взрослых моевок и у толстоклювой (*Uria lomvia*) и тонкоклювой кайр (*U. aalge*) [8, 13]. У указанных морских птиц рыба и ракообразные составляли основу спектра питания. Но при этом у птенцов моевки, в желудках которых обнаружены только рыбные остатки, активность протеаз, напротив, уменьшалась в направлении от проксимального фрагмента к дистальному [8]. Экспериментальные исследования показали, что у миртового лесного певуна (*Dendroica coronate*), диету которого составляли насекомые, активность аминопептидазы N увеличивается в проксимально-дистальном направлении, а при кормлении его фруктами или семенами активность фермента имела максимальное значения в медиальном фрагменте кишечника [15]. В то же время активность аминопептидазы N у всеядного домашнего воробья (*Passer domesticus*) повышалась в проксимально-дистальном направлении, и такое распределение не изменялось независимо от состава диеты [16, 17].

С другой стороны, снижение активности протеаз в направлении от проксимального фрагмента к дистальному может быть связано с паразитированием цестод в передних фрагментах кишечника у глупыша. Так, у незараженных взрослых серебристых чаек (*Larus argentatus*) активность протеаз снижалась от проксимального к дистальному фрагментам кишечника, а при заражении цестодами *Tetrabothrius erostris* активность протеаз в слизистой у серебристых чаек, напротив, повышалась в проксимально-дистальном направлении [12]. При этом черви *T. erostris* паразитировали в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника серебристых чаек. При изучении взаимоотношений в системе атлантический глупыш – *T. minor* максимальные значения активности кислых и щелочных протеаз отмечены в проксимальном фрагменте, а в медиальном и дистальном фрагментах эти значения не имели достоверных различий независимо от стадии зрелости ленточных червей [5]. В представленном исследовании более низкая активность протеаз установлена в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника глупыша при инвазии *T. minor*. Эти различия в изменениях активности протеаз вдоль кишечника исследованных птиц можно объяснить тем, что показатели инвазии цестодами *T. minor* у глупышей, использованных при проведении предыдущего исследования, были значительно ниже аналогичных параметров у птиц, изученных в настоящей работе [5].

Корректное изучение влияния инвазии на активность протеолитических ферментов глупышей провести затруднительно из-за 100% заражения цестодами *T. minor*. Птиц, свободных от инвазии

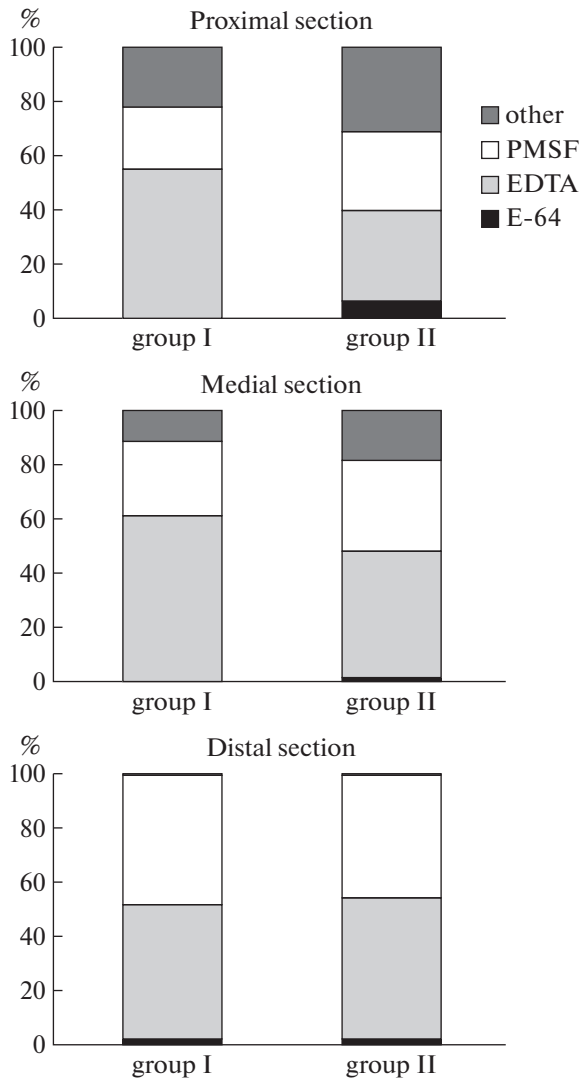


Рис. 3. Доля подклассов протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника (проксимального, медиального и дистального фрагментах) атлантического глупыша в зависимости от показателей заражения *Tetrabothrius minor*: группа I (ИИ 79–234 экз.) и группа II (ИИ 368–696 экз.). PMSF – сериновые протеазы, EDTA – металлопротеазы, E-64 – цистеиновые протеазы.

T. minor, обнаружено не было. В связи с этим всех исследованных глупышей разделили на 2 группы в зависимости от интенсивности инвазии (см. “Результаты”). Показано, что при высокой ИИ (368–696 экз.) снижалась активность протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника у глупышей из группы II по сравнению со значением протеолитической активности птиц из группы I.

Снижение активности протеолитических ферментов при цестодных инвазиях неоднократно отмечалось в работах, посвященных изучению влияния заражения ленточными червями на пищеварительную активность в кишечнике окончательных хозяев – рыб и морских птиц [7–9, 11–13, 18]. При

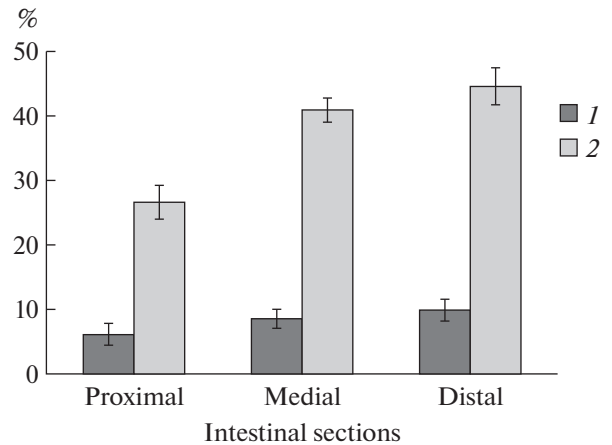


Рис. 4. Доля (%) ингибирования активности протеаз слизистой оболочки трех фрагментов тонкого кишечника атлантического глупыша гомогенатом ленточных червей 100 мкл *Tetrabothrius minor* (1) и 100 мкл PMSF (2).

заражении цестодами *T. erostris* отмечено снижение активности протеаз в местах локализации паразитов в тонком кишечнике морских птиц (взрослых моевок и их птенцов, взрослых серебристых чаек и их птенцов) [8, 11]. При заражении взрослых серебристых чаек крупной цестодой *Diphyllobothrium dendriticum* (место локализации – медиальный фрагмент) активность протеаз уменьшалась по всей длине кишечника [12]. Изменение протеолитической активности зарегистрировано авторами при изучении влияния заражения у рыб цестодами, использующих их в качестве окончательных хозяев [7, 9, 10, 18, 19]. При инвазии цестодами *Proteocephalus torulosus* у синца (*Ballerus ballerus*), *Caryophyllaeus laticeps* у леща (*Abramis brama*); *Eubothrium rugosum* у налима (*Lota lota*) уменьшались активности протеаз в слизистой кишечника. При этом показано снижение активности протеаз вдоль кишечника у налима и леща при заражении *E. rugosum* и *C. laticeps* соответственно [18, 19]. В то же время связь между распределением червей *C. laticeps* и активностью протеаз не обнаружена [18]. Установлено, что чем выше интенсивность инвазии *E. rugosum*, тем ниже активность протеаз в слизистой кишечника налима [19].

Наряду с этим показано, что, помимо снижения протеолитической активности в слизистой кишечника, при инвазии цестодами *T. minor* происходили изменения активности подклассов протеаз: уменьшение активности сериновых протеаз и металлопротеаз, а также повышение активности цистеиновых протеаз. Аналогичные результаты получены при изучении влияния инвазии *E. rugosum* и *P. torulosus* на активность подклассов протеаз из слизистой кишечника у налима и у синца соответственно [7, 9]. В местах паразитирования *C. laticeps* в слизистой кишечника у леща отмечены наиболее замет-

ные изменения по соотношению различных подклассов протеаз по сравнению с контролем [18].

Исследователи подчеркивали, что протеазы наиболее чувствительны к заражению ленточными червями, а для объяснения уменьшения активности ферментов гидролиза белков в слизистой кишечника хозяина выдвинули два предположения [7]. Первое заключается в том, что цестоды способны адсорбировать на своей поверхности ферменты хозяина. Характерной особенностью цестод заключается утрата этими животными пищеварительной системы [20]. Поглощение нутриентов через тегумент представляет собой единственный способ получения питательных веществ, необходимых для их активной жизнедеятельности. Но цестоды не только могут активно поглощать питательные вещества (аминокислоты, глюкозу и др.), но способны адсорбировать на своем тегументе ферменты хозяина [21]. Тегумент цестод содержит большое количество ферментов, что свидетельствует о его значительной роли в различных метаболических процессах. Эта группа паразитов обладает механизмом мембранного пищеварения и активного транспорта. Ранее установлено, что на тегументе *T. minor*, паразитирующих в тонком кишечнике атлантического глупыша, протекают процессы мембранного пищеварения с участием щелочных и кислых протеаз [5]. В связи с этим можно предположить, что снижение активности протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах тонкого кишечника глупыша объясняется этим фактом. Цестоды *T. minor* адсорбируют на своей поверхности протеазы глупыша, тем самым уменьшают активность протеаз хозяина в местах локализации.

Второе предположение сводится к тому, что снижение активности протеаз в слизистой кишечника в местах локализации *T. minor*, а также при увеличении интенсивности инвазии этими цестодами может быть связано со способностью червей ингибировать активность протеаз. По результатам настоящего исследования установлено, что цестоды *T. minor* инактивировали активность протеаз слизистой оболочки кишечника глупыша и коммерческого трипсина. При этом процент ингибирования активности цестодами *T. minor* невысок по сравнению с аналогичной способностью других видов червей [22]. Так, например, гомогенат ленточных червей *T. erostris* из кишечника серебристых чаек и моевок инактивировал трипсин на $79.0 \pm 2.1\%$, а гомогенат *T. minor* из кишечника глупышей — в среднем на $45.3 \pm 2.3\%$. Аналогичная тенденция прослеживалась и при ингибировании активности протеаз из слизистой кишечника птиц: гомогенат *T. erostris* ингибировал в среднем на $25.2 \pm 0.3\%$, гомогенат *T. minor* — на $8.1 \pm 0.8\%$. Низкая способность гомогената *T. minor* ингибировать активность протеаз из слизистой и активность трипсина могут быть связаны с тем, что система атлантический глупыш — *T. minor* обладает устойчивым равнове-

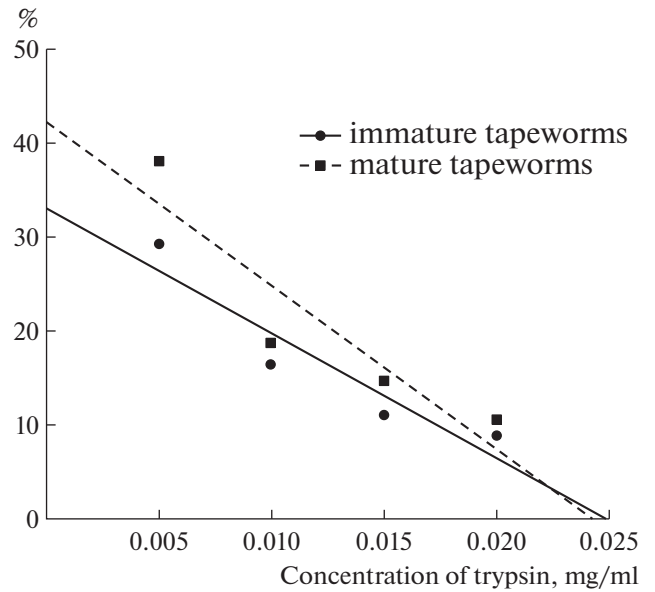


Рис. 5. Ингибирование активности трипсина в зависимости от его концентрации гомогенатами неполовозрелых (100 мкл) и половозрелых (100 мкл) червей *Tetrabothrius minor*.

сием. Во-первых, *T. minor* представляет собой специфического паразита атлантического глупыша, полностью доминирующего в его цестодофауне, и практически не встречается у других птиц из баренцевоморского региона [2]. Во-вторых, интенсивность инвазии глупышей этими ленточными червями, как правило, очень высока (до 1531 экз.) [2]. Соответственно, высокая интенсивность заражения, узкая специфичность к окончательному хозяину и отсутствие конкуренции со стороны других видов цестод могут определять невысокую ингибиторную активность гомогената *T. minor*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в местах локализации *T. minor* (проксимальных и медиальных фрагментах тонкого кишечника) протеолитическая активность снижена за счет уменьшения активности сериновых протеаз и металлопротеаз. Обнаружено, что чем выше интенсивность инвазии *T. minor*, тем ниже активность протеаз, в том числе металлопротеаз и сериновых протеаз. Отмечены способность гомогенатов *T. minor* ингибировать активность протеаз из слизистой оболочки глупыша и активность коммерческого трипсина разной концентрации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ММБИ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность научному сотруднику ММБИ РАН А.В. Ежову за помощь в сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белопольский ЛО (1957) Экология морских колониальных птиц Баренцева моря. М.; Л.: Изд-во РАН 460 с. [*Belopolyski LO* (1957) Ecology of marine colonial birds of the Barents Sea. M., L.: Publ. PAS. 460 p. (In Russ.)].
2. Kuklin VV, Kuklina MM, Ezov AV (2018) Helminths of the Barents Sea Northern Fulmar (*Fulmarus glacialis*, Procellariiformes, Procellariidae): Composition, Impact on Host, and Indicator Properties. *Biology Bulletin* 46: 804–813. <https://doi.org/10.1134/S1062359019080077>
3. Гаврило МВ, Тертицкий ГМ, Покровский ИВ, Головкин АН (1994) Орнитофауна архипелага. Среда обитания и экосистемы Земли Франца-Иосифа (Архипелаг и шельф). Апатиты: Изд. КНЦ РАН: 204–211. [*Gavrilov MV, Teritski GM, Pokrovski IV, Golovkin AN* (1994) Ornithofauna of the archipelago. Habitat and ecosystems of Franz Josef Land (Archipelago and shelf). Apatity: Publ. KSC RAS: 204–211. (In Russ.)].
4. Anker-Nilssen T, Bakken V, Strøm H, Golovkin AN, Bianki VV, Tatarinkova IP (2000) The status of marine birds breeding in the Barents Sea Region. Tromsø: Norsk Polarinstitut. 216 p. <https://doi.org/10.2307/1522196>
5. Куклина ММ (2015) Взаимоотношения в системе “атлантический глупыш *Fulmarus glacialis* – цестода *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae)”: физиологические аспекты. *Паразитология* 49: 433–443. [*Kuklina MM* (2015) Relationships in the “northern fulmar *Fulmarus glacialis* – *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae)” system: physiological aspects. *Parasitology* 49: 433–443. (In Russ.)].
6. Извекова ГИ, Куклина ММ (2014) Заражение цестодами и активность пищеварительных гидролаз позвоночных хозяев. *Успехи современной биологии* 134 (3): 304–315. [*Izvekova GI, Kuklina MM* (2014) Infection with cestodes and the activity of digestive hydrolases of vertebrate hosts. *Successes of modern biology* 134 (3): 304–315. (In Russ.)].
7. Фролова ТВ, Извекова ГИ (2018) Влияние заражения цестодой *Proteocephalus torulosus* Batsch, 1786 на активность ферментов в кишечнике синца (*Ballerus ballerus*). *Паразитология* 52: 292–303. [*Frolova TV, Izvekova GI* (2018) The influence of cestode infection with *Proteocephalus torulosus* Batsch, 1786 on the enzyme activity in the intestine of the zope (*Ballerus ballerus*). *Parasitology* 52: 292–303. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0031184718040042>
8. Kuklina MM, Kuklin VV (2018) Effect of Cestodal Infestation on the Distribution Pattern of Digestive Enzyme Activities along the Small Intestine of the Kittiwake (*Rissa tridactyla*). *J Evol Biochem Physiol* 54: 292–299. <https://doi.org/10.1134/S0022093018040051>
9. Izvekova GI, Solovyev MM (2016) Characteristics of the Effect of Cestodes Parasitizing the Fish Intestine on the Activity of the Host Proteinases. *Biol Bull* 43 (2): 146–151. <https://doi.org/10.1134/S1062359016010076>
10. Frolova TV, Izvekov EI, Solovyev MM, Izvekova GI (2019) Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). *Compar Biochem Mol Biol Part B* 235: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009>
11. Kuklina MM, Kuklin VV (2016a) *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda: Diphyllobothriidae) in the intestinal tract of the herring gull *Larus argentatus*: Localization and trophic parameters. *Biol Bull* 43: 329–334. <https://doi.org/10.1134/S1062359016040063>
12. Kuklina MM, Kuklin VV (2016b) The activities of digestive enzymes as a determinant factor in the localization of *Tetrabothrius erostris* (Loennberg) (Cestoda: Tetrabothriidae) in the intestine of the herring gull *Larus argentatus* Pontoppidan. *Inland Water Biol* 9: 189–195. <https://doi.org/10.1134/S1995082916010107>
13. Kuklina MM, Kuklin VV (2022) Activity of Digestive Enzymes in the Small Intestine of the Common and Thick-Billed Murres: Effect of Dietary Composition and Helminth Infection. *J Evol Biochem Physiol* 58: 1785–1794. <https://doi.org/10.31134/S0022093022060102>
14. Alarcón FJ, Martínez TF, Barranco P, Cabello T, Díaz M, Moyano FJ (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 32: 265–274. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00087-x](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00087-x)
15. Afik DL, Caviedes-Vidal E, Martínez del Rio C, Karasov WH (1995) Dietary modulation of intestinal hydrolytic enzymes in yellow-rumped warblers. *Am J Physiol* 269: 420–423. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.2.R413>
16. Caviedes-Vidal E, Afik D, Martínez del Rio C, Karasov WH (2000) Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Compar Biochem Physiol Part A* 125: 11–24. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00163-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00163-4)
17. Chediack JG, Furrer SC, Cid FD, Filippa V, Caviedes-Vidal E (2012) Effect of fasting on the structure and function of the gastrointestinal tract of house sparrows (*Passer domesticus*). *Compar Biochem Physiol Part A* 163: 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.189>
18. Izvekova GI, Solovyov MM, Izvekov EI (2011) Effect of *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae) upon Activity of Digestive Enzymes in Bream. *Biol Bull* 38: 50–56. <https://doi.org/10.1134/S1062359011010055>

19. *Izyekova GI* (2013) Activity of digestive enzymes in burbots *Lota lota* (Linnaeus) depending on their infestation with *Eubothrium rugosum* (Batch) (Cestoda, Pseudophyllidea). *Inland Water Biol* 6 (1): 57–61.
<https://doi.org/10.1134/S1995082913010069>
20. *Dalton JP, Skelly P, Halton DW* (2004) Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Can J Zool* 82: 211–232.
<https://doi.org/10.1139/z03-213>
21. *Izyekova GI, Frolova TV, Izyekov EI* (2017) Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda). *Helminthologia* 54 (1): 3–10.
<https://doi.org/10.1515/helm-2017-0001>
22. *Izyekova GI, Kuklina MM, Frolova TV* (2017) Inactivation of proteolytic enzymes by cestodes. *Dokl Biol Sci* 475: 161–164.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617040081>

PROTEASE ACTIVITY IN THE SMALL INTESTINE OF THE NORTHERN FULMAR *FULMARUS GLACIALIS* BY INFECTION OF *TETRABOTHRIUS MINOR* (CESTODA: TETRABOTHRIIDAE)

© 2023 г. М. М. Kuklina^{a, #} and V. V. Kuklin^a

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

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

The effect of infection of *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae) on the protease activity of the mucous membrane of the small intestine of the Northern Fulmar *Fulmarus glacialis* was studied. Aspects of changes in the activity of proteases and protease subclasses (metalloproteases, serine proteases and cysteine proteases) by infection of *T. minor*, and the ability of *T. minor* to inactivate proteases from the intestinal mucosa and commercial trypsin were evaluated. It has been established that in the localization of *T. minor* (proximal and medial sections of the small intestine) decreased protease activity due to a decrease in the activity of serine proteases and metalloproteases. The dependence of the decrease of protease activity in the mucous membrane of the small intestine of the host on the parameters of infection with cestodes was found – the higher the infection intensity of *T. minor*, the lower the activity of proteases, including metalloproteases and serine proteases. The ability of *T. minor* homogenates to inhibit the activity of proteases from the mucosa of Northern Fulmar and the activity of commercial trypsin of different concentrations was noted.

Keywords: *Tetrabothrius minor*, *Fulmarus glacialis*, protease activity, trypsin, serine proteases, inhibition

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ ГЕЛЬМИНТОВ КИШЕЧНИКА РЫБ: ИНГИБИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПРОТЕАЗАМ У ЦЕСТОД *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

© 2023 г. Т. В. Фролова^{1,*}, Г. И. Извекова¹

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок Ярославской обл., Россия

*e-mail: bianka28061981@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Исследована ингибирующая способность по отношению к протеазам экстрактов плероцеркоидов из печени окуня (*Perca fluviatilis* Linnaeus), а также экскреторно-секреторных продуктов и экстрактов незрелых и зрелых цестод *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781), из кишечника щуки (*Esox lucius* Linnaeus). Установлено, что ингибирующей способностью по отношению к протеазам в различной степени обладают экскреторно-секреторные продукты и экстракты как незрелых, так и зрелых цестод *T. nodulosus*. Достоверное снижение активности отмечено при действии исследуемых образцов на активность коммерческого трипсина. Большой ингибирующей способностью по сравнению с экскреторно-секреторными продуктами обладают экстракты червей. При этом экстракт незрелых червей ингибирует активность протеаз сильнее, чем таковой зрелых. В большей степени ингибирующая способность связана с экстрактом червей, лишенных щеточной каймы, чем с фракцией щеточной каймы тегумента.

Ключевые слова: рыбы, цестоды, протеолитическая активность

DOI: 10.31857/S0044452923050042, **EDN:** KNSOTT

ВВЕДЕНИЕ

Ленточные черви (Cestoda) – плоские черви (Neodermata) обитают в организме различных позвоночных, при этом около 1000 видов паразитируют на пластиножаберных и почти 500 встречаются у взрослых костистых рыб. Они паразитируют в рыбах, как во взрослом состоянии, так и на личиночных стадиях, но лишь немногие взрослые ленточные черви действительно патогенны для рыб-хозяев [1].

Ленточные черви рода *Triaenophorus* – широко распространенные паразиты пресноводных рыб. Они отличаются сложным циклом развития, который протекает со сменой окончательного и двух промежуточных хозяев, обитающих в водной среде. Развитие процеркоидов происходит в полости тела первых промежуточных хозяев – веслоногих рачков отряда Copepoda. *Triaenophorus nodulosus* имеет широкий круг вторых промежуточных хозяев и встречается в рыбах, относящихся к 17 семействам [2]. Плероцеркоиды в большинстве случаев локализируются в печени. Некоторые виды *Triaenophorus* представляют серьезную опасность для рыб, в ряде случаев вызывая на стадии плероцеркоида массовые заболевания и даже гибель ценных промысловых рыб, главным образом в прудовых хозяйствах [1, 2]. В Рыбинском водохранилище, как и во многих других водоемах, основным вторым промежуточным хозяином *T. nodulosus* служит окунь

Perca fluviatilis, в печени которого развивается плероцеркоид. Окончательный хозяин *T. nodulosus* – щука *Esox lucius*, в ее кишечнике паразит завершает свое развитие. Полизоичные черви, попадающие в окончательного хозяина, быстро растут и развиваются. Сколекс и шейка цестод содержат ткани, из которых формируются новые проглоттиды, более молодые проглоттиды находятся в переднем отделе, в более старых происходит органогенез и в заднем отделе наступает половое созревание. Полностью созревшая стробила представляет собой возрастной градиент от молодых тканей в отделе шейки до стареющих тканей задних зрелых проглоттид [3].

Взаимодействие паразит-хозяин происходит посредством различных физиологически активных веществ, продуцируемых обоими партнерами. Способности гельминтов проникать, мигрировать и выживать внутри хозяина способствует ряд их экскреторных/секреторных белков [4]. Один из основных компонентов секреторных продуктов паразита – ингибиторы сериновых протеаз [5]. Они играют важную роль в выживании паразита за счет способности ингибировать ферменты хозяина и в норме присутствуют в микроокружении и/или секретируются иммунными эффекторными клетками [6]. Эти ингибиторы регулируют активность протеаз и контролируют различные процессы, связанные с их активностью, в том числе защиту от

пищеварительных ферментов хозяина [6, 7]. По данным некоторых авторов белки — наиболее важная группа иммунорегуляторных веществ паразитов, к которым, в числе прочих, относятся и ингибиторы протеаз [8].

Ранее нами установлено, что зрелые черви *T. nodulosus* в кишечнике окончательного хозяина — щуки способны ингибировать протеолитические ферменты [9, 10]. Среда инкубации, в состав которой входят экскреторно-секреторные продукты цестод, и экстракт зрелых *T. nodulosus* большее влияние оказывают на активность трипсина по сравнению с протеолитической активностью слизистой оболочки кишечника хозяина [9].

В связи с этим целью настоящего исследования было попытаться выяснить, какие стадии зрелости червя *T. nodulosus* обладают способностью ингибировать протеазы, а также определить способность ингибировать протеолитическую активность фракциями щеточной каймы тегумента и экстракта червя, лишённого щеточной каймы тегумента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление препаратов

Объектом исследований служили взрослые цестоды *Triaenophorus nodulosus*, обитающие в кишечнике щуки *Esox lucius* и плероцеркоиды из печени промежуточного хозяина — окуня *Perca fluviatilis* — из Рыбинского водохранилища. Для исследований отобрано 32 щуки длиной 38–65.5 см; 58 зараженных плероцеркоидами окуней длиной 16–24 см. Вскрытие извлеченных из щук кишечника и печени окуня, а также дальнейшее приготовление препаратов осуществляли на ледяной бане. Число червей в одной щуке колебалось от 1 до 20 экз.; плероцеркоидов в печени окуня, как правило, — по одному экземпляру. Взрослые черви различались по стадии зрелости и условно были разделены на “незрелых” и “зрелых”, содержащих гравидные проглотиды. Извлеченных из печени плероцеркоидов и из кишечника хозяина взрослых цестод 3 раза тщательно промывали в растворе Рингера для холоднокровных животных, рН 7.5 (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10% CaCl₂; 0.54 г Na₂HPO₄; 0.02 г KН₂РО₄; 0.16 г MgSO₄ в 1 л дистиллированной воды) с целью удаления ферментов хозяина, адсорбированных на их поверхности. Масса плероцеркоидов, использованных в качестве одной пробы, колебалась от 0.27 до 0.64 г. Масса “незрелых” червей, использованных в качестве одной пробы, колебалась от 0.27 до 0.68 г, “зрелых” — от 0.4 до 1.67 г. Пять проб “зрелых” червей были использованы в опытах по разрушению щеточной каймы тегумента, методика которой описана ниже. Остальные шесть проб “незрелых” и “зрелых” червей инкубировали в 2 мл раствора Рингера каждую в течение 24 ч. Все инкубации проводили при температуре 7°C с целью получения секреторных/экскреторных

продуктов цестод. В течение всего времени инкубации черви оставались живыми. Извлеченных и отмытых плероцеркоидов и взрослых червей после инкубации гомогенизировали с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax T 10 basic (IKA, Германия) и гомогенат разводили раствором Рингера в соотношении масса: объем 1: 4. Гомогенаты центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин при 4°C, для дальнейших исследований использовали супернатант (экстракт червей). Среды инкубации и экстракты замораживали и хранили при –20°C. Таким образом, для дальнейших исследований было получено 5 проб экстрактов плероцеркоидов, по 6 проб сред инкубации и экстрактов “незрелых” и по 10 проб сред инкубации и экстрактов “зрелых” червей.

Для приготовления гомогената слизистой оболочки кишечника щук его вскрывали, удаляли хитин и скребком снимали слизистую оболочку, которую гомогенизировали и разводили раствором Рингера в соотношении масса : объем 1: 19. Гомогенаты центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин при 4°C.

Разрушение щеточной каймы тегумента

Для разрушения щеточной каймы тегумента был модифицирован метод дифференциального центрифугирования, предложенный для ее отделения у цестод *Hymenolepis diminuta* [11]. Каждую из 5 групп червей *T. nodulosus*, извлеченных из кишечника щук и трижды отмытых в растворе Рингера, помещали в 0.2% раствор Тритон X-100 в 0.2 М трис-HCl буфере, рН 7.4 в соотношении масса : объем 1 : 9 и инкубировали при 4°C в течение 10 мин. Затем пробирки встряхивали с помощью вортекса (V-1 plus, BioSan) в течение 60 сек. Червей извлекали из раствора детергента, который в дальнейшем использовали для получения фракции щеточной каймы тегумента. Для этого раствор детергента центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин, супернатант еще раз центрифугировали при 20000 g в течение 90 мин, осадок для дальнейших исследований не использовали. Центрифугирование проводили при 4°C. Кроме того, из червей, лишённых щеточной каймы тегумента, готовили экстракт в соотношении масса : объем 1 : 9, как описано выше. Таким образом, для дальнейших исследований получали две фракции: (1) щеточная кайма тегумента (5 проб) и (2) тело червя, лишённого щеточной каймы (5 проб).

Определение количества белка

В среде инкубации цестод, экстрактах червей и гомогенатах слизистой оболочки кишечника определяли концентрацию белка методом Бредфорда [12] при 595 нм на спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Германия). Для постро-

ния калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (ПанЭко).

Определение активности ферментов

Суммарную активность протеиназ в гомогенате слизистой оболочки кишечника рыб (активность трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.18) и активность коммерческого трипсина (MP Biomedicals, USA) определяли с использованием в качестве субстрата 0.3%-ного раствора азо-казеина в трис-НСI буфере, рН 7.5 [13, 14]. Субстрат и ферментативно активный препарат инкубировали 60 мин при 20–22°C. Реакцию останавливали добавлением 0.3 М раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), образовавшийся осадок из негидролизованного белка удаляли центрифугированием при 7500 g в течение 5 мин. Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального активности ферментов, измеряли в супернатанте при 425 нм. Активность протеаз рассчитывали как разность показаний спектрофотометра для пробы с субстратом и холостой пробы для минутного интервала на г влажной массы (для общей протеолитической активности) или мг белка (для специфической активности).

Активность трипсина (КФ 3.4.21.4) определяли в течение 10 мин при 22°C, при 407 нм с использованием BAPNA (N- α -бензоил-dl-аргинин p-нитроанилид, PanReas-AppliChem) в качестве субстрата (0.1 mM раствор в DMSO – диметилсульфоксид) в 100 mM трис-НСI буфере с добавлением 150 mM NaCl и 20 mM CaCl₂, рН 8.0. За единицу активности трипсина принимали 1 мкмоль субстрата, гидролизованного за 1 мин в 1 мл образца при 407 нм и температуре 20–22°C [15]. Активность химотрипсина (КФ 3.4.21.1) определяли в течение 10 мин при 22°C, при 256 нм с использованием BTEE (бензоил-тирозин-этил-эстер, Sigma-Aldrich) в качестве субстрата (1 mM раствор в 50%-ном метаноле) в 80 mM трис-НСI буфере с добавлением 100 mM CaCl₂, рН 7.8. За единицу активности химотрипсина принимали 1 мкмоль субстрата, гидролизованного за 1 мин в 1 мл образца при 256 нм и температуре 20–22°C [16].

Определение ингибирующей способности препаратов *T. nodulosus*

В качестве источника ингибиторов протеолитической активности использовали среду инкубации, экстракт гельминтов и фракции, полученные при разрушении щеточной каймы тегумента. Для определения ингибиторной способности в опытную среду, содержащую 100 мкл гомогената слизистой оболочки кишечника шуки или 100 мкл раствора трипсина, добавляли 10 мкл инкубационной среды или экстракта червей и инкубировали в течение 15 мин при температуре 20–22°C. Одновременно в соответствующую контрольную пробу добавляли

аналогичный объем буфера. После этой инкубации в пробах определяли протеолитическую активность как описано выше. Для этой серии опытов использовали коммерческий препарат бычьего трипсина (HiMedia) в концентрации 0.1 мг/мл.

Расчеты ферментативной активности проведены двумя способами: на г влажной массы слизистой оболочки кишечника (общая ферментативная активность) и на мг белка (специфическая активность), содержащегося в г влажной массы слизистой оболочки кишечника или в мл раствора коммерческого препарата трипсина.

Все биохимические измерения проводили в трех повторностях.

Статистическая обработка

Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Обработка результатов выполнена с помощью статистических пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Ингибиторный эффект оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки для множественного сравнения средних значений при $p < 0.05$.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (Протокол № 7 от 10 марта 2022 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние различных стадий зрелости цестод на активность протеолитических ферментов

Ингибирующую способность процеркоидов в связи с их микроскопическими размерами доступными физиологическими методами не было возможности исследовать. Поэтому наши усилия были сосредоточены на изучении способности плероцеркоидов и различных стадий зрелости взрослых цестод *T. nodulosus* влиять на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяина и коммерческий препарат трипсина. Показано, что на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника шуки исследованные препараты *T. nodulosus* достоверного влияния не оказывают, $p > 0.05$, хотя и отмечается тенденция снижения этой активности (рис. 1).

Однако при исследовании влияния этих препаратов на активность коммерческого трипсина (при попарном сравнении с контрольным значением) отмечено статистически значимое снижение его активности под действием всех использованных препаратов, кроме экстракта плероцеркоидов, $p <$

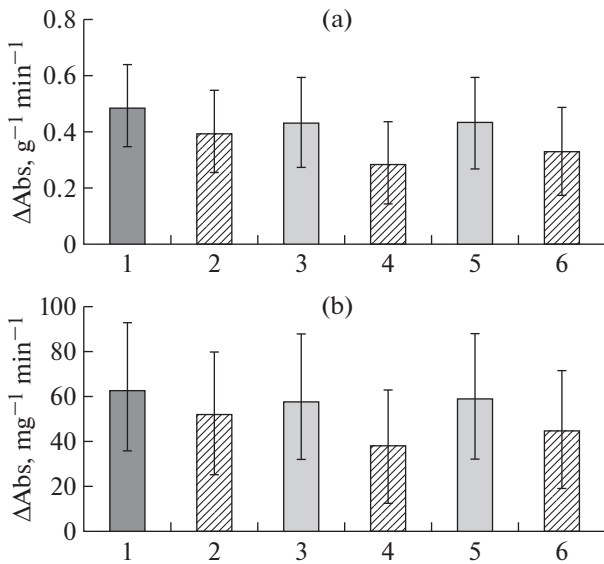


Рис. 1. Влияние экскреторно-секреторных продуктов и экстрактов цестод *T. nodulosus* различных стадий зрелости на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника щуки. На (а): общая активность $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{min}^{-1}$; на (б): специфическая активность, $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. По горизонтали: 1 – контроль, 2 – экстракт плероцеркоидов, 3 – среда инкубации незрелых червей, 4 – экстракт незрелых червей, 5 – среда инкубации зрелых червей, 6 – экстракт зрелых червей. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка.

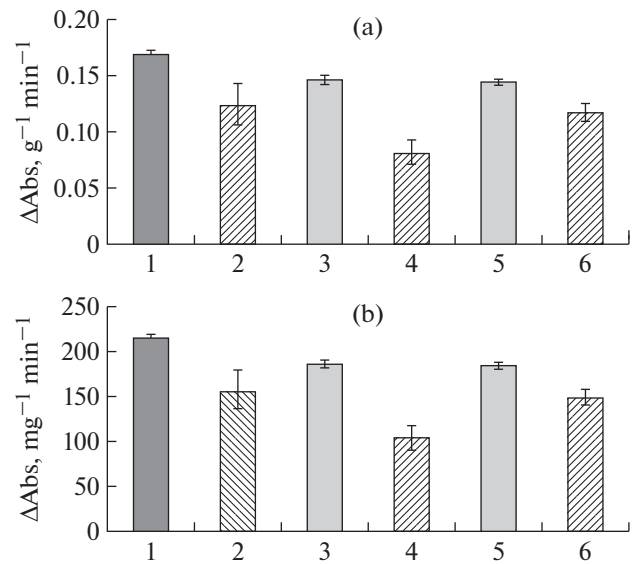


Рис. 2. Влияние экскреторно-секреторных продуктов и экстрактов цестод *T. nodulosus* различных стадий зрелости на общую и специфическую активность трипсина. На (а): общая активность $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{min}^{-1}$; на (б): специфическая активность, $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. По горизонтали: 1 – контроль, 2 – экстракт плероцеркоидов, 3 – среда инкубации незрелых червей, 4 – экстракт незрелых червей, 5 – среда инкубации зрелых червей, 6 – экстракт зрелых червей. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка.

< 0.05 (рис. 2). Следует отметить, что влияние экстрактов незрелых червей было достоверно больше по сравнению с другими исследованными препаратами ($p < 0.05$). При этом активность трипсина уменьшается от 12.7 ± 1.5 до $52.2 \pm 5.5\%$ в зависимости от исследованного препарата. Зависимость сохраняется как при расчете общей, так и при расчете специфической активности. При этом наиболее сильное ингибирующее действие на активность трипсина оказывает экстракт незрелых червей ($52.2 \pm 5.5\%$). Экстракты оказывают большее ингибирующее влияние на активность трипсина (на $26.5 \pm 1.3\%$ для экстракта плероцеркоида и на $52.2 \pm 5.5\%$ для экстракта незрелого червя), чем среды инкубации червей (на $13.5 \pm 2.7\%$ для среды инкубации незрелого червя и на $12.7 \pm 1.5\%$ для такой зрелого).

Влияние фракций щеточной каймы тегумента и экстракта тела червей, лишенных щеточной каймы, на активность протеолитических ферментов

Мы предприняли попытку определить, щеточная кайма тегумента или тело червя, лишенное щеточной каймы, в большей степени обладают ингибирующей способностью по отношению к протеиназам. С этой целью щеточная кайма тегумента была разрушена, как описано в разделе “Методы исследования”. Способность ингибировать протеиназы была исследована у фракции щеточной каймы и у экстракта тела чер-

вя, лишенного щеточной каймы. Несмотря на тенденцию снижения протеолитической активности слизистой оболочки кишечника щуки под действием фракции червя, лишенного щеточной каймы тегумента, достоверного влияния исследованных фракций на общую и специфическую протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяина – щуки не обнаружено $p > 0.05$ (рис. 3).

Кроме того, было исследовано действие полученных фракций червей на активность трипсина и химотрипсина, функционирующих в слизистой оболочке кишечника щуки с использованием специфических для этих ферментов субстратов (рис. 4). Обнаружено, что фракция червя, лишенного щеточной каймы тегумента, достоверно снижала активность трипсина и химотрипсина в слизистой оболочке кишечника щуки (рис. 4).

Также при действии на раствор коммерческого трипсина обе исследованные фракции достоверно снижали его активность $p < 0.05$ (рис. 5). При этом активность трипсина под влиянием фракции червя, лишенного щеточной каймы, снижалась на $58.4 \pm 4.9\%$, а под влиянием фракции щеточной каймы тегумента – на $17.8 \pm 2.6\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку ранее мы установили, что взрослые черви в кишечнике окончательного хозяина способны ингибировать протеолитические ферменты

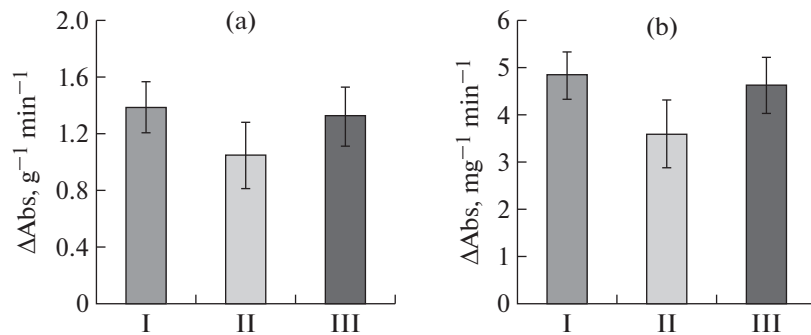


Рис. 3. Влияние различных фракций цестод *T. nodulosus* на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника щуки. На (а): общая активность $\Delta\text{Abs} \text{ г}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; на (б): специфическая активность, $\Delta\text{Abs} \text{ мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. По горизонтали: I – контроль, II – экстракт червя, лишённого щеточной каймы тегумента, III – фракция щеточной каймы тегумента. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка.

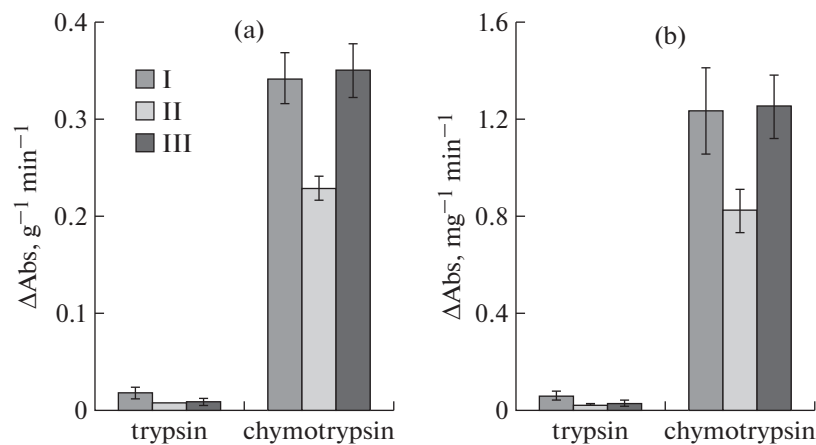


Рис. 4. Влияние различных фракций цестод *T. nodulosus* на активность трипсина и химотрипсина слизистой оболочки кишечника щуки. На (а): общая активность $\Delta\text{Abs} \text{ г}^{-1} \text{ мин}^{-1}$; на (б): специфическая активность, $\Delta\text{Abs} \text{ мг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. I – контроль, II – экстракт червя, лишённого щеточной каймы тегумента, III – фракция щеточной каймы тегумента. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка.

[9, 10], встал вопрос о том, на какой стадии развития или зрелости червя у него проявляется эта способность. Стоит отметить, что ингибиторы сериновых протеаз – один из ключевых компонентов среди секреторных продуктов многих видов паразитов [17]. Они играют важную роль в выживании паразита за счет способности ингибировать ферменты хозяина и в норме присутствуют в микроокружении и/или секретируются иммунными эффекторными клетками [6]. Эти ингибиторы регулируют активность протеаз и контролируют разнообразные процессы, связанные с их активностью, в том числе они играют существенную роль в защите паразита от пищеварительных ферментов хозяина.

Не обнаружено достоверного влияния на протеолитическую активность экстрактов плероцеркоидов. Возможно, это связано с наличием у них капсулы, которая должна защищать червей от влияния хозяина. Плероцеркоиды локализуются в печени, где происходит инкапсуляция паразита путем разрастания соединительной ткани вокруг него. Образование капсулы – защитная реакция

хозяина на внедрение паразита. Плероцеркоиды в печени окуня могут жить не более двух лет. Отмечен разный уровень взаимной адаптации плероцеркоидов с хозяином в различных популяциях окуня, что определяется типом циркуляции гельминта в конкретных экосистемах [18]. Благодаря высокой активности стенок капсулы, образующейся вокруг паразита в печени хозяина, и обилию капилляров она играет роль полупроницаемой оболочки, которая, с одной стороны, обеспечивает благоприятные условия для питания, роста и развития паразита, с другой – надежно защищает от его воздействия ткани хозяина [2].

В то же время заражение плероцеркоидами влияет на жизнедеятельность хозяина – окуня. Так, показано, что у зараженных плероцеркоидами *T. nodulosus* сеголетков окуня активность протеолитических и гликолитических ферментов ниже, чем у незараженных, причем в переднем отделе кишечника активность пищеварительных гидролаз снижается особенно заметно. Снижение активности гидролаз может быть связано с нарушениями в функциониро-

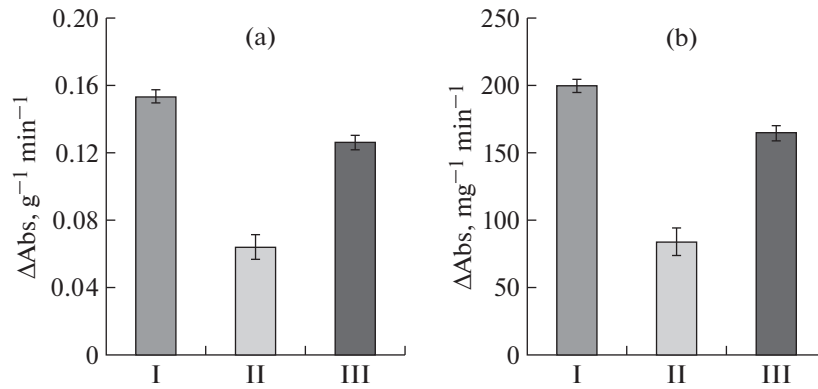


Рис. 5. Влияние различных фракций цестод *T. nodulosus* на активность коммерческого трипсина. На (а): общая активность $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{ min}^{-1}$; на (б): специфическая активность, $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. По горизонтали: I – контроль, II – экстракт червя, лишённого щеточной каймы тегумента, III – фракция щеточной каймы тегумента. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка.

вании гепатопанкреаса у зараженных рыб и, как следствие, снижением синтеза и поступления зимогенов протеолитических ферментов и амилазы в кишечник [19]. Установлено, что заражение окуней старших возрастных групп плероцеркоидами *T. nodulosus* снижает активность ферментов, обеспечивающих начальные этапы ассимиляции белковых компонентов пищи у рыб. Показано снижение доли сериновых и металлопротеаз, а также значительное увеличение доли неидентифицированных протеаз в кишечнике зараженных рыб [20].

В настоящем исследовании установлено, что как незрелые, так и зрелые цестоды *T. nodulosus* обладают способностью ингибировать основной протеолитический фермент – трипсин. Большее влияние на активность трипсина экстракта незрелых червей по сравнению с таковым зрелых гельминтов может объясняться тем фактом, что первым для продолжения жизненного цикла предстоит дольше находиться в агрессивной среде хозяина – кишечнике. Зрелые черви готовы к дестробилизации и выходу яиц, возможно по этой причине способность их экстрактов ингибировать протеазы ниже, чем у незрелых червей. Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с ранее установленным большим влиянием среды инкубации и экстракта зрелых *T. nodulosus* на активность трипсина по сравнению с протеолитической активностью слизистой оболочки кишечника хозяина [9]. Кроме того, установлено, что добавление экстрактов цестод *T. nodulosus* приводит к немедленному достоверному снижению активности раствора коммерческого препарата трипсина. Чем больше концентрация экстракта червей, тем больший эффект ингибирования он оказывает на активность трипсина. Наличие ингибиторов протеаз необходимо обитающим в кишечнике цестодам для защиты от постоянного воздействия протеолитических ферментов хозяина. Стоит отметить, что в транскриптом *T. nodulosus* были обнаружены различные молекулярные шапероны, протеолити-

ческие ферменты, ингибиторы протеаз (ингибиторы Кунитц-подобных протеаз, ингибиторы сериновых протеаз и серпинов) и антиоксидантных ферментов [21], что согласуется с полученными нами данными. Сравнение белкового состава плероцеркоидов и взрослых паразитов *T. crassus* и *T. nodulosus* показало значительное сходство протеомной организации *Triaenophorus* sp. во вторых промежуточных и конечных хозяевах [22], что также согласуется с полученными нами данными.

Кроме того, в экстрактах *T. nodulosus* выявлено два новых белка типа Кунитца, потенциально ответственных за ингибирующую способность ленточных червей по отношению к трипсину, что расширило список цестод, использующих белки типа Кунитца во взаимодействиях с хозяином [10]. Известно, что ингибиторы протеаз, в том числе семейство Кунитца, участвуют в процессах коагуляции, фибринолиза и воспалительного процесса и включают ингибиторы цистеиновой и аспартил-протеаз [23]. По мнению этих авторов, ингибиторы протеазы типа Кунитца – единственные эндогенные ингибиторы воспалительного каскада. Благодаря этому ингибиторы протеаз паразитов способны действовать, регулируя различные физиологические механизмы хозяина. Эти ингибиторы вносят большой вклад в изучение воспалительных патологий. Инфекции ленточных червей влияют на иммунную систему хозяина на нескольких уровнях, и регуляторные эффекты паразита и его выделений могут не ограничиваться местами заражения. По этой причине возможность того, что специфические молекулы гельминтов обладают мощным модулирующим эффектом, может стать важным ресурсом для разработки будущих иммунотерапевтических средств для контроля воспалительных заболеваний [23].

Разрушение щеточной каймы тегумента при использовании описанного метода доказано для различных видов цестод [12, 24, 25]. В отличие от ингибирующей способности цестод *Eubothrium rugosum*, паразитирующих в кишечнике налима,

которая связана исключительно со щеточной каймой тегумента [24], аналогичная способность у *T. nodulosus* обнаружена как во фракции щеточной каймы, так и во фракции тела червя, лишённого щеточной каймы. То есть полученные нами данные свидетельствуют о различной локализации белков, ответственных за ингибирующую способность, у этих двух видов цестод.

Знание биохимии гельминтов позволяет выявить различные ферменты или метаболические пути, которые могут стать как мишенями для новых терапевтических средств, так и молекулярными маркерами для использования в диагностике [26]. Накопление сведений о спектре белков у различных гельминтов на разных стадиях развития показывает разнообразие этих белков [8, 27]. В экскреторно-секреторных продуктах метацисты *Taenia solium* обнаружено 76 белков [28]. Victor и соавт. предположили, что факт обнаружения у этих червей белков, участвующих в выживании паразитов, и описанных для других гельминтов, указывает на то, что экскреторно-секреторный протеом может не сильно различаться между видами или даже родственными родами. Кроме того, в числе обнаруженных белков отмечены белки, обладающие как эндопептидазной, так и ингибиторной по отношению к эндопептидазам активностями [28]. Накопленные к настоящему времени сведения свидетельствуют о необходимости расширения исследований в этом направлении, как за счет увеличения количества видов червей, так и за счет более глубокого изучения каждого из них. Возможно, это позволит найти общие закономерности или, наоборот, уникальность приспособлений каждого вида паразита к существованию в организме хозяина.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ингибирующей способностью по отношению к протеазам в различной степени обладают среды инкубации, т.е. экскреторно-секреторные продукты, и экстракты как незрелых, так и зрелых цестод *T. nodulosus*. Достоверное снижение активности отмечено при действии исследуемых образцов на активность коммерческого трипсина. Большей ингибирующей способностью обладает экстракт червей, при этом экстракт незрелых червей ингибирует активность протеаз сильнее, чем экстракт зрелых. При разрушении щеточной каймы тегумента показано, что ингибирующая способность в большей степени связана с фракцией экстракта червей, лишённых щеточной каймы, чем со щеточной каймой тегумента.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00248).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна работы (Т.В.Ф., Г.И.И.). Получение, анализ и интерпретация данных (Т.В.Ф., Г.И.И.). Участие в написании и редактировании статьи (Т.В.Ф., Г.И.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scholz T, Kuchta R, Oros M (2021) Tapeworms as pathogens of fish: A review. *J Fish Diseases*. 44: 1883–1900. <https://doi.org/10.1111/jfd.13526>
2. Kuperman BI (1981) Tapeworms of the genus *Triaenophorus*, parasites of fishes. New Delhi: Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd.
3. Pappas PW, Narcisi EM, Rentko V (1983) Alteration in brush border membrane proteins and membrane-bound enzymes of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* during development in the definitive host. *Mol Bioch Parasitol* 8: 317–323.
4. Cwiklinski K, Dalton JP (2018) Advances in *Fasciola hepatica* research using ‘omics’ technologies. *Int J Parasitol* 48: 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.001>
5. Zhang Y, Guo J, He L, Zong H-Y, Cai G-B (2018) Isolation and characterization of a novel serine protease inhibitor, SjSPI, from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 67:415–424. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.04.002>
6. Zang X, Maizels RM (2001) Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *TRENDS Biochem Sci* 26: 191–197.
7. Morris SR, Sakanari JA (1994) Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J Biol Chem* 269: 27650–27656.
8. Kutyrev IA, Mazur OE, Goreva OB, Mordvinov VA (2020) A study of protein fractional composition during incubation of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda) plerocercoids in a medium containing blood serum of the host, the baikal omul *Coregonus migratorius* (Coregonidae). *Biol Bull* 47: 490–496. <https://doi.org/10.1134/S1062359020040081>
9. Izvekova GI, Frolova TV, Izvekov EI (2017) Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda). *Helminthologia* 54: 3–10. <https://doi.org/10.1515/helm-2017-0001>
10. Rogozhin E, Solovyev M, Frolova T, Izvekova G (2019) Isolation and partial structural characterization of new Kunitz-type trypsin inhibitors from the pike cestode *Triaenophorus nodulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 233: 111217. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111217>
11. Oaks J, Knowles W, Cain G (1977) A simple method of obtaining an enriched fraction of tegumental brush border from *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* 63: 476–485.
12. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem* 72: 248–254.
13. Alarcón, FJ, Martínez TF, Barranco P, Cabello T, Díaz M, Moyano FJ (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 32: 265–274.
 14. Nolasco-Soria H (2021) Improving and standardizing protocols for alkaline protease quantification in fish. *Rev Aquacult* 13: 43–65. <https://doi.org/10.1111/raq.12463>
 15. Holm H, Hanssen LE, Krogdahl A, Florholmen J (1988) High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin. *J Nutrit* 118: 515–520.
 16. Worthington Biochemical Corporation, 1991. *Worthington Enzyme Manual: Enzymes, Enzyme Reagents*. Freehold, N.J.
 17. Zimic MJ, Infantes J, López C, Velásquez J, Farfán M, Pajuelo M, Sheen P, Verastegui M, Gonzalez A, García HH, Gilman RH (2007) Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *J Parasitol* 93: 727–734.
 18. Пронина СВ, Пронин НМ (1988) Взаимоотношения в системах гельминты–рыбы. М. Наука. [Pronina SV, Pronin NM (1988) Relationships in helminth–fish systems. М. Наука (In Russ)].
 19. Izvekova GI, Tyutin AV (2014) Activity of digestive enzymes and distribution of the trematode *Bunodera luciopercae* (Muller) in the intestine of juvenile perch infected with plerocercoids of *Triaenophorus nodulosus* (Pallas). *Inland Water Biol* 7:167–171. <https://doi.org/10.1134/S1995082914010076>
 20. Frolova TF, Parshukov AN, Izvekova GI (2018) Activity of digestive enzymes in perch infected with *Triaenophorus nodulosus* (Pallas) plerocercoids. *Inland Water Biol* 11:501–506. <https://doi.org/10.1134/S1995082918040053>
 21. Kochneva A, Drozdova P, Borvinskaya E (2020). The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda: Bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish. *Marine Genomics* 51: 100702. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100702>
 22. Borvinskaya E, Kochneva A, Bedulina D, Sukhovskaya I, Smirnov L, Babkina I (2021) Comparative Analysis of Proteins of Functionally Different Body Parts of the Fish Parasites *Triaenophorus nodulosus* and *Triaenophorus crassus*. *Acta Parasitol* 66: 1137–1150. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00384-6>
 23. de Magalhaes MTQ, Mambelli FS, Santos BPO, Morais SB, Oliveira SC (2018) Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microb Infect* 20: 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.003>
 24. Izvekova GI, Frolova TV, Izvekov EI, Kashinskaya EN, Solovyev MM (2021) Localization of the proteinase inhibitor activity in the fish cestode *Eubothrium rugosum*. *J Fish Dis* 44: 1951–1958. <https://doi.org/10.1111/jfd.13508>
 25. Kashinskaya EN, Simonov EP, Poddubnaya LG, Vlasenko PG, Shokurova AV, Parshukov AN, Andree KB, Solovyev MM (2023) Trophic diversification and parasitic invasion as ecological niche modulators for gut microbiota of whitefish. *Front Microbiol* 14: 1090899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1090899>
 26. Lombardo JF, Pórfido JL, Sisti MS, Giorello AN, Rodríguez S, Córscico B, Franchini GR (2022) Function of lipid binding proteins of parasitic helminths: still a long road. *Parasitol Res* 121: 1117–1129. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07463-1>
 27. Xu J, Wu L, Sun Y, Wei Y, Zheng L, Zhang J, Pang Z, Yang Y, Lu Y (2020) Proteomics and bioinformatics analysis of *Fasciola hepatica* somatic proteome in different growth phases. *Parasitol Res* 119: 2837–2850. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06833-x>
 28. Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, Deelder AM, Palmblad M (2012) Proteomic analysis of *Taenia solium* metacystode excretion-secretion proteins. *Proteomics* 11: 1860–1869.

METABOLIC ADAPTATION OF FISH INTESTINAL HELMINTHS: INHIBITORY ABILITY TOWARDS PROTEASES IN CESTODES *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

T. V. Frolova^{a, #}, and G. I. Izvekova^a

^a*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Yaroslavl Region, Borok, Russia*

[#]*e-mail: bianka28061981@gmail.com*

The inhibitory ability towards proteases was studied in the extracts of plerocercoids from the liver of perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus), as well as in the excretory-secretory products and extracts of mature and immature cestodes *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) from the intestine of pike (*Esox lucius* Linnaeus). It was found that excretory-secretory products and extracts of both mature and immature *T. nodulosus* display varying degrees of inhibitory ability against proteases. A significant decrease in activity was noted under the action of the studied samples on the activity of commercial trypsin. Tapeworm extracts exhibit a greater inhibitory ability compared to excretory-secretory products. At the same time, the extract of immature worms inhibits the activity of proteases more strongly than that of mature ones. The inhibitory ability is more closely associated with the extract of worms lacking the brush border than with the tegumental brush border fraction.

Keywords: fish, cestodes, proteolytic activity

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ СУБЭПИКАРДА СЕРДЦА КРЫСЫ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

© 2023 г. А. В. Степанов^{1,*}, М. Г. Добрецов¹, Е. В. Новикова¹, Ю. А. Филиппов¹,
А. А. Панов¹, И. В. Кубасов¹

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

*e-mail: botanik2407@gmail.com

Поступила в редакцию 21.04.2023 г.

После доработки 11.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Известно, что ряд системных сердечных заболеваний различной этиологии (хроническая ишемия, аортальный стеноз, гипертензия, диабетическая кардиомиопатия, реперфузионное повреждение после ишемии и др.), ведущих к развитию сердечной недостаточности, сопровождается выраженной реорганизацией Т-системы кардиомиоцитов как у человека, так и у животных. Однако изменения в электрогенезе клеточной мембраны Т-системы кардиомиоцитов при этих заболеваниях практически не изучены. Целью работы было выяснить динамику изменений электрогенеза различных отделов мембраны кардиомиоцитов субэпикарда на разных сроках после ишемии-реперфузии (ИР) левого желудочка (ЛЖ) у крыс с использованием метода внеклеточной регистрации и оценить морфологические изменения Т-системы с использованием конфокальной микроскопии. Исследование проводили через один день, две и четыре недели после ИР. Было установлено, что сразу после ИР наблюдается изменение внеклеточно регистрируемых потенциалов действия первого типа (вПД1, характеризующиеся одним негативным пиком), регистрируемых в зоне мембраны кардиомиоцитов субэпикарда, свободной от входов в *t*-трубочки. Начиная с 24 часов, вплоть до четырех недель после ИР происходило увеличение длительности времени спада (T_{90}) и частоты встречаемости фазы следовой гиперполяризации вПД1, достигающих максимальных значений к четырем неделям после ИР. Помимо этого, в течение четырех недель после ИР отмечается выраженное снижение амплитуды второго пика внеклеточно регистрируемых потенциалов действия второго типа (вПД2, характеризующиеся наличием двух негативных пиков), регистрируемых в зоне мембраны кардиомиоцитов субэпикарда, имеющей входы *t*-трубочек. Однако изменений в структурной организации Т-системы обнаружено не было. Эти данные свидетельствуют о том, что функциональные модификации Т-системы эпикардиальных кардиомиоцитов после ИР могут предшествовать их структурным модификациям.

Ключевые слова: миокард, ишемия, реперфузия, кардиомиоциты, внеклеточный потенциал действия, Т-система

DOI: 10.31857/S004445292305008X, EDN: KQFEOG

ВВЕДЕНИЕ

Ишемически-реперфузионное повреждение миокарда является ключевым звеном патогенеза инфаркта миокарда (ИМ) и восстановления коронарного кровотока в сердце после ИМ. Непосредственно в зоне нарушенного кровотока происходит смерть кардиомиоцитов, которая прогрессирует с увеличением продолжительности ишемического инсульта от более благоприятного субэндокарда к менее уязвимому субэпикарду [1, 2]. Это приводит к расширению зоны ИМ от сравнительно ограниченной области мертвых кардиомиоцитов в субэндокарде и средней части миокарда после 30–45 мин

коронарной окклюзии до более обширного и часто трансмурального ИМ при ишемии более 60–90 мин [3–6]. Поэтому скорейшее восстановление кровотока имеет критическое значение при лечении ИМ. Парадоксально, однако, что восстановление кровотока (реперфузия) связано с феноменом дополнительного повреждения миокарда, ведущего к увеличению зоны повреждения. Согласно существующим данным, до 50% окончательного размера зоны ИМ (зоны некроза) обусловлено именно реперфузионным повреждением [7]. Кроме того, ИМ сопровождается процессом ремоделирования миокарда, характеризующимся постепен-

ным увеличением сердца, сердечной дисфункцией и метаболическими изменениями [8].

Электровозбудимая мембрана кардиомиоцитов является важным элементом процесса ремоделирования миокарда. В частности, имеются данные о том, что Т-система (система инвагинаций, или *t*-трубочек, поверхностной мембраны миоцита внутрь клетки) претерпевает существенные структурные изменения при ряде сердечных патологий различной этиологии (хроническая ишемия, аортальный стеноз, гипертензия, диабетическая кардиомиопатия, ишемия-реперфузия (ИР) и др.), проявляющиеся в дилатации *t*-трубочек, утрате четкой поперечной ориентации и снижении плотности их расположения [9–16].

Тубулярный компартмент радикально отличается от остальной части плазматической мембраны кардиомиоцитов по плотности и экспрессии различных ионных каналов, транспортеров и рецепторов. Именно в Т-системе сконцентрированы потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа. Распространяющийся по *t*-трубочкам вглубь кардиомиоцита ПД запускает открытие данных каналов и вход внеклеточного Ca^{2+} в цитоплазму кардиомиоцита, что ведет к выбросу саркоплазматического Ca^{2+} в цитоплазму (calcium-induced calcium release, CICR) и последующему сокращению кардиомиоцита. Релаксация клетки достигается тем, что высвобожденный Ca^{2+} захватывается обратно в саркоплазматический ретикулум Ca^{2+} -АТФазой (SERCA), а также выводится из клетки $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником (NCX) клеточной мембраны кардиомиоцита [17, 18]. Последовательность и синхронность активации всех вышеуказанных электрогенных механизмов имеют важное значение для работы сердца в норме и при патологии. В этой связи особый интерес представляют не только структурные, но и функциональные изменения в тубулярном компартменте мембраны на разных сроках после ИР.

До недавнего времени, однако, не существовало прямых методов исследования электрической активности непосредственно в тубулярном компартменте кардиомиоцитов *in situ*. Используемые электрофизиологические методы регистрации с помощью контактных макроэлектродов характеризуют интегральную электрическую активность агломератов клеток сердца. Эксперименты с внутриклеточной регистрацией токов или потенциалов действия всей мембраны клетки обычно проводятся на изолированных из нормального окружения клетках сердца без возможности дискриминации электрогенных механизмов, локализованных в субмембранных компартментах плазматической мембраны интактных кардиомиоцитов, что еще более ограничивает интерпретацию результатов этих исследований [19–21].

Ранее апробированный нами в экспериментах на изолированных скелетных мышцах лягушки

[22] и изолированном сердце крысы [23, 24] метод внеклеточной регистрации потенциалов действия (ВПД) с использованием стеклянных электродов с тонким кончиком с наружным диаметром до 5 микрон представляется подходом, позволяющим эффективно преодолевать многие из перечисленных выше ограничений.

Таким образом, целью данной работы было исследование динамики изменений в электрогенезе функционально различных отделов мембраны кардиомиоцитов субэпикарда левого желудочка (ЛЖ) у крыс на разных сроках после ИР с использованием метода внеклеточной регистрации и сопоставление с данными об изменениях Т-системы, полученными с использованием конфокальной микроскопии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модель ИР у крыс, выбранная для данной работы, хорошо охарактеризована и считается наиболее релевантной по отношению к клинической практике [25].

Исследования выполнялись на сердцах лабораторных крыс-самцов линии Wistar (возраст и вес на начало эксперимента 2–4 месяца и 250–300 г соответственно). Во время эксперимента животные содержались в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии РАН в стандартных условиях и при свободном доступе к воде и пище. Всего в работе было использовано 27 крыс.

ЭКГ исследование проводилось на крысах, обездвиженных с помощью ингаляции изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) через маску. Ингаляционная анестезия была выбрана в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями для проведения электрокардиографических исследований на крысах [26]. Регистрация ЭКГ осуществлялась в трех стандартных отведениях с использованием одноразовых игольчатых электродов, подключенных к электрокардиографу для ветеринарии Поли-Спектр –8/В. Во время регистрации ЭКГ животных размещали на подогреваемом столике (38°C). Запись кардиограмм осуществлялась перед операцией и перед выведением животных из эксперимента через 2 и 4 нед после ИР. Длительность регистрации составляла 5 мин. Затем в полученных для каждого животного записях ЭКГ осуществлялось усреднение PQRS комплексов для более точной оценки исследуемых параметров.

Коронароокклюзия с последующей реперфузией (ИР-группа) выполнялась на животных, наркотизированных с помощью золетила (40 мг/кг веса животного; Virbax, Франция) с добавлением ксилантиа (10 мг/кг веса животного; Нита-Фарм, Россия) в соответствии с ранее описанной методикой [27]. В ИР-группе животных лигатура ослаблялась через

45 мин после окклюзии левой коронарной артерии. У ложнооперированных животных (ЛО-группа) лигатура вокруг артерии размещалась в точности, как и в случае ИР-крыс, но без окклюзии артерии. Для проведения искусственной вентиляции легких с помощью аппарата ИВЛ (Kent Scientific TOPOTM Dual Mode Ventilator; частота дыхания — 60/мин, дыхательный объем в пределах от 1.5 до 3 мл/100 г массы) проводилась интубация трахеи с предварительной обработкой гортани 2% раствором лидокаина. Окклюзия артерии подтверждалась подъемом сегмента ST на ЭКГ [25].

Изоляция сердца для электрофизиологических исследований проводилась на сроках 24 ч, 2 и 4 нед после ИР. По окончании этих исследований сердца использовались для приготовления поперечных срезов, окрашиваемых для определения размера зоны некроза через 24 после ИР и рубца на более поздних сроках после операции.

Электрофизиологические исследования. Эксперименты проводились на изолированных сердцах крыс в условиях сохраненного синусового ритма при постоянной перфузии сердца аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа. Животных анестезировали с помощью раствора хлоралгидрата (400 мг/кг; Chemical Point UG, Германия), после чего сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой микроэлектродной регистрации [24]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) раствор Тироде со следующим составом: 140 мМ NaCl, 4.5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, pH 7.4. Эксперименты проводили при температуре 36–37°C путем контролируемого подогрева перфузирующего раствора. Скорость перфузии составляла 5–7 мл/мин. Удаление из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществляли через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору. Изготовление микроэлектродов (патч-пипеток) с диаметром кончика 5 мкм производили с использованием программируемого пуллера (Sutter Instr., Model P-1000, США) из трубочек боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм. После этого микроэлектрод заполняли раствором Тироде. Сопrotивление кончика микроэлектрода, заполненного раствором Тироде, составляло около 2 МОм. Устранение сократительных ответов обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы 2,3-бутандион монооксида (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 30 мМ. Микроэлектрод, подключенный к входу усилителя АМ-1500 (National Instruments, США), подводили к различным участкам поверхности ЛЖ исследуемых сердец при помощи высокопрецизионного микроманипулятора NMH-21

(Narishige, Япония). При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода с поверхностью сердца, как показано на рис. 1а, регистрировались авторитмические систолические ВПД с частотой в диапазоне 0.3–1 Гц.

Длительность непрерывной регистрации ВПД от конкретной точки по времени могла составлять один и более часа. После регистрации от данной точки 10–20 последовательных ВПД кончик микропипетки перемещался с шагом 50–100 мкм в соседнюю точку регистрации в пределах того же участка. Размер каждого участка составлял ≈500 × 500 мкм. В среднем в каждом эксперименте выполнялось картирование 10–12 участков от базального участка ЛЖ в направлении к верхушке сердца с аналогичным числом регистрируемых точек в пределах исследуемого участка. Таким образом, в целом от каждого сердца суммарно осуществлялось от 100 до 144 отведений в различных участках ЛЖ. Регистрируемые сигналы оцифровывались с частотой 10 кГц при помощи аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments, США) и анализировались с помощью программного пакета WinWCP 5 (SIPBS, Великобритания).

Оценка размера ИМ. Сердце разрезали на 5–6 поперечных срезов, которые после окраски визуализировались под цифровым USB-микроскопом со штативом (модель МИКМЕД 5.0, Россия). Для оценки размера зоны некроза через 24 ч после ИР и доли рубцовой ткани через 2–4 нед после операции использовались поперечные срезы сердца контрольных, ЛО- и ИР-крыс, окрашенные трифенилтетразолием хлористым (1% раствор трифенилтетразолия хлористого в 0.2 М Tris, pH 7.8) в соответствии с ранее описанной методикой [28]. Пример такого окрашенного среза сердца крысы ИР-группы (четыре недели после ИР) представлен на рис. 1б. Анализ полученных изображений проводился планиметрическим методом при помощи программы Fiji — ImageJ. Доля некротической или рубцовой ткани миокарда ЛЖ определялась как отношение площади некротической/рубцовой ткани к общей площади стенок ЛЖ для каждого поперечного среза. Затем производился расчет среднего значения для всего сердца.

Анализ распределения t-трубочек кардиомиоцитов изолированного сердца с использованием конфокальной микроскопии. Кардиомиоциты субэпикарда исследовали, используя инвертированный лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5, оборудованный резонансным сканнером (8000 Hz) и 20–60x (NA = 1.3) объективы (Leica, Germany, Wetzlar), в соответствии с ранее описанным методом [16]. Коротко, в каждом эксперименте получали снимки 7–15 случайно выбранных на поверхности ЛЖ полей (205 × 205 мкм). Изолированное сердце, окрашенное с помощью перфузии флуоресцентным красителем DI-8-ANEPPS

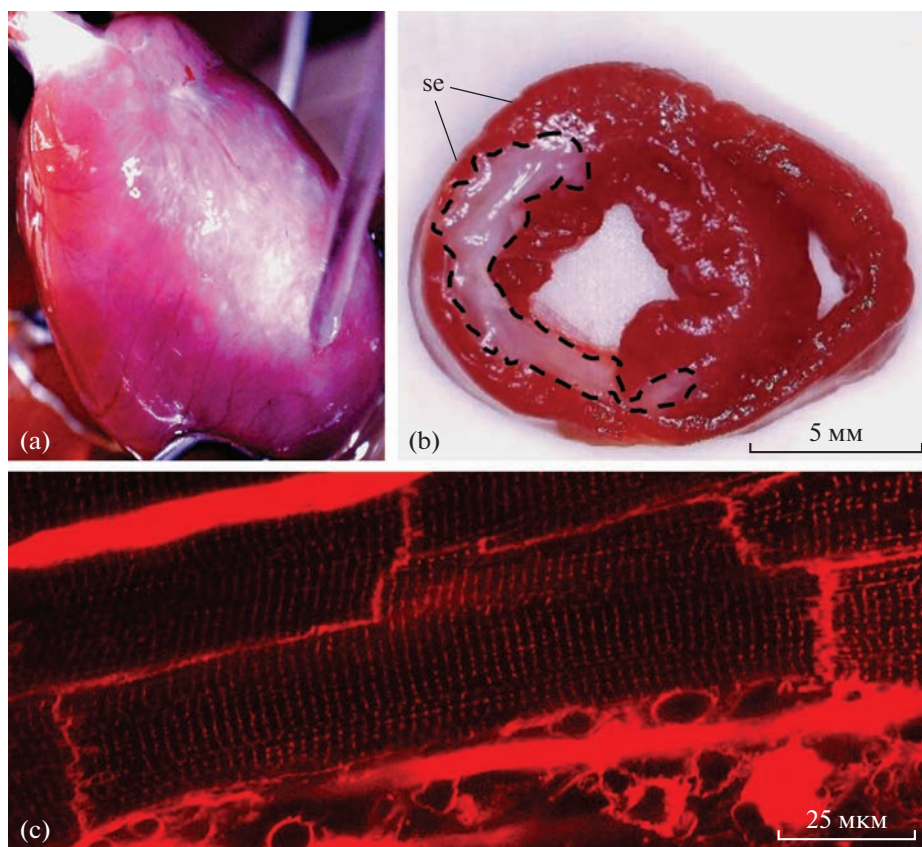


Рис. 1. Изолированное сердце крысы через четыре недели после ИР с подведенным к ЛЖ микроэлектродом для регистрации вПД (а) и поперечный срез сердца с рубцовой тканью (границы рубцовой ткани обозначены пунктирной линией), окрашенный раствором трифенилтетразолия хлористого (б). Микрофотография окрашенного DI-8-ANEPPS участка миокарда ЛЖ, полученная с использованием конфокального микроскопа (с). SE – субэпикард.

(10 мкМ, Santa Cruz Biotechnology, США) и обращенное ЛЖ в сторону объектива микроскопа, располагалось на столике микроскопа в специальной чашечке Петри с тонким (60 микрон) стеклянным дном. Для облучения образца использовали аргоновый лазер (при 80% мощности). Регистрация флуоресцентных сигналов велась с использованием 600–690 нм оптических фильтров. Поскольку интенсивность фоновой флуоресценции зависит от многих факторов, включая плотность капиллярной сети и соединительной ткани в поле наблюдения, смещение и чувствительность РМТ-детектора подбирались индивидуально для каждого случая, чтобы сигнал находился в пределах линейного диапазона детектора. Выбранный диаметр точечной диафрагмы (pinhole) системы составлял 100 микрон. В каждом эксперименте флуоресцентный сигнал регистрировался в нескольких произвольно выбранных в пределах первого слоя кардиомиоцитов субэпикарда ЛЖ сердца полях наблюдения, как показано на рис. 1с. Первичный анализ всех накопленных в этих исследованиях данных производился с помощью Fiji – ImageJ программного обеспечения. Для каждого исследованного кардиомио-

цита анализировалось распределение интервалов между соседними *t*-трубочками в пределах узкого (1 мкм шириной) района интереса, параллельного длинной оси клетки, и рассчитывались средняя длина интервалов между *t*-трубочками и доля интервалов, длина которых превышает 3 мкм (т.е. доля интервалов с выпадающими *t*-трубочками).

Все данные проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро–Уилка) и, в соответствии с результатами этой проверки, различия между значениями в контрольной и экспериментальных группах оценивали как достоверные при $p < 0.05$, используя соответствующий параметрический или непараметрический тест. Представленные в тексте данные приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

ЭКГ-исследования. Наиболее заметные изменения в электрокардиограммах были отмечены у крыс ИР-группы через 2–4 нед после операции по сравнению с группой ЛО-крыс и контролем (ЭКГ, снятые до операции; рис. 2). Анализ усредненных

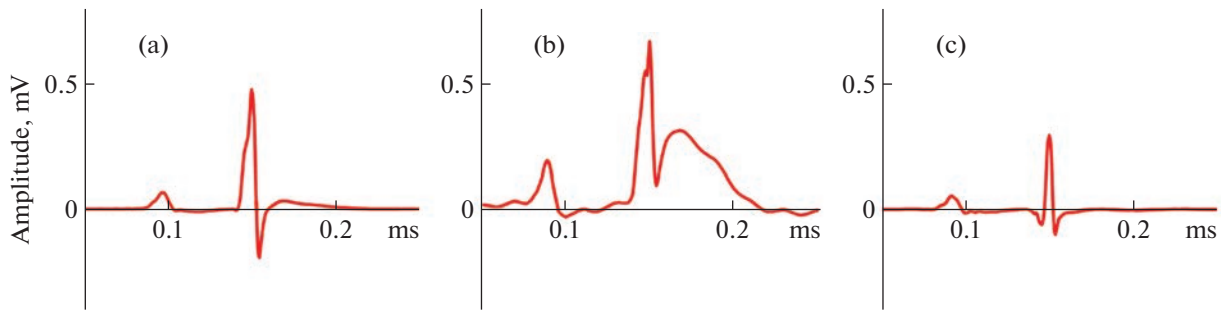


Рис. 2. Примеры усредненных комплексов QRS II стандартного отведения у крысы до операции (а), сразу после операции (б) и через 4 нед после ИР (с).

записей II стандартного отведения ЭКГ показал достоверные изменения ряда параметров по сравнению с контролем, а именно снижение амплитуды S-зубца, R-зубца, T-зубца (табл. 1). Также у крыс ИР-группы с интрамуральным ИМ отмечалось значительное увеличение амплитуды Q-зубца, который в ЭКГ крыс либо отсутствует, либо крайне мал в норме (рис. 2). Помимо этого, амплитуда S- и T-зубца ЭКГ крыс после ИР достоверно была ниже аналогичных значений в группе ЛО-крыс. У некоторых животных через 2–4 нед после ИР наблюдалась инверсия зубца T (рис. 2с) Достоверных отличий между исследованными параметрами ЭКГ крыс контрольной и ЛО-групп выявлено не было.

Электрофизиологические исследования. В электрофизиологических экспериментах были исследованы изолированные сердца ЛО-крыс (5 крыс), и сердца крыс через 24 ч (6 крыс), через 2 нед (3 крысы) и через 4 нед (4 крысы) после ИР. На рис. 3 представлены суперпозиция нормализованных ответов от индивидуальных точек регистрации вПД1 и вПД2 от субэпикардиальных кардиомиоцитов ЛЖ ЛО-крысы и их усредненные значения.

Видно, что профили вПД кардиомиоцитов ЛЖ сердца ЛО-группы крыс представляли собой сигналы двух типов. Сигналы первого типа (вПД1), характеризующиеся наличием одного быстрого негативного пика (P1), встречались относительно редко ($15.2 \pm 2.1\%$ от всех регистраций, 5 крыс). Значительно чаще ($85.4 \pm 3.2\%$ от всех регистра-

ций, 5 крыс) регистрировались вПД второго типа (вПД2), которые характеризовались наличием двух выраженных негативных пиков: первого – быстрого (P1), и второго (P2), сильно варьирующего от точки регистрации к точке как по амплитуде, так и по длительности пика. Средние значения времени спада до 90% до базовой линии (T_{90}) вПД1 и вПД2 ЛО-крыс составляли 6.05 ± 0.65 и 41.4 ± 6.5 мс соответственно. Это близко к значениям, полученным нами ранее у контрольных крыс [24, 29, 30].

Спустя сутки после ИР наблюдались достоверные изменения ряда исследуемых параметров вПД1 и вПД2 кардиомиоцитов поверхности ЛЖ. Так, у вПД1 после его окончания отчетливо наблюдалось появление позитивной фазы следовой гиперполяризации (СГ), а у вПД2 отмечалось снижение амплитуды второго пика (рис. 4).

Через четыре недели после ИР указанные изменения достигали максимальных значений с одновременным увеличением длительности T_{90} вПД1 (рис. 5). При этом СГ наблюдалась и у вПД2. Частота встречаемости вПД1 и вПД2 на всех сроках после ИР достоверно не отличалось от значений ЛО-крыс ($p > 0.05$; дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса) и составляла в среднем 17.2 ± 3.1 и $83.4 \pm 6.2\%$.

Оценка размера ИМ. Установлено, что доля рубцовой ткани, рассчитанная на основе анализа поперечных срезов стенки ЛЖ, варьировала в диапа-

Таблица 1. Изменения основных исследованных параметров ЭКГ крыс ИР-группы через 2–4 нед после операции

	Контроль ($n = 24$)	ЛО ($n = 6$)	ИР ($n = 12$)
Амплитуда Q зубца, мВ	-0.012 ± 0.002	-0.011 ± 0.005	$-0.051 \pm 0.019^*$
Амплитуда R зубца, мВ	0.667 ± 0.035	0.574 ± 0.028	$0.425 \pm 0.037^*$
Амплитуда S зубца, мВ	-0.222 ± 0.027	-0.289 ± 0.082	$-0.081 \pm 0.017^* \#$
Амплитуда T зубца, мВ	0.106 ± 0.013	0.089 ± 0.007	$0.011 \pm 0.019^* \#$

* – достоверное отличие от контрольных значений ($p < 0.05$; one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки);

– достоверное отличие от параметров ЭКГ ЛО-крыс ($p < 0.05$; one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки);

n – количество животных в каждой группе.

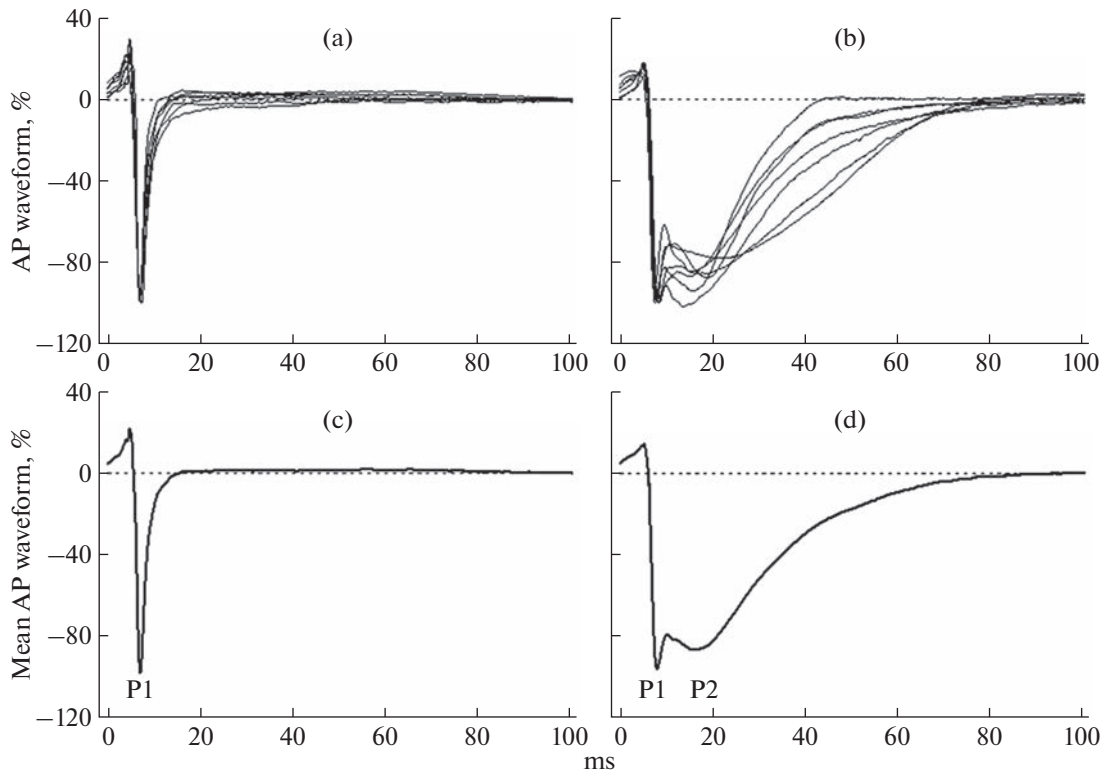


Рис. 3. Суперпозиция нормализованных профилей вПД1 (а) и вПД2 (б) от индивидуальных точек регистрации (в пределах одного участка) субэпикарда ЛЖ сердца ЛО крысы и их усредненные значения (панели (с) и (д) – вПД1 и вПД2 соответственно). Все сигналы нормализованы к величине их первого и единственного для вПД1 негативного пика (P1). P2 – метка второго негативного пика в составе вПД2 сигнала.

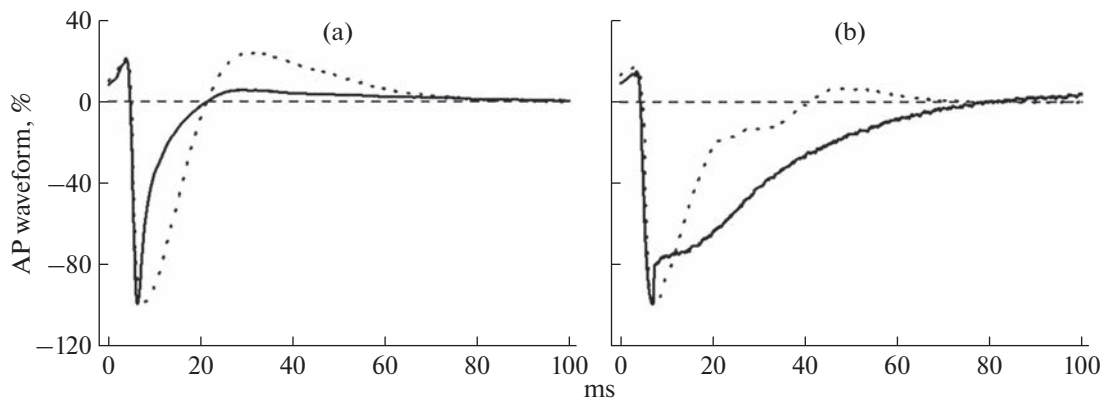


Рис. 4. Примеры вПД1 (а) и вПД2 (б) кардиомиоцитов субэпикарда ЛЖ крысы через 24 ч (сплошная линия) и 4 нед (пунктирная линия) после ИР.

зоне от 5 до 35% от общей площади стенок ЛЖ, при этом средние значения относительного размера зоны некроза через 24 ч после ИР (5 крыс) достоверно отличалось от доли рубцовой ткани через 4 нед (7 крыс) после операции ($30.8 \pm 1.7\%$ и $13.8 \pm 3.8\%$ соответственно; $p < 0.05$; one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

На разных сроках после ИР как зона некроза, так и рубцовая ткань, как правило, не затрагивают субэпикард (интрамуральный инфаркт), от кардиомиоцитов которого проводилась регистрация вПД. Это соответствует данным о том, что ишемия менее 45 мин сопровождается минимальной гибелью клеток субэпикарда [31, 32].

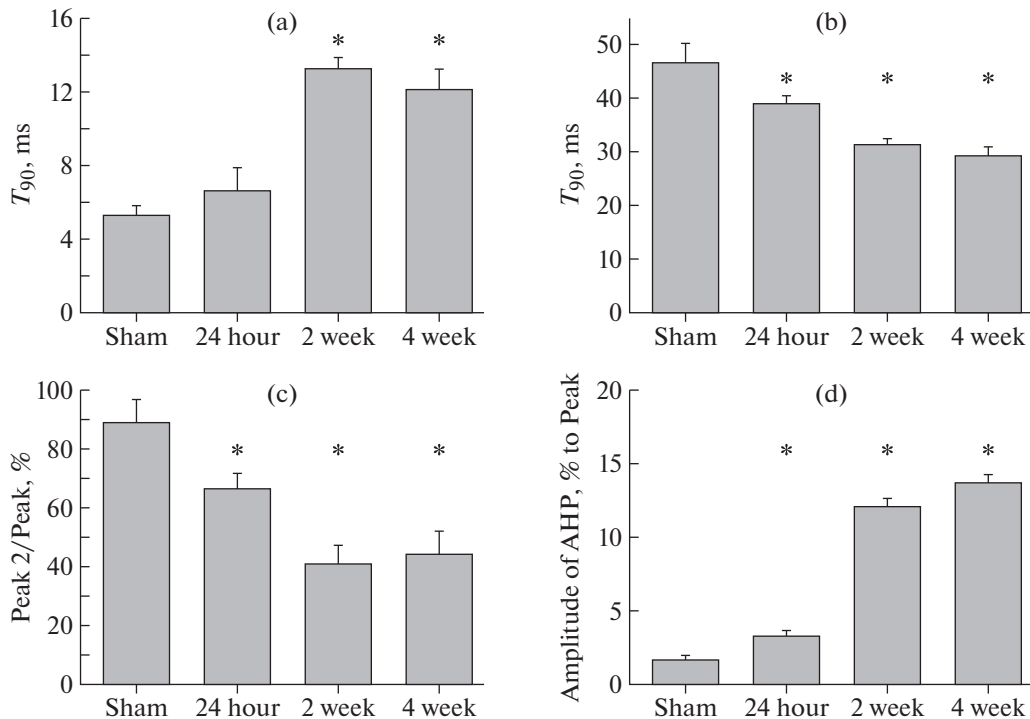


Рис. 5. Значения характеристик вПД1 и вПД2 ЛЖ сердца ЛО-крыс (Sham) и крыс через 24 ч, 2 и 4 нед после ИР (5, 6, 3 и 4 сердца в каждой из групп соответственно, 100–144 регистрации в каждом сердце). (а) – T_{90} вПД1; (б) – T_{90} вПД2; (с) – относительная амплитуда 2-го пика вПД2 (% от амплитуды первого негативного пика сигнала); (д) – относительная пиковая амплитуда СГ (АНР) вПД1 (% от амплитуды негативного пика сигнала). * – достоверные отличия средних значений от среднего значения аналогичных параметров ЛО-крыс. ($p < 0.05$; one-way ANOVA с апостериорным тестом Тьюки).

Поскольку у крыс, использовавшихся в электрофизиологических экспериментах, зоны некроза могли появиться в ходе перфузии изолированного сердца, были исследованы срезы сердец трех здоровых (контрольных) крыс по завершении равной по времени процедуры перфузии и микроэлектродного картирования (3 ч). Во всех этих исследованиях не было выявлено некротических зон, что позволяет говорить об отсутствии дополнительного, повреждающего миокард воздействия в период проведения электрофизиологических экспериментов на изолированном сердце.

Анализ распределения t-трубочек кардиомиоцитов изолированного сердца с использованием конфокальной микроскопии. В экспериментах, направленных на изучение целостности структуры тубулярного аппарата кардиомиоцитов, были изучены сердца

ЛО- (3 крысы) и ИР-крыс (3 крыс) через четыре недели после операции. Результаты этого анализа не показали статистически значимых отличий между экспериментальными группами ни по среднему интервалу, ни в частоте встречаемости длинных интервалов между соседними t-трубочками ($p > 0.05$; t-критерий Стьюдента; табл. 2). При этом параметры интервалов между соседними t-трубочками у ЛО-крыс сходны с данными, полученными для контроля нами ранее [16].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе эксперимента было установлено, что средние значения размеров зоны некроза миокарда ЛЖ через 24 ч и рубцовой ткани через 4 нед после ИР достоверно различались между собой

Таблица 2. Среднее значение длины интервалов между соседними t-трубочками и доля интервалов, длина которых превышает 3 μm , в группе ЛО-крыс и через 4 нед после ИР

	Средний интервал между соседними t-трубочками, μm	Доля длинных (>3 μm) интервалов, %
ЛО-крысы ($n = 3$)	2.04 ± 0.08	14.47 ± 0.74
ИР-крысы ($n = 3$)	1.87 ± 0.19	11.92 ± 2.54

(30.8 ± 1.7 и $13.8 \pm 3.8\%$ соответственно). Более низкое среднее значение доли рубцовой ткани через 4 недели после ИР по сравнению с некротической зоной через сутки после операции может быть объяснено замещением инфарктного миокарда рубцовой тканью. Данный процесс сопровождается снижением толщины стенки ЛЖ в инфарктной области в результате резорбции некротизированного участка миокарда [33].

Некроз и формирование рубца после ИМ сопровождается изменением параметров ЭКГ [34–37]. В наших экспериментах во II стандартном отведении ЭКГ у крыс амплитуда Q-зубца в норме была крайне мала, однако в группе ИР-крыс происходит ее значительное увеличение. Предыдущие исследования на крысах показали значительные изменения сегмента ST при инфаркте миокарда [34] и при ишемии миокарда [35], однако четких критериев изменений сегмента ST не установлено [36]. В наших экспериментах после ИР амплитуды S- и T-зубца были ниже контрольных значений и значений амплитуд в группе ЛО-крыс. Также у животных ИР-группы встречались инвертированные T-зубцы, что и могло быть причиной снижения среднего значения амплитуды этого зубца. Появление выраженного Q-зубца одновременно с инверсией T-зубца является признаком развития трансмурального инфаркта [37].

Изменения в электрогенезе кардиомиоцитов субэпикарда значительно растянуты во времени. Начиная с 24 ч и вплоть до четвертой недели после ИР происходило увеличение длительности T_{90} вПД1 и амплитуды позитивной фазы СГ, достигающее максимальных значений к четырем неделям после ИР. На этом же сроке (четыре недели после ИР) выраженная СГ является компонентом и вПД2. Кроме того, с 24 ч после ИР выявляется достоверное укорочение T_{90} вПД2 по сравнению с ЛО-крысами (см. рис. 4).

В соответствии с нашими предыдущими исследованиями с использованием данного метода в сердцах контрольных животных регистрировались сигналы двух, различных по количеству негативных пиков, типов вПД: вПД1 и вПД2 [24, 29, 30]. Все имеющиеся данные, касающиеся техники внеклеточной регистрации, структурной организации Т-системы кардиомиоцитов желудочков сердца и распределения различных ионных каналов и электрогенных транспортеров в поверхностной мембране и в мембране Т-системы кардиомиоцита свидетельствуют в пользу того, что тип внеклеточно регистрируемых ПД в наших условиях определяется в основном позицией кончика регистрирующего электрода на поверхности кардиомиоцита по отношению к позиции выходов (устьев) *t*-трубочек [24]. А именно, вПД1 регистрируются в тех случаях, когда электрод был помещен в участок мембраны кардиомиоцита, не содержащий устьев *t*-

трубочек и, соответственно, его основной негативный пик формируется входящими токами, идущими через каналы поверхностной мембраны клетки: в основном через натриевые потенциал-чувствительные каналы. В том же случае, если кончик регистрирующей пипетки был помещен в участок мембраны кардиомиоцита, содержащий одно или более устьев *t*-трубочек, регистрируется более сложный вПД2 сигнал, в котором присутствие второго негативного пика отражает активность электрогенных механизмов, локализованных в мембране Т-системы кардиомиоцита. Это, в первую очередь, Ca^{2+} -каналы L-типа, Na^+/Ca^{2+} -обменник и некоторые подтипы K^+ -каналов [38, 39]. Работа каких конкретно ионных механизмов претерпевает изменения, приводя к продлению спада вПД1, снижению амплитуды второго пика вПД2 и появлению СГ после ИР, предстоит еще выяснить.

Ранее было показано, что при стрептозотоциновом диабете (СТЗ-СД) ПД желудочковых кардиомиоцитов крыс замедлены из-за подавления K^+ -токов. А именно, были приведены свидетельства сниженной в кардиомиоцитах СТЗ-СД-крыс активности/экспрессии трех типов K^+ -каналов: каналов выходящего выпрямления, каналов сверхмедленного тока (quasi-steady-state, Iss) и каналов тока обратного выпрямления (IK1) [40–42].

Наши недавние результаты предполагают, что патогенез СТЗ-СД в отношении изменений ионных проводимостей желудочковых кардиомиоцитов более сложен, и наряду с подавлением части потенциал-зависимых K^+ -каналов существует также и активация (возможно, компенсаторная) K^+ -каналов реполяризационного резерва, обеспечивающих появление/усиление фазы СГ вПД. В частности, такими каналами могут быть апамин-чувствительные Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы низкой проводимости (SK каналы), формирующие фазу СГ ПД [15, 16, 30].

Имеющий место в представленных результатах рост СГ также может быть связан с экспрессией SK каналов в желудочковых кардиомиоцитах, что подтверждается работами других авторов, выполненных на сердцах человека и животных моделях с сердечной недостаточностью и после инфаркта [43–46].

Важное различие в ремоделировании вПД после ИР по сравнению с диабетической кардиомиопатией заключается в том, что частота встречаемости вПД1 и вПД2 после ИР не изменялась, тогда как при развитии СТЗ-СД наблюдались существенное увеличение доли регистраций вПД1 и снижение доли регистраций вПД2 [15], что может быть ассоциировано с дезорганизацией Т-системы кардиомиоцитов и уменьшением плотности распределения устьев *t*-трубочек на поверхности. Отсутствие таких изменений может свидетельствовать об отсутствии морфологических изменений в этом мембранном компартменте субэпикардальных кардиомиоцитов

после ИР, что подтверждается и результатами, полученными с использованием конфокальной микроскопии. Хотя структурное ремоделирование Т-тубулярной системы характерно для широкого спектра сердечных патологий, включая ИР [10, 12–14], и порой даже предшествует клиническим проявлениям желудочковой дисфункции [9], в нашей работе достоверных различий в исследованных параметрах организации *t*-трубочек между ЛО- и ИР-крысами выявлено не было. Возможно, это обусловлено сравнительно небольшой выборкой экспериментальных животных. Также отсутствие признаков структурного ремоделирования Т-системы на четвертой неделе после ИР вкуче с изменениями параметров вПД могут указывать на то, что функциональные модификации Т-системы эпикардальных кардиомиоцитов после ИР могут предшествовать их структурным изменениям.

Существенное увеличение на этом фоне T_{90} вПД1 и снижение амплитуды второго пика у вПД2 предположительно могут свидетельствовать о перераспределении потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа между поверхностной мембраной и мембраной тубулярного компартмента кардиомиоцитов. Однако это предположение еще предстоит проверить.

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, разработанным и утвержденным локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (Протокол № 5/2021 от 27.05.2021 г.)

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00 и при частичной поддержке гранта РФФИ № 20-34-90010.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента (А.В.С., М.Г.Д., И.В.К.), сбор данных (А.В.С., И.В.К., Е.В.Н., Ю.А.Ф., А.А.П.), обработка данных (А.В.С., И.В.К., Е.В.Н., Ю.А.Ф.), написание и редактирование манускрипта (А.В.С., М.Г.Д., И.В.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56: 786–794. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.56.5.786>
2. Boatwright RB, Downey HF, Bashour FA, Crystal GJ (1980) Transmural variation in autoregulation of coronary blood flow in hyperperfused canine myocardium. *Circ Res* 47: 599–609. <https://doi.org/10.1161/01.RES.47.4.599>
3. Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, Frangogiannis NG (2013) Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem* 61: 555–570. <https://doi.org/10.1369/0022155413493912>
4. Reed GW, Rossi JE, Cannon CP (2017) Acute myocardial infarction. *Lancet* 389: 197–210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30677-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30677-8)
5. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SP, Kloner RA, Lefer DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Longacre LS, Ripplinger CM, Van Eyk JE, Heusch G (2018) Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314: H812–H838. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00335.2017>
6. Yeap XY, Dehn S, Adelman J, Lipsitz J, Thorp EB (2013) Quantitation of acute necrosis after experimental myocardial infarction. *Methods Mol Biol* 1004: 115–133. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-383-1_9
7. Liu T, Howarth AG, Chen Y, Nair AR, Yang HJ, Ren D, Tang R, Sykes J, Kovacs MS, Dey D, Slomka P, Wood JC, Finney R, Zeng M, Prato FS, Francis J, Berman DS, Shah PK, Kumar A, Dharmakumar R (2022) Intramyocardial Hemorrhage and the “Wave Front” of Reperfusion Injury Compromising Myocardial Salvage. *J Am Coll Cardiol* 79: 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.10.034>
8. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J (2022) Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J* 43: 2549–2561. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac223>
9. Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie YP, Zimmerman K, Weiss RM, Anderson ME, Cheng H, Song LS (2010) T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res* 107: 520–531. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.212324>
10. Xie YP, Chen B, Sanders P, Guo A, Li Y, Zimmerman K, Wang LC, Weiss RM, Grumbach IM, Anderson ME, Song LS (2012) Sildenafil prevents and reverses transverse-tubule remodeling and Ca^{2+} handling dysfunction in right ventricle failure induced by pulmonary artery hypertension. *Hypertension* 59: 355–362. <https://doi.org/10.1161/111.180968>
11. Ibrahim M, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM (2011) The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proc Biol Sci* 278: 2714–2723. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0624>

12. *Ibrahim M, Terracciano CM* (2013) Reversibility of T-tubule remodelling in heart failure: Mechanical load as a dynamic regulator of the T-tubules. *Cardiovasc Res* 98: 225–232. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt016>
13. *Louch WE, Sejersted OM, Swift F* (2010) There goes the neighborhood: Pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca^{2+} handling. *J Biomed Biotechnol* 2010: 503906. <https://doi.org/10.1155/2010/503906>
14. *Wang S, Zhou Y, Luo Y, Kan R, Chen J, Xuan H, Wang C, Chen J, Xu T, Li D* (2021) SERCA2a ameliorates cardiomyocyte T-tubule remodeling via the calpain/JPH2 pathway to improve cardiac function in myocardial ischemia/reperfusion mice. *Sci Rep* 11: 2037. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81570-4>
15. *Кубасов ИВ, Чистякова ОВ, Сухов ИБ, Панов АА, Добрецов МГ* (2020) Изменения внеклеточно регистрируемых потенциалов действия изолированного сердца крысы при развитии стрептозототинового диабета. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106: 1266–1277. [*Kubasov IV, Chistyakova OV, Sukhov IB, Panov AA, Dobretsov MG* (2020) Functional changes in the T-system of cardiomyocytes of the isolated rat heart during development of streptozotocin-induced diabetes. *Russ J Physiol* 106: 1266–1277. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/s0869813920100052>
16. *Kubasov IV, Bobkov DE, Stepanov AV, Sukhov IB, Chistyakova OV, Dobretsov MG* (2020) Evaluation of the T-System of Rat Cardiomyocytes during Early Stages of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Russ J Physiol* 106: 1098–1108. <https://doi.org/10.31857/S0869813920090046>
17. *Swift F, Franzini-Armstrong C, Øyehaug L, Enger UH, Andersson KB, Christensen G, Sejersted OM, Louch WE* (2012) Extreme Sarcoplasmic Reticulum Volume Loss and Compensatory T-Tubule Remodeling after Serca2 Knockout. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 3997–4001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120172109>
18. *Pinali C, Bennett H, Davenport JB, Trafford AW, Kitmitto A* (2013) Three-Dimensional Reconstruction of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Reveals a Continuous Network Linking Transverse-Tubules: This Organization Is Perturbed in Heart Failure. *Circ Res* 113:1219–1230. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301348>
19. *Knollmann BC, Tranquillo J, Sirenko SG, Henriquez C, Franz MR* (2002) Microelectrode study of the genesis of the monophasic action potential by contact electrode technique. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 1246–1252. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2002.01246.x>
20. *Kondo M, Nesterenko V, Antzelevitch C* (2004) Cellular basis for the monophasic action potential. Which electrode is the recording electrode? *Cardiovasc Res* 63: 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.003>
21. *Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR* (2007) Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H614–621. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01085.2005>
22. *Kubasov IV, Dobretsov M* (2012) Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, *Rana temporaria*. *J Physiol* 590: 2937–2944. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230813>
23. *Kubasov IV, Stepanov AV, Györke S* (2017) Action potential heterogeneity as revealed by extracellular microelectrode recording from the surface of the isolated rat heart. *J Evol Biochem Phys* 53: 515–518. <https://doi.org/10.1134/S0022093017060102>
24. *Kubasov IV, Stepanov A, Bobkov D, Radwanski PB, Terpilowski MA, Dobretsov M, Györke S* (2018) Sub-cellular Electrical Heterogeneity Revealed by Loose Patch Recording Reflects Differential Localization of Sarcolemmal Ion Channels in Intact Rat. *Front Physiol* 9:61. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061>
25. *Ciuffreda MC, Tolva V, Casana R, Gneccchi M, Vanoli E, Spazzolini C, Roughan J, Calvillo L* (2014) Rat Experimental Model of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: An Ethical Approach to Set Up the Analgesic Management of Acute Post-Surgical Pain. *PLoS One* 9: e95913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095913>
26. *Murakami M, Niwa H, Kushikata T, Watanabe H, Hirota K, Ono K, Ohba T* (2014) Inhalation anesthesia is preferable for recording rat cardiac function using an electrocardiogram. *Biol Pharm Bull* 37: 834–839. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00012>
27. *Zhang R, Han D, Li Z, Shen C, Zhang Y, Li J, Yan G, Li S, Hu B, Li J, Liu P* (2018) Ginkgolide C alleviates myocardial ischemia/reperfusion-induced inflammatory injury via inhibition of CD40-NF- κ B pathway. *Front Pharmacol* 9: 109. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00109>
28. *Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W* (1981) Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 101: 593–600. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(81\)90226-X](https://doi.org/10.1016/0002-8703(81)90226-X)
29. *Kubasov IV, Dobretsov MG, Bobkov DE, Panov AA* (2020) A Putative Relationship between Polymorphism of Extracellularly Recorded Action Potentials and Organization of the T-tubular System in Rat Ventricular and Atrial Cardiomyocytes. *J Evol Biochem Phys* 56: 333–337. <https://doi.org/10.1134/S0022093020040043>
30. *Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG* (2021) Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes. *J Evol Biochem Phys* 57: 1511–1521. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060272>
31. *Tejada T, Tan L, Torres RA, Calvert JW, Lambert JP, Zaidi M, Husain M, Berce MD, Naib H, Pejler G, Abrink M, Graham RM, Lefter DJ, Naqvi N, Husain A* (2016) IGF-1 degradation by mouse mast cell protease 4 promotes cell death and adverse cardiac remodeling days after a myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 6949–6954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603127113>
32. *Shimizu Y, Nicholson CK, Lambert JP, Barr LA, Kuek N, Herszenhaut D, Tan L, Murohara T, Hansen JM, Husain A, Naqvi N, Calvert JW* (2016) Sodium sulfide attenuates ischemic-induced heart failure by enhancing prote-

- osomal function in an Nrf2-dependent manner. *Circ Heart Fail* 9: e002368.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002368>
33. *Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR* (1978) Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 90: 57–70.
 34. *Chrastina A, Pokreisz P, Schnitzer JE* (2014) Experimental model of transthoracic, vascular-targeted, photodynamically induced myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H270–H278.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00818.2012>
 35. *Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM* (1994) Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 75: 586–590.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.75.3.586>
 36. *Konopelski P, Ufnal M* (2016) Electrocardiography in rats: a comparison to human. *Physiol Res* 65: 717–725.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.933270>
 37. *Normann SJ, Priest RE, Benditt EP* (1961) Electrocardiogram in the normal rat and its alteration with experimental coronary occlusion. *Circ Res* 9: 282–287.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.9.2.282>
 38. *Brette F, Orchard C* (2003) T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. *Circ Res* 92:1182–1192.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000074908.17214.FD>
 39. *Hong TT, Shaw RM* (2017) Cardiac T-tubule microanatomy and function. *Physiol Rev* 97: 227–252.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2015>
 40. *Jourdon P, Feuvray D* (1993) Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol* 470: 411–429.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019866>
 41. *Shimoni Y, Ewart HS, Severson D* (1999) Insulin stimulation of rat ventricular K⁺ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. *J Physiol* 514: 735–745.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.735ad.x>
 42. *Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C* (2004) Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 559: 777–798.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063446>
 43. *Chang PC, Turker I, Lopshire JC, Masroor S, Nguyen BL, Tao W, Rubart M, Chen PS, Chen Z, Ai T* (2013) Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J Am Heart Assoc* 2: e004713.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004713>
 44. *Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shinohara T, Shen MJ, Chen Z, Shen C, Rubart-von der Lohe M, Lopshire JC, Ogawa M, Weiss JN, Lin SF, Ai T, Chen PS* (2011) Small conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ Res* 108: 971–979.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238386>
 45. *Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, Chen QH* (2013) Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H118–H130.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2011>
 46. *Bonilla IM, Long VP III, Vargas-Pinto P, Wright P, Belevych A, Lou Q, Mowrey K, Yoo J, Binkley PF, Fedorov VV, Györke S, Janssen PML, Kilic A, Mohler PJ, Carnes CA* (2014) Calcium-Activated Potassium Current Modulates Ventricular Repolarization in Chronic Heart Failure. *PLoS One* 9: e108824.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108824>

REMODELING OF EXTRACELLULARLY RECORDED ACTION POTENTIALS OF RAT HEART SUBEPICARDIAL CARDIOMYOCYTES AFTER ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

A. V. Stepanov^{a, #}, M. G. Dobretsov^a, E. V. Novikova, Yu. A. Filippov^a, A. A. Panov, and I. V. Kubasov^a

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

[#]*e-mail: botanik2407@gmail.com*

A number of systemic heart diseases leading to the development of heart failure (aortic stenosis, hypertension, diabetic cardiomyopathy, reperfusion injury etc.) are accompanied by a pronounced reorganization of the T-system of cardiomyocytes, both in humans and animals. However, structural-functional changes within this membrane compartment of cardiomyocytes following ischemia-reperfusion (IR) have not been thoroughly studied. The aim of the work was to study the remodeling of the T-system in the subepicardial cardiomyocytes of the left ventricle of the rat heart after IR injury using confocal microscopy and extracellular recording methods. The study was carried out after 24 hours, two weeks, and four weeks following IR. A remodeling of action potentials, recorded extracellularly in the cardiomyocyte membrane patches devoid of t-tubule entrances (type 1 eAP), was observed. Starting from 24 hours up to 4 weeks after IR, there was an increase in the duration of their decline time (T₉₀) and the formation of eAP after-hyperpolarization phase, reaching maximum values by the fourth week after IR. A decrease in the second peak's amplitude of eAPs, measured from cardiomyocyte surface locations with t-tubule openings, was also noticed four weeks after IR. In this investigation, no observable changes in the structural organization of the T-system were found. These data suggest that functional modifications of the epicardial cardiomyocyte T-system after IR injury may precede its structural modifications.

Key words: myocardium, ischemia, reperfusion, cardiomyocytes, extracellular action potential, T-system

ПРОГНОЗИРУЕМАЯ ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ СИНТЕЗА ВИТАМИНОВ И КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ОЖИРЕНИИ У ВЗРОСЛЫХ

© 2023 г. А. В. Шестопапов^{1,2,3,4}, Л. А. Ганенко^{5,*}, И. М. Колесникова^{1,2}, Т. В. Григорьева⁶, И. Ю. Васильев⁶, Ю. Л. Набока⁵, Н. И. Волкова⁵, О. В. Борисенко¹, С. А. Румянцев^{1,2,4}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия

⁴Центр Молекулярного Здоровья, Москва, Россия

⁵Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Ростов-на-Дону, Россия

⁶Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: ganenko.lilia@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.02.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Кишечная микробиота и ее метаболиты, такие как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) и витамины, участвуют в поддержании энергетического гомеостаза, что актуально в контексте ожирения. Целью работы стало проведение скрининга прогнозируемой представленности путей биосинтеза витаминов и КЦЖК на основании данных метагеномного секвенирования микробиоты больных с метаболически здоровым ожирением (МЗО) и метаболически нездоровым ожирением (МНЗО). Все участники исследования ($n = 263$) были разделены на две группы: контрольная группа ($n = 130$) и пациенты с ожирением ($n = 133$), которая в свою очередь была разделена по метаболическому фенотипу ожирения на подгруппы с МЗО ($n = 38$) и МНЗО, ($n = 55$). У пациентов проводилась оценка представленности метаболических путей образования витаминов и КЦЖК в фекалиях (PICRUSt2). У пациентов с ожирением наблюдалось увеличение представленности путей синтеза витаминов В1, В2, В5, В6, В7, В9 и витамина К, а также угнетение основных путей синтеза витамина В12. При этом характер изменений определялся метаболическим фенотипом ожирения. МЗО сопровождалось развитием дисбаланса в путях синтеза В1 и увеличенной представленностью путей образования витамина К. Тогда как МНЗО приводило к большим метаболическим возможностям микробиоты продуцировать витамины В1, В2, В5, В6, В7, В9 и К, а также к депрессии В12-синтезирующих путей. Кроме того, при МНЗО отмечалось увеличение представленности путей синтеза таких КЦЖК, как ацетат, пропионат и бутират, что не было характерно для лиц с МЗО. В целом изменение представленности метаболических путей у кишечной микрофлоры на фоне ожирения является результатом “селекции” микроорганизмов под действием специфических факторов, более выраженных при МНЗО. Таким образом, дисбаланс в путях синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот кишечной флоры отражает нарушение метаболического симбиоза в рамках суперорганизма (“микробиота-макроорганизм”).

Ключевые слова: кишечный микробиом, ожирение, PICRUSt2, метаболически здоровое ожирение, метаболически нездоровое ожирение, короткоцепочечные жирные кислоты, витамины

DOI: 10.31857/S0044452923050078, **EDN:** KPNYNI

ВВЕДЕНИЕ

Осложнения, ассоциированные с ожирением, такие как сахарный диабет II типа (СДII) и сердечно-сосудистые заболевания являются одной из ведущих причин смертности во всем мире [1]. Сообщается, что в настоящее время примерно 2.1 мил-

лиарда (30%) человек в мире страдают ожирением [2]. Тренд на снижение этой доли отсутствует, и по прогнозам на 2030 г., проблема охватит до 50% взрослого населения [3]. Из потенциальных этиологических факторов ни один не может полностью объяснить столь стремительное распространение

ожирения во всем мире [4]. Помимо этого, оказалось, что ожирение является гетерогенным заболеванием, включающим в себя несколько фенотипов в зависимости от наличия метаболических нарушений, а именно, выделяют фенотип метаболически здорового ожирения (МЗО) и метаболически нездорового ожирения (МНЗО) [5].

Структура кишечной микробиоты у пациентов с ожирением отличается от таковой у здоровых лиц [4]. По данным литературы, ожирение связано с обилием *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и соотношением *Firmicutes/Bacteroidetes*, но их изменения противоречивы в различных исследованиях [6]. Проведенное ранее нами исследование выявило как количественные, так и качественные изменения в микробиоме кишечника не только у пациентов с ожирением по сравнению со здоровыми лицами, но и между пациентами с разными фенотипами ожирения [7]. В частности, при сравнении количественных показателей изучаемых филоотипов микроорганизмов толстой кишки у здоровых лиц и пациентов с ожирением были выявлены статистически значимые отличия для 7 филоотипов: повышение *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* и снижение — *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *TM7 (Saccharibacteria)* и *Fusobacteria*. В то же время в группе пациентов с ожирением достоверно чаще ($p < 0.05$) верифицировали *Tenericutes*, *Planctomycetes* и *Lentisphaerae*. При МЗО встречаемость филоотипа *Lentisphaerae* была статистически значимо выше при сравнении с МНЗО. Количество *Bacteroidetes* было выше, а *Firmicutes* ниже при МНЗО, по сравнению с МЗО. В настоящее время микробиота кишечника рассматривается в качестве самостоятельного органа с собственным метаболизмом, который не только потребляет питательные вещества, но и производит их, являясь важной или неотъемлемой частью таких процессов, как энергетический обмен, модуляция гомеостаза глюкозы и липидов, а также синтез витаминов [8]. Связь между ожирением и микробиомом кишечника является двунаправленной, поскольку изменения микробного сообщества тесно связаны с развитием ожирения, а роль самого заболевания может рассматриваться и как их причина, и как следствие [9].

Взаимодействие микроорганизмов с макроорганизмом может проявляться в различных формах симбиоза, включая мутуализм, комменсализм и паразитизм. Симбиотические взаимодействия позволяют макроорганизму и/или бактериям использовать недоступные питательные вещества [9, 10]. Наиболее яркой иллюстрацией “метаболического мутуализма” является витамин-синтетическая функция микроорганизмов.

Недавние исследования показали, что кишечная микробиота и ее метаболиты, такие как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) и витамины могут участвовать в развитии ожирения и метаболиче-

ских нарушений [11]. В контексте изучения проблем ожирения наиболее интересны прототрофные микробы, синтезирующие витамин К и витамины группы В [9], которые могут иметь отношение к возникновению чувства голода, стимулировать чрезмерное потребление энергии, а в случае с ниацином (витамин В3) — провоцировать непереносимость глюкозы, резистентность к инсулину и повреждение печени [12].

Особая роль метаболической функции симбиотической микробиоты в поддержании гомеостаза макроорганизма принадлежит КЦЖК. Они являются продуктом бактериальной ферментации сложных полисахаридов. Более 95% КЦЖК, вырабатываемых в кишечнике, представляют собой ацетат, пропионат и бутират [13]. Ацетат способен проникать через гематоэнцефалический барьер и участвует в подавлении аппетита [14], принимает участие в липогенезе и является важным энергетическим субстратом для сердца, мозга, почек, мышц и других периферических тканей. Пропионат является второй КЦЖК по распространенности после ацетата, подобно ему также влияет на чувство голода и насыщение, возможно, повышая уровень лептина, что приводит к снижению потребления энергии [14]. Помимо этого, пропионат в гепатоцитах участвует в глюконеогенезе и липидном обмене. КЦЖК, в первую очередь бутират, улучшает кишечный барьер, предотвращая транслокацию бактерий и липополисахаридов из просвета кишечника в кровяное русло путем стимулирования синтеза муцина, секретиции слизи, а также индукции у колоноцитов и фагоцитов продукции антимикробных пептидов, которые препятствуют прикреплению и инвазии бактерий через слизистую оболочку кишечника. Также установлено, что бутират обратно снижает проницаемость слизистой оболочки кишки за счет активации в клетках АМФ-протеинкиназы, сопровождающейся усилением связи между колоноцитами. Бутират меньше всего всасывается из кишечника, он действует в основном локально и является основным энергетическим субстратом для колоноцитов [13, 14].

Таким образом, метаболизм микробиоты кишечника тесно вплетается в метаболические пути человека и имеет возможность непосредственно влиять на общий баланс энергии, витаминов и питательных веществ, а также на саму способность к их усвоению посредством регуляции проницаемости мукозального барьера кишечника [8, 14].

Для оценки микробиома рекомендуется использовать настолько большое число разнообразных методов, насколько это представляется возможным для создания интегральной модели, в которой каждый показатель имеет вес. Тем не менее центральное место в исследованиях такого рода всегда занимают данные о последовательностях ДНК микроорганизмов, поскольку именно по ним

проще охарактеризовать состояние микробного сообщества на уровне представленности отдельных таксонов. В то же время доля представленности каждого конкретного таксона представляет собой интерес не только для определения экологических характеристик микробиома. Современное положение дел в отрасли метагеномных исследований таково, что за каждым известным таксоном, как правило, закрепляется какой-либо метаболический профиль, который представляет собой совокупность информации о метаболических путях таксонов, полученной как прямо, на основании результатов мультимиксных исследований, так и косвенно, путем интерполяции таких результатов для филогенетически близких таксонов. Эти данные можно использовать для реконструкции той части метаболического профиля всего микробиома, в которые данный таксон вносит свой вклад, неизбежно растущий по мере увеличения его представленности в таком микробиоме и наоборот [15]. Таким образом, целью настоящей работы стал скрининг прогнозируемой представленности путей биосинтеза витаминов и КЦЖК на основании данных метагеномного секвенирования микробиоты больных с такими фенотипами ожирения, как МЗО и МНЗО.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено одномоментное исследование в период 2018–2022 гг. на базе ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, ООО “Центр молекулярного здоровья” и ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, в которое были включены 263 участника. Критериями включения в исследование были: возраст старше 18 лет, отсутствие приема антибиотиков, пробиотических и пребиотических препаратов в течение 6 мес до включения в исследование и подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения участников из исследования были: тяжелые соматические заболевания (хроническая почечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность), заболевания желудочно-кишечного тракта, алкоголизм, беременность, депрессия, а также любое заболевание в острой форме.

Все участники исследования были разделены на две исследуемые группы. Группа 1 ($n = 130$, контрольная группа) была сформирована из здоровых доноров с индексом массы тела (ИМТ) от 18.5 до 24.9 кг/м², без признаков метаболических нарушений и артериальной гипертензии. Группу 2 составили пациенты с ожирением ($n = 133$), имеющие ИМТ более 30 кг/м² и окружность талии более 102 см у мужчин и более 88 см у женщин. Пациенты группы 2 были разделены в зависимости от метаболического фенотипа ожирения в соответствии с

критериями NCEP-АТР III на подгруппы с метаболически здоровым ожирением (МЗО) и с метаболически нездоровым ожирением (МНЗО) [16]. Ожирение считалось метаболически нездоровым, если для пациента были характерны два и более критериев: 1) триглицериды сыворотки (≥ 1.7 ммоль/л); 2) холестерол ЛПВП ($\sigma < 1.03$ ммоль/л; $\varphi < 1.29$ ммоль/л); 3) артериальное давление ($\text{sys} \geq 130$ мм рт.ст.; $\text{dia} \geq 85$ мм рт.ст.); 4) глюкоза натощак (≥ 16.1 ммоль/л). В подгруппу пациентов с МЗО вошли 38 человек, тогда как подгруппу с МНЗО составили 55 пациентов. Для 40 пациентов не было получено убедительных данных для включения их в одну из подгрупп, поэтому их результаты не были включены в анализ метаболических возможностей кишечной микробиоты при различных метаболических фенотипах ожирения. Сбор образцов фекалий участников всех обследуемых групп проводился согласно справочному пособию под редакцией В.В. Меньшикова [17]. С целью минимизации влияния климатических условий, характера питания и этнических факторов на кишечный микробиом, в исследование были включены пациенты, проживающие на одной территории (Ростовская область и г. Ростов-на-Дону) в летнее-осенний период. Доставленные в медицинское учреждение образцы фекалий были помещены в морозильную камеру для длительного хранения. Длительное (до 30 сут) хранение осуществлялось при температуре не выше -18°C для транспортировки образцов в лабораторию. Из образцов фекалий проводили выделение бактериальной ДНК с использованием наборов QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Полученную бактериальную ДНК амплифицировали с использованием праймеров, специфичных к варибельному участку v3–v4 гена 16S рНК. После очистки смеси парамагнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter, США) ПЦР-продукты индексировали с помощью использования индекс-праймеров Nextera XT Index Kit (Illumina, Inc., США). Повторно выполняли очистку смеси парамагнитными частицами и сформированные библиотеки секвенировали на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США) согласно протоколу производителя. Полученные риды были проанализированы программой QIIME2 v.2020.8 [18] с использованием референсной базы данных последовательностей генов рНК SILVA v.138 [19] с порогом кластеризации близких последовательностей 97%. Для предсказания метаболических возможностей кишечной микробиоты был использован PICRUSt2 [15], позволивший оценить представленность генов ферментов и метаболических путей, нормализованную на количество копий ридов 16S рНК. Для адекватного сравнения метаболических возможностей кишечной микробиоты у исследуемых групп пациентов был использован внутренний контроль, величина представленности фермента EC: 2.7.7.7 ДНК-полимеразы, позволив-

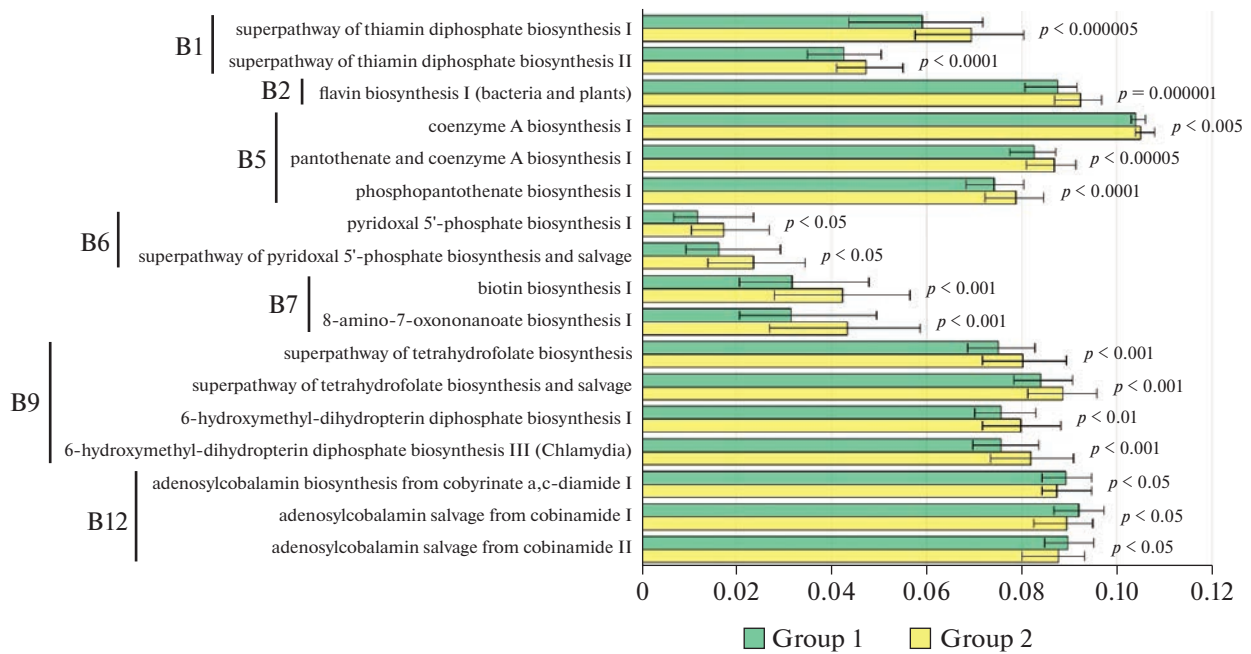


Рис. 1. Изменения прогнозируемой представленности путей синтеза водорастворимых витаминов кишечной микробиоты при ожирении. *Примечание:* здесь и далее, столбцы диаграмм построены на основании медиан, а “усы” указывают на 25 и 75 перцентили.

ший унифицировать полученные результаты. Подобный выбор был обусловлен несколькими причинами. Во-первых, предсказание наличия данного фермента было характерно для кишечной микробиоты каждого участника исследования. Во-вторых, величина представленности ДНК-полимеразы была значительно выше представленности других ферментов. Кроме того, все микроорганизмы экспрессируют ДНК-полимеразу как основной фермент репликации ДНК. Таким образом, при сравнении метаболических возможностей были использованы значения отношений представленности отдельных метаболических путей к представленности ДНК-полимеразы, рассчитанные для каждого пациента.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения MedCalc v. 20.210 (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Ввиду преобладания ненормального распределения данные были представлены в качестве медианы [25 перцентиль – 75 перцентиль]. В сравнительный анализ были включены метаболические пути, характерные для 25 и более процентов пациентов, хотя бы одной из групп. Сравнительный анализ проводили с использованием непараметрического критерия Крускала–Уоллиса. Кроме того, в случае необходимости сравнения частоты представленности метаболических путей использовался Хи-квадрат анализ.

Выявленные различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ прогнозируемой представленности метаболических путей синтеза водорастворимых витаминов выявил ряд изменений в микробиоме у больных с ожирением (рис. 1). У пациентов Группы 2 наблюдалось увеличение представленности путей синтеза и/или сохранения витаминов B1, B2, B5, B6, B7 и B9, а также их активных форм. Кроме того, при ожирении наблюдалось увеличение представленности ферментов минорного пути синтеза активной формы B3 – биосинтеза NAD II (из триптофана) (0.0 [0.0–0.00006] против 0.0 [0.000–0.000007] у Группы 1, $p < 0.05$). Следует отметить, что подобные различия были связаны с большей частотой представленности данного метаболического пути в кишечном микробиоме Группы 2 – 42.9%, тогда как в Группе 1 такая частота составила только 26.2% ($p < 0.005$).

Вместе с тем для пациентов Группы 2 было отмечено угнетение основных путей синтеза B12 (рис. 1). При этом следует отметить, что при ожирении наблюдалось усиление минорных путей синтеза B12 и его активных форм: биосинтеза аденозилкобаламина II (позднее включение кобальта) (0.0 [0.0–0.00008] против 0.0 [0.0–0.00003] у Группы 1, $p < 0.01$) и биосинтеза а,с-диамида коб(II)ирината II (позднее включение кобальта)

(0.0 [0.0–0.00005] против 0.0 [0.0–0.00002] у Группы 1, $p < 0.01$). Эти отличия также были обусловлены большей частотой представленности данных метаболических путей у пациентов Группы 2 – 42.1% против 26.9% у Группы 1 ($p < 0.05$). Таким образом, в микробном сообществе кишечника происходит не только снижение синтеза собственного витамина В12, но и повышение использования пищевого. То есть микробиота вступает в потенциальную конкуренцию за витамин В12 с макроорганизмом. Такой переход от одного метаболического профиля микробиоты к другому следует объяснить как смещение ее видового баланса с условно нормальными уровнями представленности активных продуцентов витамина В12 в сторону, где преобладает микрофлора, синтезирующая его в меньших количествах, либо вообще поглощающая его из пищи. Это может объяснить неоднократно описываемый дефицит данного витамина, наблюдаемый при ожирении [8]. Также имеются данные, что уровень витамина В12 в сыворотке крови повышается при снижении веса, на фоне низкокалорийной диеты [20].

В то же время обнаружилась связь между такими изменениями метаболического профиля микробиоты с метаболическим фенотипом ожирения (рис. 2). МЗО приводило к развитию дисбаланса в синтезе и сохранении витамина В1: на фоне снижения метаболических способностей сохранения тиаминина II и синтеза тиазола (*E. coli*) у таких пациентов наблюдалось увеличение представленности суперпутей синтеза тиаминдифосфата I и II. МНЗО сопровождалось более выраженными изменениями путей синтеза витаминов. Для таких пациентов были характерны большие метаболические возможности кишечной микробиоты к образованию витаминов В1, В2, В5, В6, В7 и В9. Также и снижение возможности синтеза В12 наблюдалось только при МНЗО, что согласуется с данными других авторов и может объяснить предиктивную значимость гиповитаминоза В12 в развитии СДII [21].

При анализе влияния ожирения на метаболические возможности синтеза жирорастворимых витаминов мы обнаружили у Группы 2 увеличение представленности ферментов путей биосинтеза витамина К (рис. 3). При этом ожирение не затронуло метаболический потенциал микробиоты продуцировать другие жирорастворимые витамины: А, D и Е.

В отличие от путей синтеза водорастворимых витаминов, увеличение представленности путей синтеза витамина К было характерно как для пациентов с МНЗО, так и для лиц с МЗО (рис. 4).

Таким образом, в целом микробиота больных с ожирением обладает потенциально значительно большими возможностями витамин-синтетических процессов и снабжением организма витаминами, а соответственно и активацией анаболических процессов, в том числе липогенеза и адипогенеза.

Большой интерес представляют пути образования КЦЖК, так как последние являются не только основным энергетическим субстратом для колоноцитов и регулятором проницаемости мукозального барьера кишечника, но и энергетическим субстратом для клеток печени, миокарда и других тканей [13]. Основными КЦЖК являются ацетат (С2), пропионат (С3) и бутират (С4) [14]. Для пациентов с ожирением был характерен ряд изменений в метаболических возможностях синтеза КЦЖК (рис. 5). По данным проведенного исследования, у пациентов с ожирением отмечалось перераспределение в метаболическом профиле микробиоты путей биосинтеза ацетата из пирувата к альтернативным путям производства С2 в цикле трикарбоновых кислот VII. Также наблюдался дисбаланс в путях образования бутирата: на фоне снижения производства С4 из ацетил-КоА у пациентов с ожирением была отмечена большая представленность ферментов образования бутирата из пирувата и деградации 4-аминобутирата. Кроме того, ожирение сопровождалось увеличением метаболических возможностей образования пропионата.

Разделение пациентов Группы 1 по метаболическому фенотипу позволило выявить, что изменения в прогностической представленности путей синтеза ацетата, пропионата и бутирата характерны только для пациентов с МНЗО, но не для лиц с МЗО (рис. 6).

Таким образом, микробиом больных с ожирением, особенно с МНЗО, характеризуется дисбалансом в метаболизме короткоцепочечных жирных кислот, что может отражаться на состоянии мукозального барьера кишечника.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время возник растущий интерес к роли витаминов в контексте ожирения, поскольку многие исследования показали, что ожирение и ассоциированные с ним метаболические нарушения связаны с дефицитом или неоптимальными концентрациями ряда витаминов в сыворотке крови [22]. Кишечная микрофлора представляет собой “метаболический орган”, одной из функций которого в рамках мутуалистических отношений с организмом человека является синтез витаминов.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о росте представленности путей биосинтеза витаминов В1, В2, В5, В6, В7, фолиевой кислоты и снижении – витамина В12 в метаболических профилях микробиоты пациентов, страдающих ожирением, причем с более ярко выраженным характером для фенотипа МНЗО. Ранее Duan и соавт. выявили большую представленность в микробиоме кишечника путей синтеза фолиевой кислоты, В2, В5 и В6 у больных с ожирением [6], однако полученные нами данные свидетельствуют

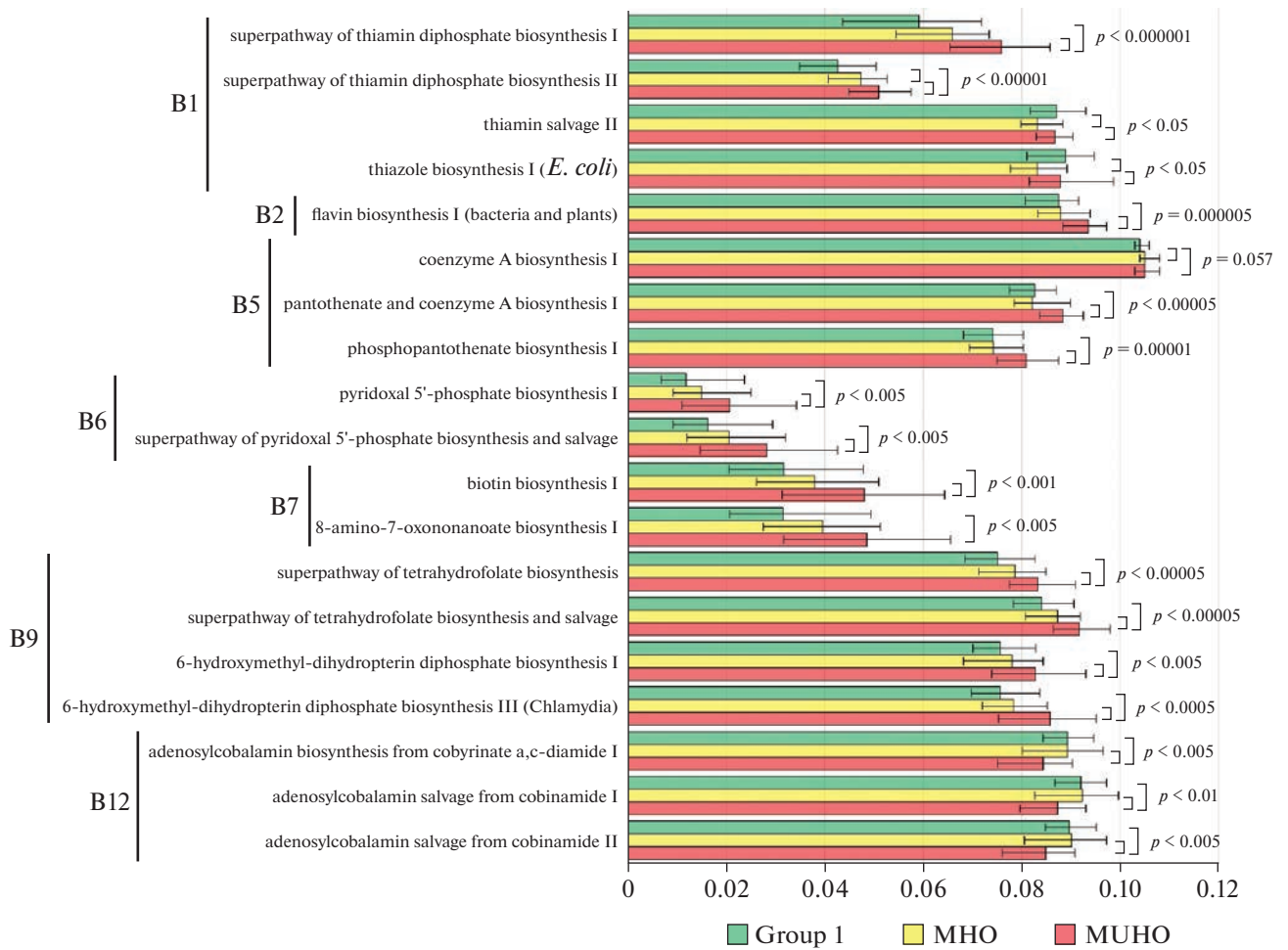


Рис. 2. Изменения прогнозируемой представленности путей синтеза водорастворимых витаминов кишечной микробиоты у пациентов с МЗО и МНЗО.

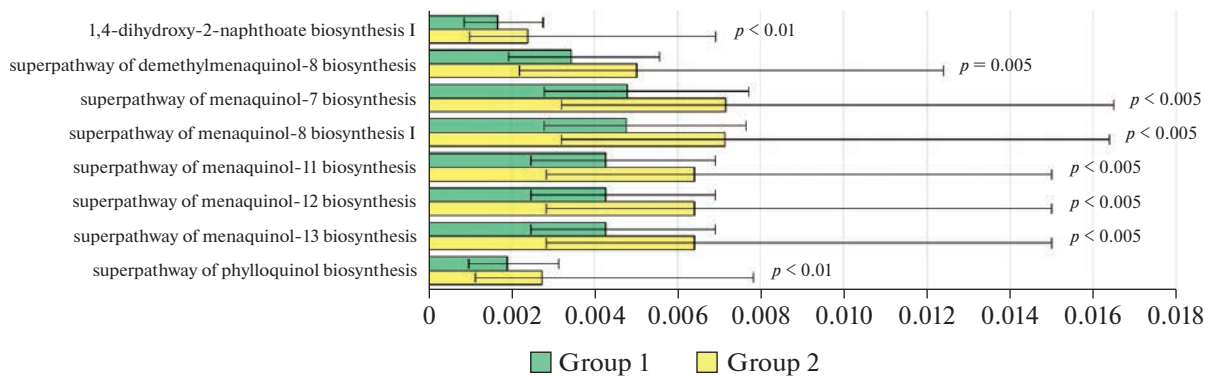


Рис. 3. Изменения прогнозируемой представленности путей синтеза витамина К кишечной микробиоты при ожирении.

о более широком спектре изменений в синтезе витаминов. Также наши результаты частично согласуются с результатами сравнения метаболических путей у больных с МНЗО и МЗО, проведенного коллегами из Южной Кореи (Kim и соавт.), кото-

рые выявили увеличение представленности путей синтеза витамина В1 и фолиевой кислоты [23]. Мы обнаружили, что МНЗО приводит также к увеличению представленности путей синтеза витаминов В2, В5, В6, и В7, но, что важно, снижению возмож-

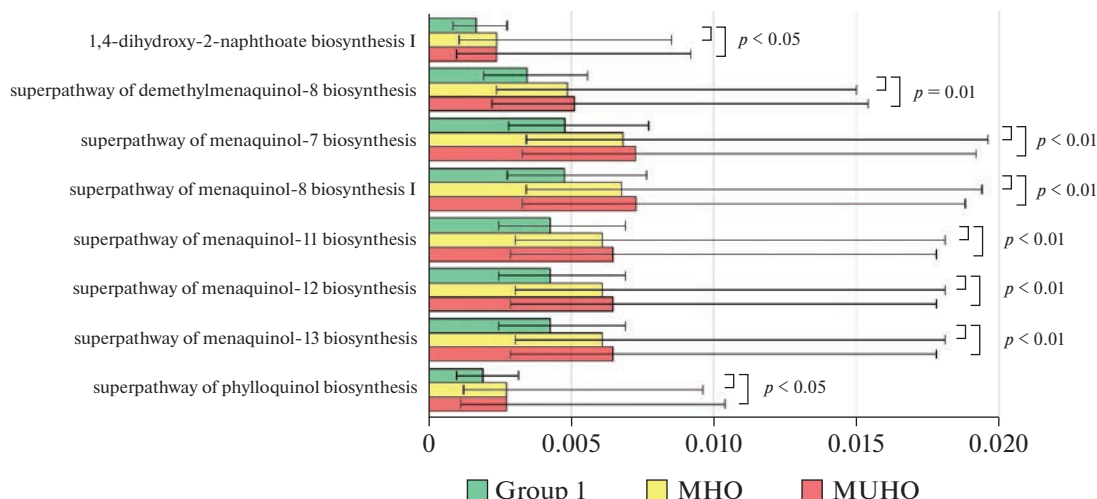


Рис. 4. Изменения прогнозируемой представленности путей синтеза витамина К кишечной микробиоты у пациентов с МЗО и МНЗО.

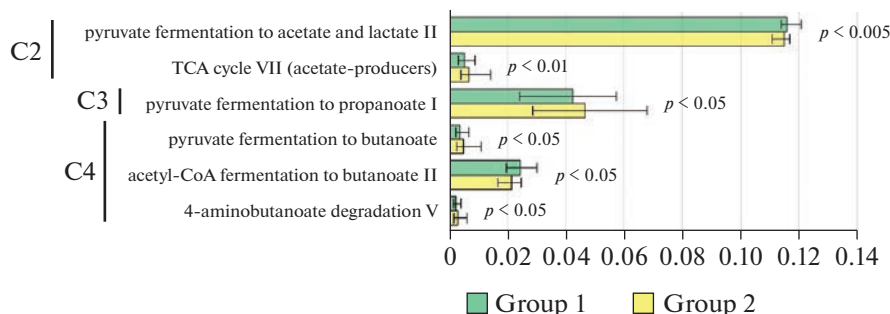


Рис. 5. Изменения прогнозируемой представленности путей синтеза КЦЖК кишечной микробиоты при ожирении.

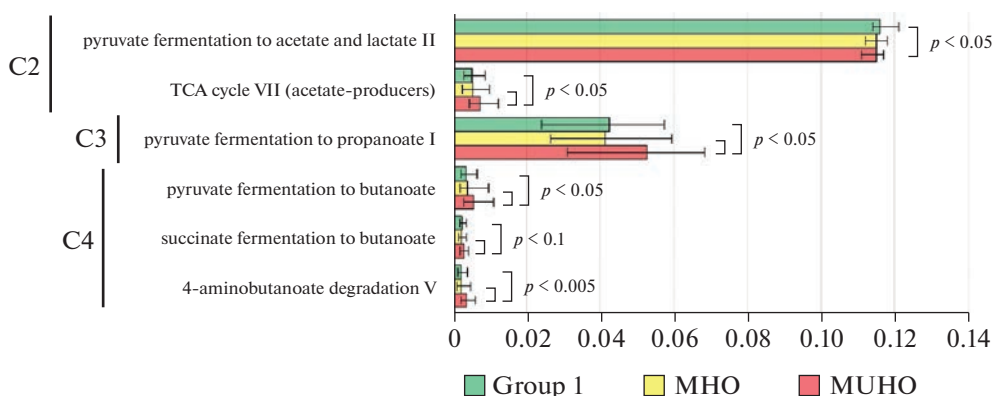


Рис. 6. Изменения прогнозируемой представленности путей синтеза КЦЖК кишечной микробиоты у пациентов с МЗО и МНЗО.

ности синтеза витамина В12, при этом подобные изменения не были характерны для МЗО.

Интересно, что МНЗО сопровождается уменьшением разнообразия кишечной флоры, тогда как при МЗО, напротив, наблюдается увеличение ее разнообразия [7]. Однако снижение разнообразия

микробиома кишечника при МНЗО тем не менее способствует сохранению таксонов-продуцентов В1, В2, В5, В6, В7 и В9, что может указывать на большую потребность микробного сообщества и/или макроорганизма в этих витаминах. Кроме того, мы выявили у пациентов с ожирением увели-

чение представленности минорного пути синтеза активной формы витамина В3, для которого была показана прямая корреляция с характеристиками альфа-разнообразия [24].

Тиамин (В1) является важным участником энергетического обмена (окислительное декарбоксилирование пирувата, цикл трикарбоновых кислот), а также необходим для образования рибозы-5-фосфата в пентозофосфатном пути и, как следствие, для синтеза нуклеотидов ДНК и РНК [25]. Дефицит тиамина достаточно распространен у людей с ожирением, что, с одной стороны, может быть результатом недостаточного потребления цельно-зерновых продуктов – источников В1, а с другой стороны, следствием повышенной потребности в этом витамине при ожирении [26]. Более того, сообщалось, что до 75% пациентов с СДII типа имеют низкую концентрацию витамина В1 в сыворотке [27]. Таким образом, увеличение метаболических возможностей синтеза В1 на фоне МНЗО можно рассматривать как адаптивное изменение кишечной микробиоты у таких пациентов, имеющее в целом позитивный характер, и направленное на восполнение дефицита данного витамина в системе “микробиота-макроорганизм”.

Рибофлавин (В2) – предшественник коферментов оксидоредуктаз играет значительную роль в энергетическом обмене. Обычно ожирение не связывают с дефицитом рибофлавина, однако было показано, что активность глутатион редуктазы эритроцитов (один из способов оценки недостатка В2) отрицательно коррелирует с уровнями систолического артериального давления, общего холестерина и холестерина ЛПВП, повышенные значения которых являются признаками МНЗО [22]. Кроме того, В2 способен снижать продукцию провоспалительных цитокинов в культуре мышечных адипоцитов и макрофагов [28]. Учитывая, что для МНЗО характерно развитие дислипидемии и более выраженное системное воспаление, чем у МЗО [29], большой потенциал к синтезу рибофлавина представляется позитивным изменением со стороны кишечной микробиоты и, возможно, является одним из механизмов противовоспалительного ответа в компенсации вялотекущего системного воспаления в системе “микробиота-макроорганизм”.

Витамин В5 (пантотеновая кислота) является неотъемлемым участником обмена жирных кислот, участвуя как в их синтезе и депонировании, так и окислении [30]. Учитывая влияние на систему “макроорганизм-микробиота” жировой диеты, обычно характерной для пациентов с ожирением, увеличение потребности микробиоты в этом витамине становятся понятным. Производные В5 стимулируют катаболизм жирных кислот и проявляют гипогликемический эффект [31], кроме того, пантотенат усиливает экспрессию термогенина в бурой жировой ткани, что способствует расходу

энергии [32]. Такие эффекты производных пантотеновой кислоты делают ее потенциально полезной в терапии ожирения.

Основной биохимической функцией пиридоксина (В6) является участие в обмене аминокислот, включая синтез заменимых аминокислот и нейромедиаторов [30]. Обычно у лиц с ожирением наблюдается нормальный уровень сывороточного В6, однако при тяжелом ожирении были выявлены дефицит пиридоксина и его отрицательная корреляция с ИМТ [22]. Прием пиридоксина женщинами с ожирением привел к снижению уровней инсулина, общего холестерина, холестерина ЛПНП, триглицеридов сыворотки и увеличению концентрации адипонектина, что указывает на улучшение метаболического профиля пациентов [33]. Неизвестно, способно ли увеличение метаболических возможностей синтеза В6 микрофлорой на фоне МНЗО оказывать положительный эффект на метаболический профиль таких пациентов, однако подобные изменения не являются потенциально неблагоприятными.

Биотин (В7) представляет собой кофермент ряда карбоксилаз, играющих значительную роль как в катаболизме, так и анаболизме человека и микробиоты [34]. Кроме того, биотин необходим для биотинилирования гистонов, что регулирует экспрессию генов [35]. Было показано, что тяжелое ожирение сопровождается снижением уровня биотина в сыворотке, а также отрицательной корреляцией между ИМТ и экспрессией биотин-зависимых карбоксилаз в жировой ткани [36]. Исследования Velda и соавт. [36] также продемонстрировали снижение абсолютного количества продуцентов биотина в микробиоме лиц с тяжелым ожирением, что на первый взгляд противоречит полученным нами данным. Подобные различия могут быть следствием разницы методических подходов: наше исследование базировалось на изучении относительной представленности метаболического пути по отношению к ЕС: 2.7.7.7 ДНК-полимеразе, т.е. доли таксономических единиц в микробиоме, обладающих конкретными метаболическими путями, тогда как работа Velda и соавт. [36] исследовала абсолютные количества, когда количество клеток было преобразовано в микробную нагрузку на грамм биоматериала. А учитывая общее истощение кишечной флоры при ожирении, можно заключить, что несмотря на абсолютное снижение биотин-продуцирующих микроорганизмов при ожирении, их доля в микробном сообществе возрастает. Возможно, именно способность этих микроорганизмов к синтезу В7 дает им метаболическое преимущество перед другими представителями микробного сообщества в специфических условиях, создаваемых при МНЗО.

Производные фолиевой кислоты (В9) вовлечены в перенос одноуглеродных фрагментов, что

имеет особое значение в метаболизме гомоцистеина и синтезе нуклеотидов [37]. У лиц с ожирением обычно наблюдаются нормальные или сниженные уровни фолатов в сыворотке, что может быть следствием их повышенного использования, избыточной экскрецией с мочой, изменением распределения по органам и тканям, а также недостаточного употребления растительной пищи [32, 38]. Недостаток В9 сопровождается развитием гипергомоцистеинемии, что повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, риск которых значительно выше у пациентов с МНЗО [5, 22]. Если предположить недостаток потребления растительной пищи или усиленное всасывание фолатов макроорганизмом, как компенсация их дефицита, выявленное нами увеличение прогнозируемой представленности путей синтеза В9 у микрофлоры пациентов с МНЗО может носить адаптационный характер.

У человека кобаламин (В12) участвует в процессе образования метионина из гомоцистеина (наравне с В9) и изомеризации метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА при деградации жирных кислот с нечетным количеством углеродных атомов [39]. Уровень витамина В12 связан с ожирением, и имеются данные о наличии негативной связи между ИМТ и концентрацией кобаламина в сыворотке [3, 21]. Более того, некоторые авторы обнаружили тенденцию к снижению концентрации витамина В12 в сыворотке крови у пациентов с МНЗО по сравнению с МЗО [8]. Было показано, что дефицит кобаламина ассоциирован с гипергомоцистеинемией, инсулинорезистентностью, дислипидемией и повышением риска сердечно-сосудистых заболеваний, которые в большей степени характерны для пациентов с МНЗО [3, 40]. Кроме того, накопление метилмалонил-КоА блокирует карнитин-зависимый транспорт жирных кислот в митохондрию для их последующего окисления, тем самым способствуя депонированию жиров [40]. Обнаруженный нами меньший потенциал к образованию В12 у кишечной микрофлоры пациентов с МНЗО может вносить свой вклад в прогрессирование метаболических нарушений у таких пациентов. Однако следует учитывать, что место всасывания кобаламина (подвздошная кишка) значительно удалено от основного места обитания кишечной флоры (толстый кишечник), что ограничивает биодоступность бактериального В12 [39]. В то же время данное обстоятельство может нивелироваться, так как тонкая кишка обладает своим микробным сообществом, а при ожирении частым является развитие феномена “избыточного бактериального роста” и заселение тонкой кишки представителями микрофлоры толстой кишки [41]. Интересным представляются последствия снижения возможности синтезировать В12 для самой кишечной микрофлоры. Было показано, что прием В12 положительно ассоциирован с альфа-разнообразием и обилием ки-

шечной микрофлоры [39]. Таким образом, можно предполагать, что меньшая способность синтезировать кобаламин у кишечной микрофлоры при МНЗО может быть одной из причин ее деградации и истощения, отмеченного нами ранее у таких пациентов [7].

Хорошо известной функцией витамина К (филлохинон, менахиноны) является участие в синтезе белков системы свертывания крови и костной ткани. Также он играет роль в таких процессах, как пролиферация и дифференцировка клеток, иммунный ответ, воспаление, окислительный стресс и ряде других [42]. Обычно ожирение не ассоциируют с изменением концентрации витамина К, однако известно, что низкий ИМТ может быть связан с высоким потреблением этого витамина ввиду большего употребления зеленых овощей – основных источников филлохинона [22]. Следует отметить, что филлохинон и менахиноны являются важной частью энергетического обмена микрофлоры, принимая участие в бактериальном дыхании [43]. Интересно, что увеличение метаболических возможностей микрофлоры синтезировать витамин К было характерно как для пациентов с МНЗО, так и для лиц с МЗО. С одной стороны, это может быть следствием несбалансированного питания, в частности недостатка зеленых овощей в рационе пациентов с ожирением, вследствие чего у микробиоме активируется пролиферация таксонов, способных к синтезу витамина К, т.е. имеющие метаболические преимущества. С другой стороны, гиперкалорийная диета, характерная для лиц, страдающих ожирением, предоставляет больше энергетических субстратов микрофлоре, которой требуется больше витамина К для ее катаболизма, что также может способствовать увеличению в микробиоме филлохинон и менахинон-продуцентов. Не известно, дает ли какие-то преимущества повышенная продукция кишечным микробиомом витамина К макроорганизму. Например, Liu и соавт. [44] не обнаружили какой-либо связи между интенсивностью синтеза витамина К микробиомом и клинической картиной остеоартрита, несмотря на имеющиеся данные, о способствовании дефицита витамина К развитию и/или прогрессированию данной патологии.

Таким образом, изменение метаболических возможностей синтеза витаминов кишечной флорой при ожирении, по-видимому, является результатом “селекции” таксонов под действием факторов, специфичных для данной патологии. Увеличение прогнозируемой представленности синтеза витаминов В1, В2, В5, В6, В7, В9 и витамина К у пациентов с МНЗО и витамина К у лиц с МЗО на основании имеющихся литературных данных можно рассматривать как нейтральное или позитивное для макроорганизма. Тогда как депрессия путей синтеза В12 при МНЗО может иметь негативный

характер как для микробного сообщества кишечника, так и для организма-хозяина.

На сегодняшний день не существует единой гипотезы, способной полностью охватить взаимосвязь между составом микробного сообщества, количеством и соотношением КЦЖК и их ролью в патогенезе ожирения и сопутствующих метаболических нарушениях [14]. КЦЖК являются значимым энергетическим субстратом и представляют собой важный медиатор в системе “микробиота-макроорганизм” [45–47]. КЦЖК проявляют противовоспалительное действие, снижая экспрессию TNF α , IL6 и IL12 и повышая – IL10, а также индуцируют образование белков плотных контактов, что уменьшает кишечную проницаемость [47, 48]. Кроме того, КЦЖК выступают в качестве медиаторов в оси “микробиота–кишечник–мозг”, которые, стимулируя экспрессию анорексигенных белков (лептин, глюкагоноподобный пептид I типа, пептид YY), подавляют аппетит [47]. Было показано, что у лиц с ожирением в кале возрастают концентрации ацетата, пропионата и бутирата [14, 49]. Возможно, это связано с тем, что микробный дисбаланс при ожирении приводит к менее эффективному всасыванию КЦЖК или же микробиота кишечника при ожирении обладает повышенной способностью к продукции КЦЖК [50].

Изменения метаболических возможностей образования КЦЖК были характерны исключительно для пациентов с МНЗО, но не для МЗО. Микробиота пациентов с МНЗО в меньшей степени была способна продуцировать ацетат из пирувата, что, по-видимому, компенсируется большей возможностью синтезировать эту КЦЖК из этанола, о чем свидетельствует высокая представленность цикла трикарбоновых кислот VII (ацетат-продуценты). Следует отметить, что оценка метаболической возможности микробиоты синтезировать ацетат представляет значительные сложности, так как уксусная кислота является интермедиатом или продуктом деградации большинства субстратов, включая углеводы, жирные кислоты, аминокислоты и т.д. Однако полученные данные указывают, что пируват у пациентов с МНЗО меньше используется кишечной микробиотой для синтеза ацетата и больше – для образования пропионата и бутирата. Кроме того, кишечный микробиом таких пациентов обладал большими метаболическими возможностями продуцировать бутират из сукцината и при катаболизме 4-аминобутаноата. Sanna и соавт. [51] обнаружили, что представленность пути деградации 4-аминобутаноата (метаболический путь PWY-5022) в кишечном микробиоме позитивно ассоциирована с повышенной секрецией инсулина, измеренной в тесте толерантности к глюкозе, при этом генетическая предрасположенность к большей продукции пропионата была связана с повышенным риском развития СДII. Таким образом, можно рассматривать увеличение синтеза бутирата

кишечной флорой как позитивное изменение, а избыточное производство пропионата – как негативное. При этом надо учитывать, что избыточное накопление бутирата может оказать и негативный эффект на слизистую толстой кишки, индуцируя апоптоз стволовых клеток кишечника [52, 53], и на костную ткань, подавляя остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток [54]. Регуляция последней при МНЗО претерпевает некоторые изменения, о чем свидетельствует появление положительной ассоциации между остеокином и миостатином, характерной только для такого фенотипа ожирения [55].

Взаимодействие между микробиомом и иммунной системой не является односторонним, и как микробиота способствует формированию периферической толерантности (например, благодаря продукции КЦЖК), так и мукозальный иммунитет осуществляет надзор за микробиотой, в т.ч. регулирует ее численность [56]. Одним из ключевых различий между метаболическими фенотипами ожирения является формирование системного воспаления, характерного для пациентов с МНЗО, но не с МЗО [29]. Возможно, активация иммунной системы у пациентов с МНЗО затрагивает и кишечник, что может быть одной из причин истощения кишечной микробиоты у таких пациентов. Таким образом, накопление в кишечном микробиоме таксонов, способных к продукции КЦЖК, можно рассматривать как результат “селекции” микроорганизмов и защитную реакцию микробного сообщества на активацию иммунной системы. При этом последствия такой трансформации микрофлоры для макроорганизма представляются неоднозначными, что требует дальнейшего динамического изучения.

ВЫВОДЫ

Ожирение оказывает влияние на метаболические возможности микробиоты синтезировать витамины и короткоцепочечные жирные кислоты, которое наиболее выражено при метаболически нездоровом ожирении. Вне зависимости от метаболического фенотипа ожирение сопровождается большей продукцией витамина К кишечной микробиотой. У микробиота пациентов с МНЗО также обладает большей представленностью путей синтеза витаминов B1, B2, B5, B6, B7 и B9, что может давать метаболические преимущества как микробному сообществу, так и макроорганизму. При этом у таких пациентов прогнозируется снижение синтеза витамина B12, что может рассматриваться как неблагоприятный фактор, как для микробиоты, так и для организма-хозяина.

Изменения в прогнозируемой представленности путей синтеза ацетата и увеличение метаболических возможностей продукции пропионата и бутирата наблюдались только у пациентов с МНЗО,

но не с МЗО. Учитывая неоднозначное потенциальное влияние КЦЖК на макроорганизм необходимы дальнейшие исследования для оценки побочных изменений.

В целом изменение представленности метаболитических путей у кишечной микрофлоры на фоне ожирения является результатом “селекции” микроорганизмов под действием специфических факторов, более выраженных при МНЗО. Таким образом, дисбаланс в путях синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот кишечной флоры отражает нарушение метаболитического симбиоза в рамках суперорганизма (“микробиота-макроорганизм”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение научно-исследовательской работы одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 186 от 26.06.2019) и ЛНЭК ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках договора № 397 от 03.09.2020 с ФГБУ “НМИЦ онкологии” Минздрава России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы – А.В.Ш., С.А.Р., Ю.Л.Н., Н.И.В.; планирование эксперимента – А.В.Ш., Н.И.В., Л.А.Г., О.В.Б., Т.В.Г.; сбор данных – Л.А.Г., О.В.Б., Ю.Л.Н., И.Ю.В.; обработка данных – Л.А.Г., И.Ю.В., И.М.К., Т.В.Г.; написание манускрипта – А.В.Ш., Л.А.Г., И.М.К., О.В.Б.; редактирование манускрипта – С.А.Р., Ю.Л.Н., А.В.Ш., И.М.К., Н.И.В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Piché ME, Tchernof A, Després JP* (2020) Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res* 126: 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>

2. *Lin X, Li H* (2021) Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.706978>
3. *Boachie J, Adaikalakoteswari A, Samavat J, Saravanan P* (2020) Low Vitamin B12 and Lipid Metabolism: Evidence from Pre-Clinical and Clinical Studies. *Nutrients* 12: 1–20. <https://doi.org/10.3390/NU12071925>
4. *Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG* (2016) Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J Obes* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7353642>
5. *Stefan N* (2020) Metabolically Healthy and Unhealthy Normal Weight and Obesity. *Endocrinol Metab (Seoul)* 35: 487–493. <https://doi.org/10.3803/ENM.2020.301>
6. *Duan M, Wang Y, Zhang Q, Zou R, Guo M, Zheng H* (2021) Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PLoS One* 16. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0255446>
7. *Гапонов АМ, Волкова НИ, Ганенко ЛА, Набока ЮЛ, Маркелова МИ, Сиягина МН, Харченко АМ, Хуснутдинова ДР, Румянцев СА, Тутельян АВ, Макаров ВВ, Юдин СМ, Шестопалов АВ* (2021) Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах (оригинальная статья). *Журн микробиол эпидемиол иммунобиол* 98: 144–155. [*Gaponov AM, Volkova NI, Ganenko LA, Naboka YuL, Markelova MI, Siniagina MN, Kharchenko AM, Khusnutdinova DR, Rumyantsev SA, Tutelyan AV, Makarov VV, Yudin SM, Shestopalov AV* (2021) Characteristics of the colonic microbiome in patients with different obesity phenotypes (the original article). *J Microbiol Epidemiol Immunobiol* 98 (2): 144–155. (In Russ)]. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-66>
8. *Voland L, Le Roy T, Debédat J, Clément K* (2022) Gut microbiota and vitamin status in persons with obesity: A key interplay. *Obes Rev* 23. <https://doi.org/10.1111/OBR.13377>
9. *Ciobârca D, Cătoi AF, Copăescu C, Miere D, Crișan G* (2020) Bariatric Surgery in Obesity: Effects on Gut Microbiota and Micronutrient Status. *Nutrients* 12. <https://doi.org/10.3390/NU12010235>
10. *Hooper LV, Midwedt T, Gordon JI* (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22: 283–307. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NU-TR.22.011602.092259>
11. *Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ* (2018) Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep* 7: 198–206. <https://doi.org/10.1007/S13668-018-0248-8>
12. *Zhou SS, Li D, Zhou YM, Sun WP, Liu QG* (2010) B-vitamin consumption and the prevalence of diabetes and obesity among the US adults: population based ecological study. *BMC Public Health* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-746>
13. *O’Riordan KJ, Collins MK, Moloney GM, Knox EG, Aburto MR, Fülling C, Morley SJ, Clarke G, Schellekens H, Cryan JF* (2022) Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. *Mol Cell Endo-*

- crinol 546.
<https://doi.org/10.1016/J.MCE.2022.111572>
14. *Martínez-Cuesta MC, del Campo R, Garriga-García M, Peláez C, Requena T* (2021) Taxonomic Characterization and Short-Chain Fatty Acids Production of the Obese Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 11.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.598093>
 15. *Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI* (2020) PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol* 38: 685–688.
<https://doi.org/10.1038/S41587-020-0548-6>
 16. *Osadnik K, Osadnik T, Gierlotka M, Windak A, Tomasik T, Mastej M, Kuras A, Józwiak K, Penson PE, Lip GYH, Mikhailidis DP, Toth PP, Catapano AL, Ray KK, Howard G, Tomaszewski M, Charchar FJ, Sattar N, Williams B, MacDonald TM, Banach M, Józwiak J, LIPIDOGRAM Investigators* (2023) Metabolic syndrome is associated with similar long-term prognosis in non-obese and obese patients. An analysis of 45 615 patients from the nationwide LIPIDOGRAM 2004-2015 cohort studies. *Eur J Prev Cardiol*.
<https://doi.org/10.1093/EURJPC/ZWAD101>
 17. *Меньшиков ВВ* (ред) (2009) Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие: в 3 т. Т. 3: Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний. М. Лабора. [*Menshikov VV* (ed) (2009) *Methods of clinical laboratory research: a reference guide: in 3 volumes. V. 3: Clinical microbiology. bacteriological research. Mycological research. parasitological research. Infectious immunodiagnosics. Molecular studies in the diagnosis of infectious diseases. M. Labora. (In Russ)]*.
 18. *Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang K Bin, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Lofffield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Tumbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG* (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37: 852–857.
<https://doi.org/10.1038/S41587-019-0209-9>
 19. *Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
 20. *Geiker NRW, Veller M, Kjoelbaek L, Jakobsen J, Ritz C, Raben A, Astrup A, Lorenzen JK, Larsen LH, Bügel S* (2018) Effect of low energy diet for eight weeks to adults with overweight or obesity on folate, retinol, vitamin B12, D and E status and the degree of inflammation: a post hoc analysis of a randomized intervention trial. *Nutr Metab (Lond)* 15.
<https://doi.org/10.1186/S12986-018-0263-1>
 21. *Baltaci D, Kutlucan A, Turker Y, Yilmaz A, Karacam S, Deler H, Ucgun T, Kara IH* (2013) Association of vitamin B12 with obesity, overweight, insulin resistance and metabolic syndrome, and body fat composition; primary care-based study. *Med Glas (Zenica)* 10: 203–210.
 22. *Thomas-Valdés S, Tostes M das GV, Anunciação PC, da Silva BP, Sant'Ana HMP* (2017) Association between vitamin deficiency and metabolic disorders related to obesity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57: 3332–3343.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1117413>
 23. *Kim MH, Yun KE, Kim J, Park E, Chang Y, Ryu S, Kim HL, Kim HN* (2020) Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Sci Rep* 10.
<https://doi.org/10.1038/S41598-020-76474-8>
 24. *Fangmann D, Theismann EM, Turk K, Schulte DM, Reling I, Hartmann K, Keppler JK, Knipp JR, Rehman A, Heinsen FA, Franke A, Lenk L, Freitag-Wolf S, Appel E, Gorb S, Brenner C, Seeger D, Waetzig GH, Rosenstiel P, Schreiber S, Schwarz K, Laudes M* (2018) Targeted Microbiome Intervention by Microencapsulated Delayed-Release Niacin Beneficially Affects Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes Care* 41: 398–405.
<https://doi.org/10.2337/DC17-1967>
 25. *Polegato BF, Pereira AG, Azevedo PS, Costa NA, Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF* (2019) Role of Thiamin in Health and Disease. *Nutr Clin Pract* 34: 558–564.
<https://doi.org/10.1002/NCP.10234>
 26. *Kerns JC, Arundel C, Chawla LS* (2015) Thiamin deficiency in people with obesity. *Adv Nutr* 6: 147–153.
<https://doi.org/10.3945/AN.114.007526>
 27. *Thornalley PJ, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, Ahmed A, Rayman G, Bodmer CW* (2007) High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia* 50: 2164–2170.
<https://doi.org/10.1007/S00125-007-0771-4>
 28. *Mazur-Bialy AI, Pocheć E* (2016) Riboflavin Reduces Pro-Inflammatory Activation of Adipocyte-Macrophage Co-culture. Potential Application of Vitamin B2 Enrichment for Attenuation of Insulin Resistance and Metabolic Syndrome Development. *Molecules* 21.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES21121724>
 29. *Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, Federici M, Menini S* (2019) Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism* 92: 51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>

30. *Chawla J, Kvarnberg D* (2014) Hydrosoluble vitamins. *Handb Clin Neurol* 120: 891–914. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00059-0>
31. *Naruta E, Buko V* (2001) Hypolipidemic effect of pantothenic acid derivatives in mice with hypothalamic obesity induced by aurothioglucose. *Exp Toxicol Pathol* 53: 393–398. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00205>
32. *Zhou H, Zhang H, Ye R, Yan C, Lin J, Huang Y, Jiang X, Yuan S, Chen L, Jiang R, Zheng K, Cheng Z, Zhang Z, Dong M, Jin W* (2022) Pantothenate protects against obesity via brown adipose tissue activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 323: E69–E79. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00293.2021>
33. *Haidari F, Mohammadshahi M, Zarei M, Haghhighizadeh MH, Mirzaee F* (2021) The Effect of Pyridoxine Hydrochloride Supplementation on Leptin, Adiponectin, Glycemic Indices, and Anthropometric Indices in Obese and Overweight Women. *Clin Nutr Res* 10: 230. <https://doi.org/10.7762/CNR.2021.10.3.230>
34. *Tong L* (2013) Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci* 70: 863–891. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1096-0>
35. *Filenko NA, Kolar C, West JT, Abbie Smith S, Hassan YI, Borgstahl GEO, Zemleni J, Lyubchenko YL* (2011) The role of histone H4 biotinylation in the structure of nucleosomes. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016299>
36. *Belda E, Voland L, Tremaroli V, Falony G, Adriouch S, Assmann KE, Prifiti E, Aron-Wisniewsky J, Debédat J, Le Roy T, Nielsen T, Amouyal C, André S, Andreelli F, Blüher M, Chakaroun R, Chilloux J, Coelho LP, Dao MC, Das P, Fellahi S, Forslund S, Galleron N, Hansen TH, Holmes B, Ji B, Krogh Pedersen H, Le P, Le Chatelier E, Lewinter C, Mannerås-Holm L, Marquet F, Myridakis A, Pelloux V, Pons N, Quinquis B, Rouault C, Roume H, Salem JE, Sokolovska N, Sondertoft NB, Touch S, Vieira-Silva S, Galan P, Holst J, Götze JP, Køber L, Vestergaard H, Hansen T, Herberg S, Oppert JM, Nielsen J, Letunic I, Dumas ME, Stumvoll M, Pedersen OB, Bork P, Ehrlich SD, Zucker JD, Bäckhed F, Raes J, Clément K* (2022) Impairment of gut microbial biotin metabolism and host biotin status in severe obesity: effect of biotin and prebiotic supplementation on improved metabolism. *Gut* 71. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2021-325753>
37. *Shulpekova Y, Nechaev V, Kardasheva S, Sedova A, Kurbatova A, Bueverova E, Kopylov A, Malsagova K, Dlamini JC, Ivashkin V* (2021) The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules* 26. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26123731>
38. *Köse S, Sözlü S, Bölükbaşı H, Ünsal N, Gezmen-Karadağ M* (2020) Obesity is associated with folate metabolism. *Int J Vitam Nutr Res* 90: 353–364. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/A000602>
39. *Guetterman HM, Huey SL, Knight R, Fox AM, Mehta S, Finkelstein JL* (2022) Vitamin B-12 and the Gastrointestinal Microbiome: A Systematic Review. *Advances in Nutrition* 13: 530. <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMAB123>
40. *Al-Musharaf S, Aljuraiban GS, Hussain SD, Alnaami AM, Saravanan P, Al-Daghri N* (2020) Low Serum Vitamin B12 Levels Are Associated with Adverse Lipid Profiles in Apparently Healthy Young Saudi Women. *Nutrients* 12: 1–11. <https://doi.org/10.3390/NU12082395>
41. *Roland BC, Lee D, Miller LS, Vegesna A, Yolken R, Severance E, Prandovszky E, Zheng XE, Mullin GE* (2018) Obesity increases the risk of small intestinal bacterial overgrowth (SIBO). *Neurogastroenterol Motil* 30. <https://doi.org/10.1111/NMO.13199>
42. *Lai Y, Masatoshi H, Ma Y, Guo Y, Zhang B* (2022) Role of Vitamin K in Intestinal Health. *Front Immunol* 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.791565>
43. *Ellis JL, Karl JP, Oliverio AM, Fu X, Soares JW, Wolfe BE, Hernandez CJ, Mason JB, Booth SL* (2021) Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes* 13: 1–16. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1887721>
44. *Liu M, Matuszek G, Azcarate-Peril MA, Loeser RF, Shea MK* (2023) An Exploratory Case-Control Study on the Associations of Bacterially-Derived Vitamin K Forms with the Intestinal Microbiome and Obesity-Related Osteoarthritis. *Curr Dev Nutr* 7: 100049. <https://doi.org/10.1016/J.CDNUT.2023.100049>
45. *Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L* (2014) The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol* 121: 91–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
46. *Brahe LK, Astrup A, Larsen LH* (2013) Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? *Obes Rev* 14: 950–959. <https://doi.org/10.1111/OBR.12068>
47. *Amabebe E, Robert FO, Agbalalah T, Orubu ESF* (2020) Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *Br J Nutr* 123: 1127–1137. <https://doi.org/10.1017/S0007114520000380>
48. *Beisner J, Filipe Rosa L, Kaden-Volynets V, Stolzer I, Günther C, Bischoff SC* (2021) Prebiotic Inulin and Sodium Butyrate Attenuate Obesity-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Induction of Antimicrobial Peptides. *Front Immunol* 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.678360>
49. *Yang J, Keshavarzian A, Rose DJ* (2013) Impact of dietary fiber fermentation from cereal grains on metabolite production by the fecal microbiota from normal weight and obese individuals. *J Med Food* 16: 862–867. <https://doi.org/10.1089/JMF.2012.0292>
50. *de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Álvarez-Quintero R, Velásquez-Mejía EP, Sierra JA, Corrales-Agudelo V, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS* (2018) Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/NU11010051>
51. *Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, Kurilshikov A, Vich Vila A, Võsa U, Mujagic Z, Masclee AAM, Jonkers DMAE, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Franke L, Zhernakova A, Fu J, Wijmenga C, McCarthy MI* (2019) Causal relationships between gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet* 51: 600. <https://doi.org/10.1038/S41588-019-0350-X>
52. *Kaiko GE, Ryu SH, Koues OI, Collins PL, Solnica-Krezel L, Pearce EJ, Pearce EL, Oltz EM, Stappenbeck TS*

- (2016) The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* 165: 1708–1720. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.05.018>
53. *Salvi PS, Cowles RA* (2021) Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells* 10. <https://doi.org/10.3390/CELLS10071775>
54. *Hou J, Xu J, Liu Y, Zhang H, Wang S, Jiao Y, Guo L, Li S* (2022) Sodium butyrate inhibits osteogenesis in human periodontal ligament stem cells by suppressing smad1 expression. *BMC Oral Health* 22. <https://doi.org/10.1186/S12903-022-02255-6>
55. *Шестопалов АВ, Ганенко ЛА, Григорьева ТВ, Лайков АВ, Васильев ИЮ, Колесникова ИМ, Набока ЮЛ, Волкова НИ, Румянцев СА* (2023) Адипокины и миокины как индикаторы фенотипов ожирения и их связь с показателями разнообразия микробиома кишечника. *Вестн Российск гос мед унив* 2023 (1): 49–58. [*Shestopalov AV, Ganenko LA, Grigoryeva TV, Laikov AV, Vasilyev IYu, Kolesnikova IM, Naboka Yu, Volkova NI, Roumiantsev SA* (2023) Adipokines and myokines as indicators of obese phenotypes and their association with the gut microbiome diversity indices. *Bull Russ State Med Univ* 2023 (1): 49–58. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2023.004>
56. *Shi N, Li N, Duan X, Niu H* (2017) Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res* 4. <https://doi.org/10.1186/S40779-017-0122-9>

PREDICTION OF VITAMINS AND SHORT-CHAIN FATTY ACIDS SYNTHESIS PATHWAYS IN OBESE ADULTS

A. V. Shestopalov^{a,b,c,d}, L. A. Ganenko^{e,#}, I. M. Kolesnikova^{a,b}, T. V. Grigoryeva^f, I. Yu. Vasilyev^f, Yu. L. Naboka^e, N. I. Volkova^e, O. V Borisenko^a, and S. A. Roumiantsev^{a,b,d}

^a*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^b*National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia*

^c*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia*

^d*Center for Molecular Health, Moscow, Russia*

^e*Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia*

^f*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

[#]*e-mail: ganenko.lilia@yandex.ru*

Gut microbiota and its metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs) and vitamins are involved in maintaining energy homeostasis, which is relevant in the context of obesity. The aim was to screen the predicted representation of vitamin and SCFAs biosynthesis pathways based in patients with metabolically healthy obesity (MHO) and metabolically unhealthy obesity (MUHO). The study included two groups: a control group ($n = 130$) and obese patients ($n = 133$), which was divided into subgroups with MHO ($n = 38$) and MUHO ($n = 55$). The predicted representation of metabolic pathways for the biosynthesis of vitamins and SCFAs in feces was studied using PICRUSt2. Obese patients had an increase in the representation of the synthesis of vitamins B1, B2, B5, B6, B7, B9 and vitamin K pathways, as well as a decrease in the pathways for the vitamin B12 synthesis. At the same time, the identified changes were determined by the metabolic phenotype of obesity. MHO was accompanied by an imbalance in the B1 synthesis pathways and an increased representation of vitamin K formation pathways. Whereas MUHO led to an increase in the ability of the gut microbiota to synthesize vitamins B1, B2, B5, B6, B7, B9 and K, as well as to inhibition of the B12-synthesizing pathways. In addition, patients with MUHO had an increase in the representation of the pathways for the SCFAs synthesis such as acetate, propionate, and butanoate, which was not observed in MHO patients. In general, the change in the metabolic pathways representation of gut microbiota in obese patients is the result of the microorganism's "selection" under the influence of specific factors, which are more pronounced in MUHO. Thus, the imbalance in the pathways for the vitamins and short-chain fatty acids biosynthesis of the gut microbiome reflects a violation of the metabolic symbiosis within the superorganism ("microbiota-macroorganism").

Keywords: gut microbiome, obesity, PICRUSt2, metabolically healthy obesity, metabolically unhealthy obesity, short-chain fatty acids, vitamins

ТРАНСГЕНЕРАЦИОННОЕ ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА ПАМЯТЬ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 2 В МОЗГЕ ПОТОМКОВ

© 2023 г. Н. Э. Ордян^{1,*}, Е. Д. Шигалугова¹, О. В. Малышева^{1,2},
С. Г. Пивина¹, В. К. Акулова¹, Г. И. Холова¹

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

²Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: neo@infran.ru

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Стрессорные воздействия на беременных матерей нарушают поведение и когнитивные функции у их потомков не только первого, но и последующих поколений. Сходное трансгенерационное влияние на фенотип потомков могут оказывать различные стрессорные факторы, действующие на отцов до зачатия. Цель исследования: выявление трансгенерационного эффекта стрессирования самок крыс с 15–19 день беременности на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) в мозге потомков мужского пола и их потомков самцов и самок, а также влияние дополнительного стрессирования в парадигме “стресс–рестресс” пренатально стрессированных самцов крыс до спаривания с интактными самками на память и экспрессию в мозге *Igf2* их потомков обоего пола. Мы показали, что пренатально стрессированные самцы и их потомки мужского пола демонстрируют улучшение памяти в тесте реакция пассивного избегания, повышение экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе. Самки – потомки пренатально стрессированных самцов, напротив, демонстрировали снижение длительности сохранения памяти и экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе. Дополнительное стрессирование пренатально стрессированных самцов до спаривания с интактными самками ухудшало память и длительность ее сохранения, снижало экспрессию *Igf2* в мозге потомков обоего пола. Сделано заключение, что трансгенерационные эффекты пренатального стресса на память и экспрессию *Igf2* в мозге зависят от пола потомков, а сам пренатальный стресс у самцов способствует ухудшению памяти и снижению экспрессии *Igf2* в мозге потомков, если таких самцов дополнительно стрессировали до спаривания.

Ключевые слова: пренатальный стресс, трансгенерационный эффект, память, инсулиноподобный фактор роста 2, гиппокамп, неокортекс, крыса

DOI: 10.31857/S0044452923050066, **EDN:** KPHMSE

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными исследованиями было установлено влияние неблагоприятных факторов (стресс, нарушение питания, гипоксия, воздействие токсикантами и многих других) на беременных матерей в отношении поведения и гормональных функций потомков не только первого, но и последующих поколений [1–3]. Сходное трансгенерационное влияние на фенотип потомков могут оказывать различные неблагоприятные факторы, действующие на отцов до зачатия [4–7]. Важно отметить, что воздействие окружающей среды на одно поколение (F0) может сохраняться в течение нескольких поколений, даже когда потомство (F1) выращивается в “контрольных” условиях, т.е. в отсутствие сигнала, запускающего реакцию в поколении F0. Не-

смотря на то что трансгенерационное наследование признаков в нескольких поколениях может быть неселективным, другими словами, все внуки в равной степени подвержены влиянию среды своих бабушек и дедушек [8], соответствующие изменения могут избирательно сохраняться из поколения в поколение в зависимости от того, кто подвергался воздействию факторов среды – мужские или женские особи – и иметь специфичность в зависимости от пола потомков. Например, у людей на внуков влияет диета их дедушки по отцовской линии, а на внучек – диета их бабушки по отцовской линии [9].

Показано, что материнский стресс вызывает нарушение пространственного обучения и памяти потомков [1, 10, 11]. Так, было показано, что воздействие на крыс хронического умеренного не-

предсказуемого стресса в течение всей беременности вызывает у их потомков нарушения обучения и памяти в водном лабиринте Морриса и в Y-лабиринте [12]. Выявленные нарушения сопровождались снижением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2, *Igf2*) и самого белка этого ростового фактора в гиппокампе. Данный факт представляет значительный интерес, поскольку установлено, что ИФР2 в гиппокампе играет важную роль в консолидации памяти у лабораторных грызунов [13, 14], улучшает способность к обучению и память, а также предотвращает забывание [15]. ИФР 2 в префронтальной коре также участвует в когнитивных процессах. При исследовании *post mortem* головного мозга пациентов, больных шизофренией и имевших значительные когнитивные нарушения, было показано снижение экспрессии *Igf2* в префронтальной коре [16]. Ранее нами было установлено, что пренатально стрессированные самцы – потомки матерей, которых подвергали иммобилизационному стрессу с 15 по 19 день гестации – характеризуются не только измененными гормональными функциями [17, 18], но и проявляют повышенную чувствительность к травматическому стрессу [19, 20]. Также нами было показано, что травматический стресс с последующим рестрессом (парадигма “стресс-рестресс”) у самцов крыс в период сперматогенеза вызывает у их потомков мужского пола нарушение памяти в тесте реакция пассивного избегания и снижает экспрессию *Igf2* в гиппокампе и неокортексе [21]. Можно полагать, что добавочный стресс самцов, родившихся от стрессированных во время беременности матерей, может оказывать более значительное влияние на память их потомков в зависимости от пола. Однако такие исследования ранее не проводились.

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в выявлении трансгенерационного эффекта пренатального стресса на память и экспрессию *Igf2* в мозге потомков мужского пола и их потомков самцов и самок следующего поколения, а также влияние дополнительного стрессирования с использованием парадигмы “стресс-рестресс” в период сперматогенеза самцов крыс, родившихся от стрессированных матерей, на память и экспрессию *Igf2* в мозге их потомков обоего пола.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах Вистар из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. В исследовании использовали самцов крыс весом 250–280 г и самок весом 220–230 г. Все процедуры, проведенные с животными, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Ба-

зельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в пластиковых клетках по 4–5 штук на стандартной диете (гранулированный комбикорм) при свободном доступе к воде и пище и 12-часовом режиме смены дня и ночи (9–00/21–00).

Моделирование пренатального психозэмоционального стресса

Половозрелых первородящих самок ($n = 20$) попарно ссаживали с половозрелыми самцами и начиная со следующего дня осуществляли ежедневный забор влагалищных мазков с целью определения стадии эстрального цикла и обнаружения сперматозоидов. День, когда в мазке были выявлены сперматозоиды на стадии проэструс – эструс, считали нулевым днем беременности. Оплодотворенных самок отсаживали в отдельные клетки и содержали группами по 5 штук. Часть самок ($n = 10$) с 15 по 19 день беременности подвергали ежедневному иммобилизационному стрессу в узких пластиковых пеналах в течение 1 ч по методике, описанной ранее [18]. Остальные самки оставались интактными, а их потомки служили контролем для потомков стрессированных самок. На 20-й день беременности самок помещали в индивидуальные клетки и содержали поодиночке вместе с пометами. На 2-й день жизни число крысят в пометах выравнивали до 8–10 животных с равным соотношением полов. Потомков отнимали от матерей в 30-дневном возрасте и далее содержали в группах по 4–5 животных в соответствии с полом и пометом. Для дальнейших экспериментов использовали половозрелых самцов в возрасте 2.5 мес – потомков стрессированных во время беременности матерей и потомков контрольных самок. Из каждого помета случайным образом отбирали одного самца для получения потомства следующего поколения или для дополнительного стрессирования. По два самца из пометов групп пренатальный стресс и контроль использовали для изучения памяти, и еще по два самца из пометов исследованных групп – для изучения экспрессии *Igf2* в мозге.

Получение следующего поколения пренатально стрессированных самцов

Пренатально стрессированных самцов ($n = 5$) ссаживали с двумя интактными самками, далее осуществляли забор вагинальных мазков с целью контроля дня наступления беременности. Оплодотворенных самок до 20-го дня беременности содержали группами по 5 животных, а с 20-го дня беременности индивидуально. Сходным образом было получено потомство от интактных самцов ($n = 5$) и интактных самок, которое служило контролем для следующего поколения пренатально стрессиро-

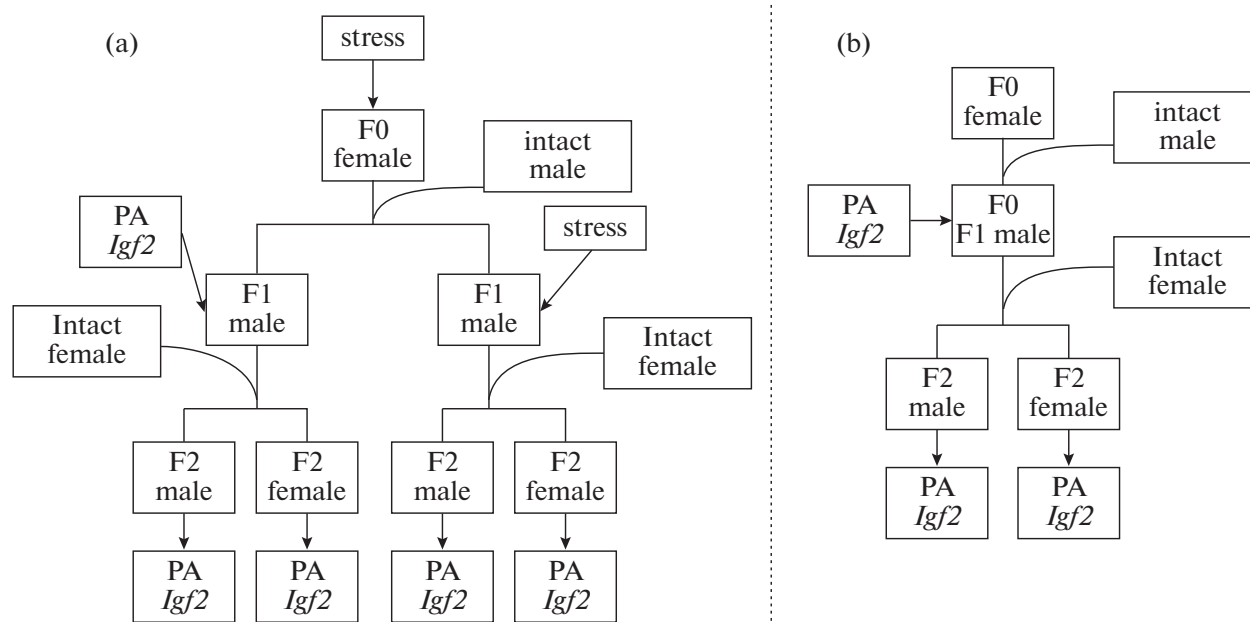


Рис. 1. Схема эксперимента получения потомства пренатально стрессированных (а) и контрольных крыс (б). Условные обозначения: PA – реакция пассивного избегания; Igf2 – изучение экспрессии *Igf2* в мозге потомков.

ванных самцов. Дальнейшие манипуляции с пометами осуществляли, как указано выше. Следующие эксперименты по изучению памяти и экспрессии *Igf2* в мозге выполняли на половозрелых потомках обоего пола в возрасте 2.5 мес, отбирая из каждого помета случайным образом по два животных соответствующего пола.

Моделирование стресса отца до зачатия и получение потомства от стрессированных отцов

Пренатально стрессированных самцов ($n = 7$) подвергали комбинированному стрессу и последующему рестрессу по методике, описанной ранее [20]. Комбинированный стресс состоял из двухчасовой иммобилизации в узких пластиковых пеналах, двадцатиминутного плавания в стеклянных цилиндрах, заполненных водой с температурой $24 \pm 2^\circ\text{C}$, и эфирного стресса в течение 1 мин. Через 6 сут после комбинированного стресса самцов подвергали 30-минутному иммобилизационному стрессированию (рестресс). На 46–48-е сут после рестресса каждого самца ссаживали с двумя интактными самками, находящимися в стадии проэструс-эструс, контролировали наступление беременности и получали потомство так, как описано выше. Аналогичным образом было получено потомство от интактных самцов ($n = 5$) и самок, которое служило контрольной группой для потомков пренатально стрессированных отцов, подвергнутых дополнительному стрессорному воздействию в период сперматогенеза. Дальнейшие эксперименты выполняли на половозрелых потомках обоего

пола в возрасте 2.5 мес, отбирая из каждого помета случайным образом по два животных соответствующего пола. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Методика оценки памяти крыс

Для исследования памяти животных использовали тест реакция пассивного избегания (РПИ). РПИ вырабатывали в камере, состоящей из светлого (50×50 см) и темного (15×15 см) отсеков, разделенных перегородкой с отверстием и дверцей. Пол темного отсека состоял из металлических прутьев, подключенных к источнику тока. В первый день проводили обучение РПИ: крысу помещали в светлый отсек, через 10 с дверцу в темный отсек открывали. После перехода крысы в темный отсек она получала электрокожное раздражение 0.9 мА длительностью 2 с (первая сессия). На следующий день проводили тестирование памяти (вторая сессия), где животное снова помещали в светлый отсек и повторяли процедуру первой сессии, при этом удар электрическим током не наносили. Для исследования угашения РПИ крыс тестировали трижды с разницей в одну неделю, повторяя процедуру второй сессии по методике, описанной ранее [21]. В каждом тесте фиксировали латентный период входа крысы в темный отсек. Общее время тестирования в каждой сессии составляло 300 с. Тесты выполняли с 13:00 до 17:00. В каждой экспериментальной группе число животных составляло 10 особей.

*Метод изучения экспрессии Igf2
в гиппокампе и неокортексе крыс*

Изучение экспрессии *Igf2* проводили с использованием ПЦР в режиме реального времени у отдельных групп потомков, не участвовавших в тесте РПИ.

Животных декапитировали, извлекали мозг, из которого на льду выделяли гиппокамп и часть неокортекса, содержащую префронтальную область неокортекса (от брегмы: 2.5 мм кпереди, 0.5 мм латерально, 4 мм вентрально) и фронтальную область (от брегмы: 2.5 мм кпереди, 2.8 мм латеральнее, 1 мм в глубину, согласно атласу Паксиноса и Ватсона, 2007). Полученные области мозга помещали в пробирки с раствором для стабилизации РНК (“Евроген”, Россия) и хранили до выделения РНК при -80°C . Забой самок проводили в стадию диэструс, которую определяли по клеточному составу окрашенных азур-эозином вагинальных мазков.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, в присутствии 10 мМ dNTP, 200 Ед/мл обратной транскриптазы MMLV, рассеянной затравки (3 мг/мл) и с добавлением от 100 до 500 нг тотальной РНК. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени выполняли на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) с использованием расходных материалов производства ThermoFisher Scientific, США. Для исследования экспрессии *Igf2* использовали набор зондов и праймеров (TaqMan® Gene Expression Assays, Rn01454518_m1). В качестве внутреннего контроля использовали ген *Hprt1* (TaqMan® Gene Expression Assays, Rn01527840_m1), который ранее применяли в качестве гена домашнего хозяйства при исследовании экспрессии *Igf2* в мозге крыс [22]. Относительный уровень экспрессии мРНК в экспериментальных группах рассчитывали методом $\Delta\Delta\text{Ct}$ с использованием программы ExpressionSuite V1.0.3 (ThermoFisher Scientific, США), принимая экспрессию мРНК в контрольной группе, равной 1.0. Данные представлены как относительный уровень мРНК (RQ – relative quantity, относительное количество). Измерения проводили не менее чем в 3 параллельных пробах для каждого опыта. В каждой группе число животных $n = 7$.

Методы статистического анализа

Статистический анализ проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA и про-

граммы “STATISTICA 12.0”. В связи с тем, что для каждой экспериментальной группы животных использованы соответствующие группы контрольных крыс, были проведены отдельные анализы для двух поколений самцов стрессированных матерей; для самцов и самок – потомков пренатально стрессированных отцов и потомков пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания.

Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро–Уилка. В связи с тем, что показатели тестов РПИ не соответствовали нормальному распределению, их приводили к нормальному распределению, логарифмируя по основанию 2. Далее для статистического анализа результатов РПИ потомков стрессированных матерей двух поколений использовали двухфакторный ANOVA для повторных измерений (день тестирования \times поколение); для потомков пренатально стрессированных самцов и пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания – факториальный ANOVA (отец \times пол в зависимости от дня тестирования) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) результатов отдельных тестов.

Для оценки межгрупповых различий результатов показателей экспрессии *Igf2* применяли однофакторный ANOVA с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений в каждой группе животных в соответствии с полом. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты тестирования РПИ самцов первого и второго поколения стрессированных во время беременности самок представлены на рис. 2. Двухфакторный ANOVA результатов теста РПИ пренатально стрессированных самцов двух поколений и контрольных самцов показал достоверное влияние фактора день тестирования ($F_{(4,149)} = 6.5, p < 0.001$) и поколение ($F_{(2,149)} = 3.5, p < 0.01$) на латентный период захода в темный отсек камеры. Выявлено взаимодействие факторов день тестирования/поколение ($F_{(8,149)} = 2.9, p < 0.05$). Последующие парные *post-hoc* сравнения показали, что пренатально стрессированные самцы, а также их потомки следующего поколения статистически значимо отличаются от контрольных самцов повышенным латентным периодом захода в темный отсек камеры в первую сессию тестирования памяти. При этом влияние пренатального стресса в первом и следующем поколении на латентный период в последующие дни тестирования по сравнению с контрольными самцами не обнаружено.

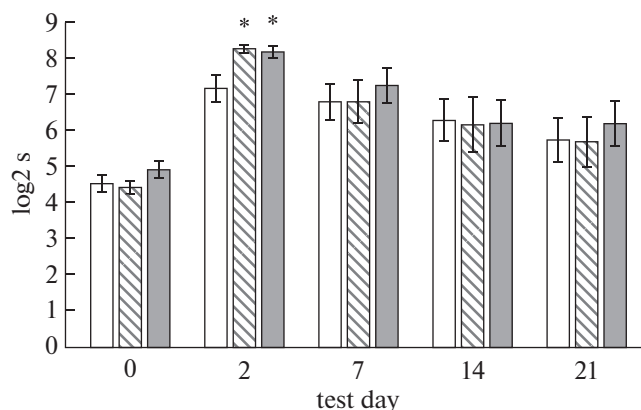


Рис. 2. Влияние пренатального стресса на память потомков самцов по мужской линии в тесте реакция пассивного избегания. По оси абсцисс – день тестирования; по оси ординат – \log_2 длительности латентного периода захода в темный отсек камеры (с). Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); столбики со штриховкой – пренатально стрессированные самцы; темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов. * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$).

Дисперсионный анализ ANOVA результатов теста РПИ потомков обоего пола пренатально стрессированных самцов и пренатально стрессированных самок, которых до ссаживания с интактными самками подвергали стрессированию, показал статистически значимое влияния фактор пол ($F_{(5,299)} = 3.7, p < 0.01$) и фактора отец ($F_{(5,299)} = 3.4, p < 0.001$) на латентный период захода в темный отсек камеры. Выявлено взаимодействие указанных факторов ($F_{(10,299)} = 2.4, p < 0.05$). *Post hoc* анализ показал статистически значимое снижение латентного периода захода в темный отсек камеры в ознакомительную сессию (1-й тест) у самцов, родившихся от пренатально стрессированных отцов с дополнительным стрессированием до спаривания по сравнению с пренатально стрессированными самцами второго поколения, что может свидетельствовать о повышении у них уровня тревожности (рис. 3а). Снижение латентного периода обнаружено так же и во второй день тестирования по сравнению с пренатально стрессированными самцами второго поколения. Кроме того, угашение РПИ у этой группы самцов было ускорено: уже через две недели они демонстрировали сниженный латентный период по сравнению с другими группами самцов и по этому показателю не отличались от соответствующего показателя в ознакомительную сессию.

Самки – потомки пренатально стрессированных самцов отличались от контрольных самок сниженным латентным периодом захода в темный отсек камеры только через три недели после первого тестирования (рис. 3б). Если пренатально стрессированных самцов дополнительно подвергали

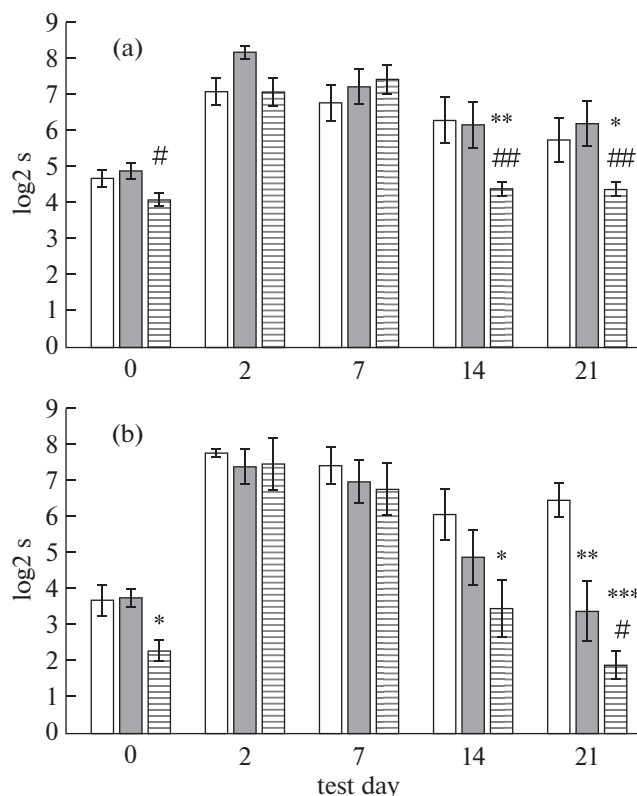


Рис. 3. Выработка реакции пассивного избегания у самцов (а) и самок (б) – потомков пренатально стрессированных самцов и пренатально стрессированных самок с дополнительным стрессированием с использованием парадигмы “стресс-рестресс” до зачатия потомков. По оси абсцисс – день тестирования; по оси ординат – \log_2 длительности латентного периода захода в темный отсек камеры (с). Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов; столбики со штриховкой – потомки пренатально стрессированных самцов, испытавших воздействие стресса до спаривания с интактными самками. * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$. # – статистически значимые отличия от потомков пренатально стрессированных самцов ($p < 0.05$), ## – $p < 0.01$.

стрессу до зачатия потомства, то у их потомков самок выраженность угашения РПИ была еще выше, поскольку уже на 14-й день теста их латентный период захода в темный отсек камеры не отличался от соответствующего показателя в ознакомительную сессию. Кроме того, у этих самок латентный период захода в темный отсек камеры в ознакомительную сессию был ниже, чем у других групп самок, что позволяет заключить о повышении их уровня тревожности. Следует отметить, что статистически значимые межполовые различия в тесте РПИ у сходных групп потомков были обнаружены только для потомков пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания и только через 3 недели после обучения ($p < 0.05$).

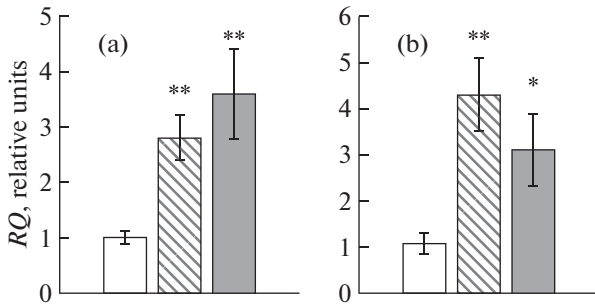


Рис. 4. Действие материнского стресса на экспрессию *Igf2* в гиппокампе (а) и неокортексе (б) потомков 2 поколений по мужской линии. По оси ординат – RQ (relative quantity, относительное количество), отн. ед. Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); столбики со штриховкой – пренатально стрессированные самцы; темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов. * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$); ** – $p < 0.01$.

Результаты анализа уровня экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе самцов контрольной группы и пренатально стрессированных самцов двух поколений представлены на рис. 4. Однофакторный ANOVA показал статистически значимое влияние фактора поколение на экспрессию *Igf2* в гиппокампе ($F_{(2,20)} = 6.7, p < 0.01$) и неокортексе ($F_{(2,20)} = 6.03, p < 0.05$). Последующие парные *post hoc* сравнения показали, что пренатально стрессированные самцы, а также их потомки статистически значимо отличаются от контрольных самцов повышенной экспрессией *Igf2* как в гиппокампе (рис. 4а), так и в неокортексе (рис. 4б).

Обнаружено также влияние фактора отец на экспрессию данного гена в обеих областях мозга самцов, родившихся от контрольных, пренатально стрессированных и пренатально стрессированных

с дополнительным стрессом отцов ($F_{(2,20)} = 6.1, p < 0.01$ – гиппокамп; $F_{(2,20)} = 5.2, p < 0.05$ – неокортекс). Парный *post-hoc* тест выявил снижение экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе самцов, родившихся от пренатально стрессированных отцов с дополнительным стрессированием до зачатия, по сравнению с пренатально стрессированными самцами второго поколения (рис. 5а).

У самок однофакторный ANOVA показал статистически значимое влияние фактора отец на экспрессию данного гена в гиппокампе ($F_{(2,20)} = 8.1, p < 0.01$) и неокортексе ($F_{(2,20)} = 6.2, p < 0.01$), а парные *post-hoc* сравнения выявили снижение экспрессии *Igf2* в обеих мозговых структурах самок экспериментальных групп по сравнению с контрольными самками (рис. 5б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные нами исследования показали, что стрессирование беременных самок крыс путем часовой иммобилизации с 15-го по 19-й день гестации оказывает положительное влияние на память их потомков мужского пола, которое сохраняется и в следующем поколении потомков самцов. При этом мы наблюдали улучшение памяти таких потомков, что проявлялось в статистически значимом увеличении латентного периода захода в темный отсек камеры во второй день теста. Существенных различий в скорости угашения РПИ между потомками самцами стрессированных матерей и потомками контрольных животных мы не обнаружили. Указанное улучшение памяти в тесте РПИ пренатально стрессированных самцов и их потомков мужского пола сопровождалось более высокой экспрессией *Igf2* в гиппокампе и неокортексе.

Следует отметить, что большинство работ, где проводили исследование влияния материнского

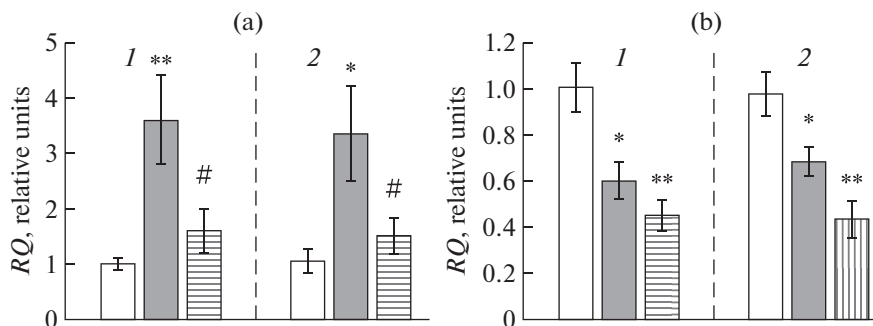


Рис. 5. Действие пренатального стресса на экспрессию *Igf2* в мозге потомков самцов (а) и потомков самок (б) по мужской линии. 1 – гиппокамп; 2 – неокортекс. Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов; столбики со штриховкой – потомки пренатально стрессированных отцов, испытывавших воздействие стресса до спаривания с интактными самками. По оси ординат – RQ (relative quantity, относительное количество). * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. # – статистически значимые отличия от потомков пренатально стрессированных самцов ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

стресса на способность к обучению и память потомков, посвящено изучению пространственного обучения и памяти. Показано, что данный вид обучения ухудшается у пренатально стрессированных животных [1, 12, 23]. Причем данный эффект на ориентацию в пространстве пренатально стрессированных особей зависит от длительности стрессирования и периода беременности, когда тот или иной тип стресса использовали. Например, было установлено, что пространственное обучение и память в большей мере страдают у потомков, когда стрессирование беременных самок проводили в первый триместр беременности [24]. Сходные данные были получены в исследовании, где беременных самок стрессировали весь период беременности [12]. Стрессирование самок мышей с 13–18-го дня беременности (иммобилизационный стресс в течение 24 мин трижды в день) не вызывало ухудшение пространственного обучения в водном лабиринте Морриса у взрослых потомков самцов [25]. В исследовании, где изучали память потомков стрессированных матерей в тесте РПИ, выявлен факт ухудшения памяти у потомков таких матерей, но в возрасте 30–31 день [11]. В данном исследовании беременных самок крыс подвергали иммобилизационному стрессу начиная с 11-го дня беременности. Сходный результат был получен в эксперименте, где беременных самок стрессировали с 13-го по 20-й день беременности [26], причем у взрослых потомков стрессированных матерей нарушение памяти в тесте РПИ было обнаружено только у потомков самок, но не самцов. В другом исследовании беременных самок подвергали физическому или психическому стрессу с 6-го по 16-й день беременности [27]. У взрослых потомков этих матерей показано ухудшение памяти в данном тесте.

Несмотря на то что использованный нами тип стрессирования и дни гестации (15–19 день), когда беременных матерей подвергали иммобилизации, в ряде случаев перекрывается с упомянутыми выше исследованиями, мы обнаружили улучшение памяти в тесте РПИ у пренатально стрессированных самцов. Отметим, что в выполненных нами ранее исследованиях с использованием потомков самцов, родившихся от стрессированных с 15-го по 19-й день беременности матерей, мы показали иные результаты изменения поведения таких потомков, чем в работах других авторов. Так, наши пренатально стрессированные самцы характеризовались повышенной двигательной активностью и сниженной тревожностью в новой обстановке [19] по сравнению с контрольными самцами, хотя в большинстве исследований, напротив, отмечено повышение тревожности пренатально стрессированных животных при применении к беременным самкам стрессорных воздействий большей интенсивности и длительности [1, 25]. По всей видимости, эффекты стресса матери на поведенческий фенотип и когнитивные способности потомков опре-

деляются как периодом беременности, так и длительностью стрессорного воздействия.

Улучшение показателя памяти в тесте РПИ у пренатально стрессированных самцов и их потомков сопровождалось повышением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе, что соответствует участию ИФР2 в консолидации памяти и длительности ее сохранения в тесте РПИ [15]. При этом у самцов, родившихся от пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания с самками, показано ухудшение памяти и длительности ее сохранения, а также снижение экспрессии *Igf2* в мозге.

В отличие от самцов – потомков пренатально стрессированных самцов, у самок, которые родились от таких самцов, мы обнаружили только усиленное угашение РПИ. Причем у самок, родившихся от пренатально стрессированных самцов, на 21-й день тестирования латентный период захода в темный отсек камеры соответствовал этому показателю в первый “ознакомительный” день тестирования. У самок, которые родились от пренатально стрессированных самцов, испытавших дополнительное стрессорное воздействие до спаривания с интактными самками, угашение РПИ происходило уже через 2 нед. Соответственно экспрессия *Igf2* в гиппокампе и неокортексе подопытных самок была снижена по сравнению с самками – потоками интактных родителей. Следует отметить, что несмотря на снижение экспрессии *Igf2* в мозге подопытных самок мы выявили у них только более быстрое угашение РПИ, но не ухудшение самой памяти, поскольку во второй день теста эти самки не отличались от контрольных самок латентным периодом захода в темный отсек камеры. Мы предполагаем, что у самок по сравнению с самцами существует своя специфика участия ИФР2 в процессах, связанных с формированием памяти и длительностью ее сохранения. Однако данное предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

В исследованиях, выполненных нами ранее, показано, что стрессирование самцов крыс с использованием парадигмы “стресс-рестресс” вызывает у их потомков самцов, но не самок, ухудшение памяти в тесте РПИ и снижение экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе [28]. В случае, когда сходному стрессированию подвергали самцов, рожденных от стрессированных во время беременности матерей, эффекты на память и экспрессию *Igf2* проявлялись у потомков обоего пола. Вероятно, более выраженное влияние стресса отца на исследованные нами функции связано с повышенной и длительной стрессорной реакцией пренатально стрессированных самцов [19], в том числе, и в парадигме “стресс-рестресс” [20].

Обращает на себя внимание тот факт, что трансгенерационный эффект пренатального стресса по мужской линии по-разному проявляется у самцов

и самок. Так, у самцов второго поколения, рожденных от пренатально стрессированных самцов так же, как и у их отцов мы выявили улучшение памяти и увеличение экспрессии *Igf2* в мозге, тогда как у самок – потомков пренатально стрессированных самцов, напротив, обнаружены нарушение длительности сохранения РПИ и снижение экспрессии *Igf2*. Мы пришли к заключению, что трансгенерационная передача признаков является зависимой от пола потомков. В качестве подтверждения данного заключения можно привести исследования, выполненные на пресноводной популяции трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*), где были изучены последствия визуального сигнала риска нападения хищников у самцов и самок с последующим определением антихищнического поведения потомства обоего пола [29]. Эти исследования показали, что у отцов, подвергавшихся воздействию хищников, рождались сыновья, более склонные к “рisku” (высокая двигательная и исследовательская активность), в то время как у матерей, подвергавшихся воздействию хищников, рождались более тревожные сыновья и дочери. Авторы продолжили данное исследование и изучили, может ли подвержение самцов риску нападения хищников повлиять на внуков через сперму в зависимости от пола потомков. Оказалось, что эффекты неблагоприятного воздействия на самца F0 в отношении особенностей поведения их потомков F2 зависели от пола таких потомков и в большей мере проявлялись у самок F2 [7]. Зависимость трансгенерационной передачи признаков от пола потомков была получена и при исследовании 3 поколений самцов и самок морских свинок, родившихся от матерей, у которых стресс моделировали введением синтетического глюкокортикоида [4].

В настоящее время в качестве основного механизма трансгенерационного переноса признаков по отцовской линии рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией микроРНК [30]. В исследованиях, выполненных нами ранее, показано, что стрессирование самцов с использованием той же парадигмы, что и в настоящем исследовании, приводит к значительному изменению содержания в их сперме микроРНК, в том числе тех, которые взаимодействуют с генами, связанными с ИФР2 (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*) [31]. Вопрос о том, может ли стрессорное воздействие в пренатальном онтогенезе вызывать изменение экспрессии микроРНК в сперматозоидах самцов и способствовать модификации функций их потомков в зависимости от пола, остается открытым и нуждается в дальнейшем исследовании.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030), тема 0134-2019-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.Э.О.), сбор данных (Е.Д.Ш., С.Г.П., В.К.А., Г.И.Х.), обработка данных (О.В.М., С.Г.П.), написание и редактирование манускрипта (Н.Э.О., С.Г.П., О.В.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bock J, Wainstock T, Braun K, and Segal M (2015) Stress in utero: prenatal programming of brain plasticity and cognition. *Biol Psychiatr* 78: 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.036>
2. Nilsson EE, Skinner MK (2015) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility. *Transl Res* 165: 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.02.003>
3. Zhang Q, Tian Y (2022) Molecular insights into the transgenerational inheritance of stress memory. *J Genet Genom* 49: 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.11.015>
4. Moisiadis VG, Constantinof A, Kostaki A, Szyf M, Matthews SG (2017) Prenatal Glucocorticoid Exposure Modifies Endocrine Function and Behaviour for 3 Generations Following Maternal and Paternal Transmission. *Sci Rep* 7: 11814. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11635-w>
5. Soubry A (2018) Epigenetics as a Driver of Developmental Origins of Health and Disease: Did We Forget the Fathers? *BioEssays* 40: 1700113. <https://doi.org/10.1002/bies.201700113>
6. Rando OJ (2012) Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. *Cell* 151: 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.020>
7. Hellmann JK, Carlson ER, Bell AM (2020) Sex-specific plasticity across generations II: Grandpaternal effects are lineage specific and sex specific. *J Anim Ecol* 89: 2800–2812. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13365>
8. Bell AM, Hellmann JK (2019) An integrative framework for understanding the mechanisms and multigenerational consequences of transgenerational plasticity. *Ann Rev Ecol Evol Systemat* 50: 97–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024613>
9. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J, Team AS (2006) Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14: 159–166. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201538>

10. Van den Bergh B, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, Hoyer D, Roseboom T, Räikkönen K, King S, Schwab M (2020) Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci Biobehav Rev* 117: 26–64. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003>
11. Cherian SB, Bairy KL, Rao MS (2009) Chronic prenatal restraint stress induced memory impairment in passive avoidance task in post weaned male and female Wistar rats. *Indian J Exp Biol* 47: 893–899.
12. Guan SZ, Fu Y, Zhao F, Liu HY, Chen XH, Qi FQ, Liu ZH, Ng TB (2021) The mechanism of enriched environment repairing the learning and memory impairment in offspring of prenatal stress by regulating the expression of activity-regulated cytoskeletal-associated and insulin-like growth factor-2 in hippocampus. *Environment Health Prevent Med* 26: 8. <https://doi.org/10.1186/s12199-020-00929-7>
13. Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469: 491–497. <https://doi.org/10.1038/nature09667>
14. Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, Ray J, Clemenson GD Jr, Suh H, Couillard-Despres S, Aigner L, Gage FH, Jessberger S (2012) Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 32: 3376–3387. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4248-11.2012>
15. Alberini CM, Chen DY (2012) Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci* 35: 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.007>
16. Fromer M, Roussos P, Sieberts SK, et al. (2016) Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nat Neurosci* 19: 1442–1453. <https://doi.org/10.1038/nn.4399>
17. Ordyan NE, Pivina SG, Baranova KA, Rakitskaya VV, Akulova VK, Kholova GI (2021) Sex-Dependent Actions of Prenatal Stress on the Activity of the Hypothalamo-Hypophyseal-Adrenocortical System in Rats: The Role of Corticosteroid Receptors in the Brain. *Neurosci Behav Physiol* 51: 357–366. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01079-1>
18. Pivina SG, Rakitskaya VV, Akulova VK, Shigalugova ED, Ordyan NE (2022) Effects of Prenatal Stress on Reproductive Function in Male Rats. *Neurosci Behav Physiol* 52: 568–573. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01276-6>
19. Ordyan NE, Pivina SG (2004) Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophyseal-adrenal system in prenatally stressed rats. *Neurosci Behav Physiol* 34 (6): 569–574. <https://doi.org/doi:10.1023/b:ne-ab.0000028286.83083.73>
20. Ordyan NE, Smolenskiy IV, Pivina SG, Akulova VK, Rakitskaya VV (2014) Characteristics of the Formation of the Anxious-Depressive State in an Experimental Model of Post-Traumatic Stress Disorder in Prenatally Stressed Male Rats. *Neurosci Behav Physiol* 44: 657–663. <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9966-6>
21. Pivina SG, Rakitskaya VV, Akulova VK, Ordyan NE (2016) Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal System in Prenatally Stressed Male Rats on the Experimental Model of Post-Traumatic Stress Disorder. *Bull Exp Biol Med* 160: 601–604. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3>
22. Ordyan NE, Malysheva OV, Akulova VK, Pivina SG, Kholova GI (2020) The Capability to Learn and Expression of the Insulin-Like Growth Factor II Gene in the Brain of Male Rats Whose Fathers Were Subjected to Stress Factors in the “Stress–Restress” Paradigm. *Neurochemical J* 14: 191–196. <https://doi.org/10.1134/S1819712420020075>
23. Markham JA, Koenig JI (2011) Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 89–106. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2035-0>
24. Modir F, Elahdadi Salmani M, Goudarzi I, Lashkarboluki T, Abrari K (2014) Prenatal stress decreases spatial learning and memory retrieval of the adult male offspring of rats. *Physiol Behav* 129: 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.040>
25. Akatsua S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T (2015) Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neurosci Res* 101: 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.07.002>
26. Wua J, Songa TB, Lia YJ, Heb KS, Geb L, Wang LR (2007) Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β expression and translocation in offspring rats. *Brain Res* 1141: 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.024>
27. Nazeri M, Shabani M, Ravandi SG, Aghaei I, Nozari M, Mazhari S. (2015) Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors. *Physiol Behav* 142: 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.016>
28. Ordyan NE, Malysheva OV, Holova GI, Akulova VK, Pivina SG (2022) Sex-Dependent Effects of Stress in Male Rats on Memory and Expression of the Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor Gene in the Brains of Offspring. *Neurosci Behav Physiol* 52: 242–250. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01079-1>
29. Hellmann JK, Bukhari SA, Deno J, Bell AM (2020) Sex-specific plasticity across generations I: Maternal and paternal effects on sons and daughters. *J Anim Ecol* 89 (12): 2788–2799. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13364>
30. Duffy KA, Bale TL, Epperson CN (2021) Germ cell drivers: transmission of preconception stress across generations. *Front Hum Neurosci* 15: 642762. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.642762>
31. Малышева ОВ, Пивина СГ, Пономарева ЕН, Ордыан НЭ (2023) Изменение содержания малых некодирующих РНК в сперматозоидах как возможный механизм трансгенерационной передачи эффектов отцовского стресса: экспериментальное исследование. *Цитология* 65 (1): 28–38. [Malysheva OV, Pivina SG, Ponomareva EN, Ordyan NE (2023) Changes in the content of small non-coding RNAs in spermatozoa as a possible mechanism of transgenerational transmission of the effects of paternal stress: experimental research. *Citology*

TRANSGENERATIONAL EFFECTS OF PRENATAL STRESS ON MEMORY AND EXPRESSION OF THE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 GENE IN THE OFFSPRING BRAIN

N. E. Ordyan^{a,#}, E. D. Shigalugova^a, O. V. Malysheva^{a,b}, S. G. Pivina^a,
V. K. Akulova^a, and G. I. Kholova^a

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

^b*Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: neo@infran.ru*

Stress effects on pregnant female disrupt the behavior and cognitive abilities of their offspring not only of the first, but also of the subsequent generations. A similar transgenerational effect on the offspring phenotype can be exerted by various stress factors that affect fathers before conception. The purpose of the study was to reveal the transgenerational effect of stress in female rats from 15–19 days of pregnancy on memory and expression of the insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) gene in the brain of male and female offspring, as well as the effect of additional stress in the stress-restress paradigm in prenatally stressed male rats before conception on the memory and expression in the brain *Igf2* of their offspring of both sexes. We have shown that prenatally stressed males and their next-generation male offspring show improved memory in the passive avoidance test, increased *Igf2* expression in the hippocampus and cortex. Females, descendants of prenatally stressed males, on the contrary, showed a decrease in the duration of memory retention, *Igf2* expression in the hippocampus and cortex. Additional stressing of prenatally stressed males before mating with intact females worsened memory and the duration of its retention, reduced *Igf2* expression in the brain of the offspring of both sexes. We concluded that the transgenerational effects of prenatal stress on memory and *Igf2* expression in the brain depend on the sex of the offspring, and prenatal stress itself in males contributes to memory impairment and a decrease in *Igf2* expression in the offspring brain if such males were additionally stressed before mating.

Keywords: prenatal stress, transgenerational effects, offspring, memory, insulin-like growth factor 2, hippocampus, cortex, rat

ИНГИБИРОВАНИЕ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА ИНСУЛИНОМ КАК ОСНОВА ЕГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ *IN VITRO*

© 2023 г. И. О. Захарова¹, Л. В. Баюнова¹, Д. К. Аврова¹, Н. Ф. Аврова^{1,*}

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

*e-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 23.06.2023 г.

После доработки 03.08.2023 г.

Принята к публикации 04.08.2023 г.

Инсулин является одним из наиболее перспективных нейропротекторов. Существенным пробелом в понимании механизма его действия является отсутствие данных о том, способен ли он предотвращать аутофагическую гибель нейронов. Целью нашей работы были оценка вклада аутофагии и апоптоза в гибель нейронов коры мозга крыс в культуре при окислительном стрессе и изучение способности инсулина предотвращать эту гибель и ингибировать процессы аутофагии и апоптоза в нервных клетках. Изучено влияние перекиси водорода и инсулина на уровень двух основных маркеров аутофагии (LC3BII и SQSTM1/p62) и маркера апоптоза (расщепленная каспаза-3). Для оценки жизнеспособности нейронов использовали МТТ-тест, для измерения уровня маркерных белков применяли иммуноблоттинг. Найдено, что окислительный стресс вызывает активацию аутофагии и апоптоза в нейронах. Это проявляется в достоверном увеличении маркеров аутофагии LC3B-II и апоптоза (расщепленной каспазы-3) и в снижении уровня белка SQSTM1/p62. Содержание SQSTM1/p62, участвующего в образовании аутофагосом, снижается при активации аутофагии, т.к. белок подвергается деструкции в лизосомах. Перекись водорода вызывает аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов, о чем свидетельствует значительное увеличение жизнеспособности нейронов в условиях окислительного стресса при действии ингибиторов аутофагии (3-метиладенина) и апоптоза (z-DEVD-FMK). В свою очередь инсулин, предотвращая гибель нейронов при окислительном стрессе, препятствует развитию аутофагии, вызывая снижение уровня липидированной формы LC3B-II и увеличение уровня SQSTM1/p62, и апоптоза, уменьшая уровень расщепленной каспазы-3. Защитное действие инсулина опосредуется активацией специфических сигнальных путей, связанных с рецепторами инсулина и IGF-1. Так, ингибитор рецепторов инсулина и IGF-1 BMS-754807 полностью блокирует нейропротекторный эффект инсулина. Таким образом, ярко выраженная активация аутофагии при окислительном стрессе является одной из причин гибели нейронов, а защита нейронов инсулином связана с подавлением не только апоптотической, но и аутофагической гибели этих клеток.

Ключевые слова: нейроны коры мозга, окислительный стресс, инсулин, аутофагия, апоптоз

DOI: 10.31857/S0044452923050091, **EDN:** KQJTRT

ВВЕДЕНИЕ

Инсулин, относящийся к числу основных ростовых и трофических факторов, в настоящее время рассматривается как один из наиболее перспективных нейропротекторов. Так, было показано, что при его интраназальном введении он оказывает защитный эффект на нейроны мозга и улучшает когнитивные функции при таких нейродегенеративных болезнях, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Позитивный эффект интраназального введения инсулина (ИВИ) в большой мере обусловлен тем, что при таком способе доставки он попадает непосредственно в мозг, минуя гематоэн-

цефалический барьер [1, 2]. При этом хорошо выраженный защитный эффект такого введения инсулина выявлен не только в опытах на животных [3, 4], но и при клинических испытаниях ИВИ людям (см., например, [5–7]).

Защитный эффект инсулина при его интрацеребровентрикулярном [8] и системном введении (см., например, [9, 10]) показан и при ишемическом поражении мозга млекопитающих. Но работы по изучению способности интраназально введенного инсулина предотвращать гибель нейронов мозга при его ишемическом поражении и последующей реперфузии практически отсутствуют. Ис-

ключением являются лишь несколько работ нашей лаборатории, посвященных изучению способности инсулина нормализовать метаболические нарушения у молодых и старых крыс при глобальной ишемии переднего мозга [11, 12].

Влияние инсулина, введенного животным или людям, на аутофагическую гибель нейронов мозга при нейродегенеративных и ишемических воздействиях на мозг остается пока почти не изученным. Серьезным пробелом в изучении механизма нейротропного эффекта инсулина является также отсутствие данных о его влиянии на процессы аутофагии и аутофагической гибели нервных клеток, вызванной токсическими воздействиями, в опытах *in vitro*. И это, несмотря на большой интерес в современных научных исследованиях к той роли, которую играет аутофагия в гибели нейронов при патологических процессах различной этиологии. Долгое время полагали, что активация аутофагии носит преимущественно защитный характер. При этом считалось, что для понимания протекторного действия тех или иных соединений на нервные клетки важно расшифровать преимущественно механизмы их антиапоптотического и антинекротического действия. Но затем во многих работах было показано, что чрезмерная активация аутофагии может приводить к гибели нейронов, а вещества, ингибирующие процессы аутофагии, обладают свойствами нейротропных [13–17]. Стало ясно, что невозможно достичь понимания нарушений в мозге при различных видах патологических процессов и оценить механизм защитного действия нейротропных без изучения в том числе и аутофагической гибели нейронов. По-видимому, сигнальные молекулы и внутриклеточные каскады, ответственные за регуляцию аутофагии, могут стать одной из важнейших терапевтических мишеней при лечении различных поражений ЦНС [18–20]. Недавно нами было впервые показано [21], что интраназальное введение инсулина крысам практически предотвращает аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов в СА1 районе гиппокампа при глобальной ишемии переднего мозга и уменьшает ее в коре мозга. Актуальным является дальнейшее изучение способности инсулина подавлять процессы аутофагии и аутофагической гибели нейронов при неблагоприятных воздействиях в опытах *in vivo* и *in vitro*, а также расшифровка механизмов его ингибирующего влияния. Так, в литературе пока отсутствуют данные о том, что инсулин способен нормализовать изменения в нервных клетках основных маркеров аутофагии, таких как LC3B-II, SQSTM1/p62 или Beclin-1, свидетельствующие о ее активации, вызванной какими-либо патологическими воздействиями на нейроны.

Целью настоящей работы было определение влияния инсулина, перекиси водорода и ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-MA и z-DEVD-FMK

соответственно) на жизнеспособность нейронов коры мозга крыс *in vitro*, а также на содержание в них маркеров аутофагии и апоптоза. Для понимания возможного механизма этих эффектов инсулина интерес представляют данные о модуляции инсулином ряда протеинкиназ, полученные нами на культуре нейронов коры мозга крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид (МТТ), перекись водорода, инсулин и додецилсульфат натрия были приобретены у фирмы Sigma (США). Диметилформамид закуплен у фирмы Вектон (Россия). Среда для культивирования нейронов “Нейробазальная”, аланил-глутамин и бессывороточная ростовая добавка “НейроМакс” изготовлены компанией ООО НПП “ПанЭко” (Россия), тогда как ростовой комплимент В-27 без инсулина был куплен у фирмы Invitrogen (США). Ингибиторы аутофагии 3-метиладенин (3-МА) и тирозинкиназного домена рецепторов IGF-1 и инсулина BMS-754807 были получены от фирмы Sigma (США), ингибитор каспазы-3 и апоптотической гибели клеток z-DEVD-FMK – от BLDpharm (Китай). Экспрессию маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62, активность ряда протеинкиназ и содержание про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2, соответственно, изучали с помощью специфических антител, характеристика которых представлена в разделе методов исследования, описывающих иммуноблоттинг.

Выделение и культивирование нейрональных клеток из коры мозга эмбрионов крыс. Нейрональные клетки выделяли из развивающегося мозга эмбрионов крыс линии Вистар на 17–18-й день развития с помощью модифицированного метода Дихтера [22], как это описано ранее [23]. Выделенные клетки высевали в 48-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином, по 2.9×10^5 клеток/лунку для определения жизнеспособности МТТ-методом и в 12-луночные планшеты в концентрации 1.1×10^6 клеток/лунку для анализа экспрессии белков методом иммуноблоттинга. Для этого использовали Нейробазальную среду (ПанЭко, Россия), содержащую 2% ростовой добавки НейроМакс, 1% аланил-глутамин, пенициллин G (100 У/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл) (полная ростовая среда). Клетки снабжали свежей средой каждые 3 дня, для этого отбирали половину объема из каждой лунки и добавляли аналогичный объем свежей среды. Опыты начинали проводить на 6–7-й день культивирования клеток.

Определение жизнеспособности нейронов коры мозга в культуре МТТ-методом. Прежде чем перейти к опытам по определению жизнеспособности нейронов, первичную культуру дважды промывали

стерильным фосфатным буфером (DPBS). Затем клетки переводили в Нейробазальную среду, содержащую 1% ростовой добавки В-27 без инсулина (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США), в этой среде их оставляли на ночь. На следующий день нейроны преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч или с 5 мМ 3-МА или с 5 мкМ z-DEVD-FMK в течение 0.5 ч в Нейробазальной среде, содержащей 1% ростовой добавки В-27 без инсулина. По окончании преинкубации с инсулином и ингибиторами окислительный стресс, длительность которого составляла 8 ч, инициировали 50 мкМ H_2O_2 . Определение жизнеспособности нейронов проводили, используя МТТ метод, основанный на восстановлении митохондриями жизнеспособных клеток МТТ в окрашенный МТТ-формазан [24]. В клеточную среду вносили МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл за 2 ч до окончания инкубации (с перекисью водорода или без нее). Для солиubilизации кристаллов формазана в лунки добавляли по 150 мкл лизирующего буфера, представляющего собой 20%-ный раствор додецилсульфата натрия в 50%-ном диметилформамиде в 0.1 N соляной кислоте. Экстинкцию контрольных проб принимали за 100%, экстинкции остальных проб выражали в процентах от контроля. Для определения защитного эффекта инсулина и других соединений рассчитывали, гибель какого числа нейронов при токсическом действии перекиси водорода удалось предотвратить благодаря применению каждого из протекторов ("rescue rates"). Для этого вычисляли разницу между значениями экстинкций проб, выраженных в % по отношению к 100%-ному контролю, при действии на нейроны одной перекиси водорода и этого прооксиданта после преинкубации клеток с инсулином. Эту величину делили на разницу между значением контрольных проб (100%) и соответствующим значением проб, подвергнутых действию перекиси водорода. Полученный результат умножали на 100. При отсутствии защитного эффекта инсулина числитель равен 0, как и процент клеток, гибель которых была предотвращена инсулином.

Определение влияния инсулина на уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) и апоптоза (расщепленной каспазы-3, соотношение Вах/Vcl-2), на активность протеинкиназы В (Akt), киназы гликогенсинтазы-3бета (GSK-3beta), аденозин монофосфат-активируемой протеинкиназы (АМРК) в нейронах коры мозга методом иммуноблоттинга. Для иммуноблоттинга нейроны коры мозга высевали в 12-луночные планшеты в количестве 1.1×10^6 клеток/лунку в полной ростовой среде. За 12 ч до начала эксперимента нейрональную культуру после 2 кратной промывки DPBS переводили в Нейробазальную среду, содержащую 1% ростовой добавки В-27 без инсулина. На следующий день клетки преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч. Для определения активности протеинкиназы В (Akt), GSK-3beta, АМРК по уровню их фос-

форилованных форм, а также соотношения уровня Вах и Vcl-2 окислительный стресс инициировали 100 мкМ H_2O_2 в течение 6 ч и в ряде случаев в течение более короткого промежутка времени, как это указано на рис. 4 и 5. По окончании воздействия нейроны коры мозга промывали 2 раза охлажденным фосфатным буфером. Клетки лизировали в 60 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис (pH 8.0), 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.25% деоксихолата натрия, 50 мМ NaF, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ пиррофосфата натрия, 1 мМ глицерофосфата натрия, 1 мМ фенолметилсульфонил фторида (PMSF) и протеазный ингибиторный коктейль (Roche, Швейцария). Концентрацию белка в пробах определяли по модифицированному методу Лоури [25]. Белки разделяли в 13%-ном полиакриламидном геле, после чего осуществляли перенос на PVDF мембрану с размером пор 0.2 мкм (Bio-Rad, США). Сайты неспецифического связывания мембран блокировали, как описано ранее [26].

О влиянии инсулина на процессы аутофагии и апоптоза судили по уровню экспрессии маркерных белков LC3B-II и SQSTM1/p62, а также накоплению расщепленного фрагмента каспазы-3 (cleaved caspase-3 с молекулярной массой 17-19 kDa) с помощью специфических антител к LC3B-II (1: 1000, Cell Signaling, США), SQSTM1/p62 (1: 1000, ServiceBio, Китай) и к cleaved-Casp-3 (1: 1000, Cell Signaling, США). Для учета вариативности при загрузке проб осуществлялась нормализация с помощью антитела к GAPDH (1: 3000, Affinity Biosciences, Китай), которая выполнялась после стриппинга. Для изучения роли аутофагии и апоптоза в гибели нейронов и при исследовании экспрессии маркерных белков аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) и апоптоза (расщепленная каспаза-3 с молекулярной массой 17-19 kDa) в условиях окислительного стресса использовались ингибиторы аутофагии (3-МА) и апоптоза (z-DEVD-FMK). Действие инсулина блокировалось с помощью ингибитора тирозинкиназного домена рецепторов IGF-1 и инсулина 1 мкМ BMS-754807.

Об активности протеинкиназ судили по количеству их фосфорилированных форм, выявляемых с помощью специфических моноклональных антител. Степень активации протеинкиназы В (Akt) определяли по уровню pAkt (Ser⁴⁷³) (1: 1000, Cell Signalling, США), степень инактивации GSK 3-beta – по количеству pGSK-3beta (Ser⁹) (1: 1000, Cell Signalling, США), степень активации протеинкиназы АМРК – по уровню pАМРК (Thr¹⁷²) (1: 1000, Cell Signalling, США). Уровень проапоптотического белка Вах и антиапоптотического белка Vcl-2 выявляли с помощью антител к данным белкам (1:1000, Cell Signalling, США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга инкубировали с антителами к суммарной форме протеинкиназ Akt, GSK-3beta, АМРК-альфа (1:1000, Cell Signalling,

Таблица 1. Защитный эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-МА) и апоптоза (z-DEVD-FMK) в нейронах коры мозга крыс в условиях окислительного стресса

Протектор		Достоверность защитного эффекта
1 мкМ инсулин	50.2 ± 8.0%	$p < 0.01$
5 мМ 3-МА	34.8 ± 6.3%	$p < 0.001$
5 мкМ z-DEVD-FMK	38.4 ± 7.5%	$p < 0.01$

Примечание. Данные представляют собой среднее ± SEM из 6–8 опытов. Нейроны преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч или с 5 мМ 3-МА или с 5 мкМ z-DEVD-FMK в течение 0.5 ч, затем на них воздействовали 50 мкМ перекиси водорода в течение 8 ч. Определение жизнеспособности нейронов проводили, используя МТТ метод. Для определения защитного эффекта вычисляли, гибель какого процента нейронов от токсического действия перекиси водорода удалось предотвратить благодаря применению каждого из протекторов (“rescue rates”).

США). Для нормализации данных по уровню суммарной формы ферментов применяли альфа-тубулин (1: 2000, Cell Signalling, США) или GAPDH. Данные представляли в виде соотношения pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt, pGSK-3beta (Ser⁹)/GSK-3beta, pAMPK-alpha (Thr¹⁷²)/AMPK-alpha, Вах/альфа-тубулин, Bcl-2/альфа-тубулин, которое принимали за 1.0 в контрольных клетках. Также рассчитывали соотношение Вах/Bcl-2, которое в контрольных клетках принималось за 100%.

В качестве вторичных антител использовали антимышьи или антикроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cell Signaling Technology, США). Сигнал пероксидазы хрена усиливали с помощью реагентов Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen, США). Пленки с сигналом хемилюминесценции сканировались на сканере Canon (CanoScan 8800F). Для количественного определения оптической плотности иммунопозитивных полос использовали программу Bio7.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из целей нашего исследования было изучение способности инсулина, с одной стороны, и ингибиторов аутофагии (5 мМ 3-МА) и апоптоза (5 мкМ z-DEVD-FMK), с другой стороны, уменьшать гибель нейронов коры мозга крыс в культуре от токсического действия перекиси водорода. Результаты выражали в “rescue rates”, величинах, по-

казывающих, гибель какой части нейронов от токсического действия перекиси водорода удалось предотвратить тому или иному протектору (табл. 1). Поясним это на основании одного из опытов, в которых мы определяли защитный эффект инсулина. Количество клеток в контроле (и, соответственно, экстинкцию проб) принимали за 100%. При действии на нейроны коры мозга крыс 50 мкМ перекиси водорода живыми в этом опыте оставались 75.3% нейронов (погибали 24.7% нейронов). А после преинкубации клеток с 1 мкМ инсулина при последующем действии той же концентрации перекиси водорода число выживших нейронов составило 88.3% от контроля (погибали 11.7% нейронов). Эти данные показывают, что при преинкубации нейронов с инсулином погибло от действия перекиси водорода на 13% меньше нейронов от их общего числа в контроле (24.7% – 11.7% = 13%). При этом их гибель от действия одной перекиси водорода составляет 24.7% от числа клеток в контроле, поэтому “rescue rate” составляет для инсулина в этом опыте 52.6% [(13.0/24.7) × 100].

При усреднении данных, полученных в 6 опытах, мы получаем величину “rescue rate” для инсулина, равную 50.2 ± 8.0% (табл. 1). Эти данные показывают, что инсулин спасает от гибели при токсическом действии перекиси водорода на нейроны коры мозга в условиях наших опытов в среднем примерно половину клеток.

Таким же образом, как и для инсулина, нами вычислялись “rescue rates” для 3-МА и для z-DEVD-FMK. Полученные данные показали, что аутофагия и апоптоз являются основными причинами гибели нейронов при действии на них перекиси водорода. Так, ингибитор аутофагии 3-МА при действии на нейроны предохранял от гибели 34.8 ± 6.3% клеток, что, как мы считаем, отражает, какой процент нейронов коры мозга гибнет от чрезмерной активации аутофагии в условиях окислительного стресса в опытах *in vitro* (табл. 1). Не меньший процент клеток, по-видимому, гибнет от апоптоза. Так, найдено, что ингибитор каспазы-3 z-DEVD-FMK при преинкубации с ним нейронов предохраняет от гибели 38 ± 7.5% нейронов (табл. 1). Различия в числе клеток, гибнущих от аутофагии и апоптоза, не являются достоверными.

Интересно, что при совместном действии инсулина и ингибитора аутофагии 3-МА защитный эффект (“rescue rates”) был достоверно выше (табл. 2), чем при действии одного ингибитора или одного инсулина ($p < 0.05$ по *t* критерию Стьюдента методом попарных сравнений). Эти данные получены в отдельной серии опытов. В этой серии наблюдались более низкие значения “rescue rates” для инсулина (27.8 ± 5.0% при $n = 3$ и 41.0 ± 5.5% при $n = 4$ по сравнению с 50.2 ± 5.0% при $n = 6$ в табл. 1). Это свидетельствует о существенном разбросе данных по защитному эффекту инсулина между отдельными

Таблица 2. Защитный эффект совместного применения инсулина и 3-МА или инсулина и z-DEVD-FMK при окислительном стрессе

Протектор	Rescue rates	Число опытов	Достоверность различий по сравнению с защитным эффектом одного из соединений
1 мкМ инсулин	32.5 ± 10.1%	n = 3	$p < 0.05$ vs эффект 1 мкМ инсулина $p < 0.05$ vs эффект 5 мМ 3-МА
5 мМ 3-МА	27.8 ± 5.0%	n = 3	
1 мкМ инсулин + 5 мМ 3-МА	57.4 ± 10.5%	n = 3	
1 мкМ инсулин	41.0 ± 5.5%	n = 4	$p < 0.05$ vs эффект 1 мкМ инсулина $p < 0.05$ vs эффект 5 мкМ z-DEVD-FMK
5 мкМ z-DEVD-FMK	38.9 ± 2.5%	n = 4	
1 мкМ инсулин + 5 мкМ z-DEVD-FMK	62.3 ± 5.9%	n = 4	

Примечание. Данные представлены как среднее ± SEM из 3–4 опытов. Достоверность различий вычисляли, используя метод парных сравнений по *t* критерию Стьюдента. Нейроны преинкубировали с 1 мкМ инсулина в течение 1 ч или с 5 мМ 3-МА или с 5 мкМ z-DEVD-FMK в течение 0.5 ч или с инсулином и одним из ингибиторов. Остальная информация приведена в примечании к табл. 1.

ми опытами, которые ставились в разные дни, иногда с большим разрывом по срокам их проведения. При этом, если бы в каждой серии опытов было бы проведено по 6 опытов, как в табл. 1, то, по-видимому, различия не были бы столь заметны, как при 3 или 4 опытах. При действии инсулина и z-DEVD-FMK совместная способность этих соединений предотвращать гибель нейронов коры мозга была также выше (табл. 2), чем защитный эффект каждого из этих соединений ($p < 0.05$). Совокупность полученных данных позволяет полагать, что инсулин способен предотвращать как аутофагическую, так и апоптотическую гибель нейронов в условиях окислительного стресса.

Наряду с этим необходимо было также показать способность инсулина нормализовать уровень маркеров аутофагии в нейронах коры мозга крыс в культуре, измененный при активации аутофагии под действием перекиси водорода на эти клетки. Нами было изучено влияние перекиси водорода и преинкубации с инсулином на разных сроках воздействия прооксиданта на уровень двух маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62 в нейронах. Как видно из данных, приведенных на рис. 1а, достоверное увеличение в нейронах уровня такого маркера аутофагии, как LC3B-II, представляющего липидированную форму LC3B (в отличие от растворимой формы LC3B-I), наблюдается через 4 и 6 ч после инициации окислительного стресса, но уже через 1 и 2 ч после начала действия перекиси водорода проявляется тенденция к увеличению в нейронах уровня этого маркера. Хотя инсулин не оказывает воздействия на уровень LC3B-II в контрольных нейронах, но он достоверно снижает экспрессию этого маркера уже через 1 и 2 ч после начала действия перекиси водорода (рис. 1а). Особенно большое и также достоверное снижение содержания этого маркера аутофагии до контрольных величин наблюдается через 4 и 6 ч после начала действия перекиси водорода. Эти данные неопро-

вержимо свидетельствуют о способности инсулина подавлять чрезмерную активацию аутофагии в нейронах коры мозга, подвергнутых действию перекиси водорода, в опытах *in vitro*.

Такого рода данные были подтверждены и при изучении динамики изменения другого маркера аутофагии SQSTM1/p62 (рис. 1b). Содержание убиквитин-связывающего каркасного белка SQSTM1/p62, участвующего в образовании аутофагосом, напротив, имеет обратную корреляцию с активацией аутофагии, так как этот белок подвергается деструкции в лизосомах. Как известно, этот маркер достоверно снижается в клетках или тканях при активации процессов аутофагии и возрастает при ее подавлении. Как видно из данных, представленных на рис. 1b, уровень этого маркера при действии одной перекиси водорода мало меняется по сравнению с контролем через 0.5, 1 и 2 ч от начала действия перекиси водорода на нейроны. При этом через 4 и 6 ч после инициации окислительного стресса происходит значительное, почти двукратное снижение уровня этого маркера в нейронах. Это, как и увеличение уровня LC3B-II, свидетельствует о значительной активации процессов аутофагии в нервных клетках на этих сроках после начала воздействия прооксиданта. Преинкубация с инсулином значительно и достоверно повышает уровень SQSTM1/p62 в нейронах до контрольных величин через 4 и 6 ч после начала действия перекиси водорода. Статистически значимое повышение уровня этого маркера под влиянием инсулина имеет место и через 2 ч после начала действия прооксиданта. Таким образом, данные, полученные при изучении изменения уровня двух маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62), свидетельствуют об ингибировании инсулином чрезмерной активации процессов аутофагии в условиях окислительного стресса, о способности инсулина снижать ее интенсивность практически до уровня контроля.

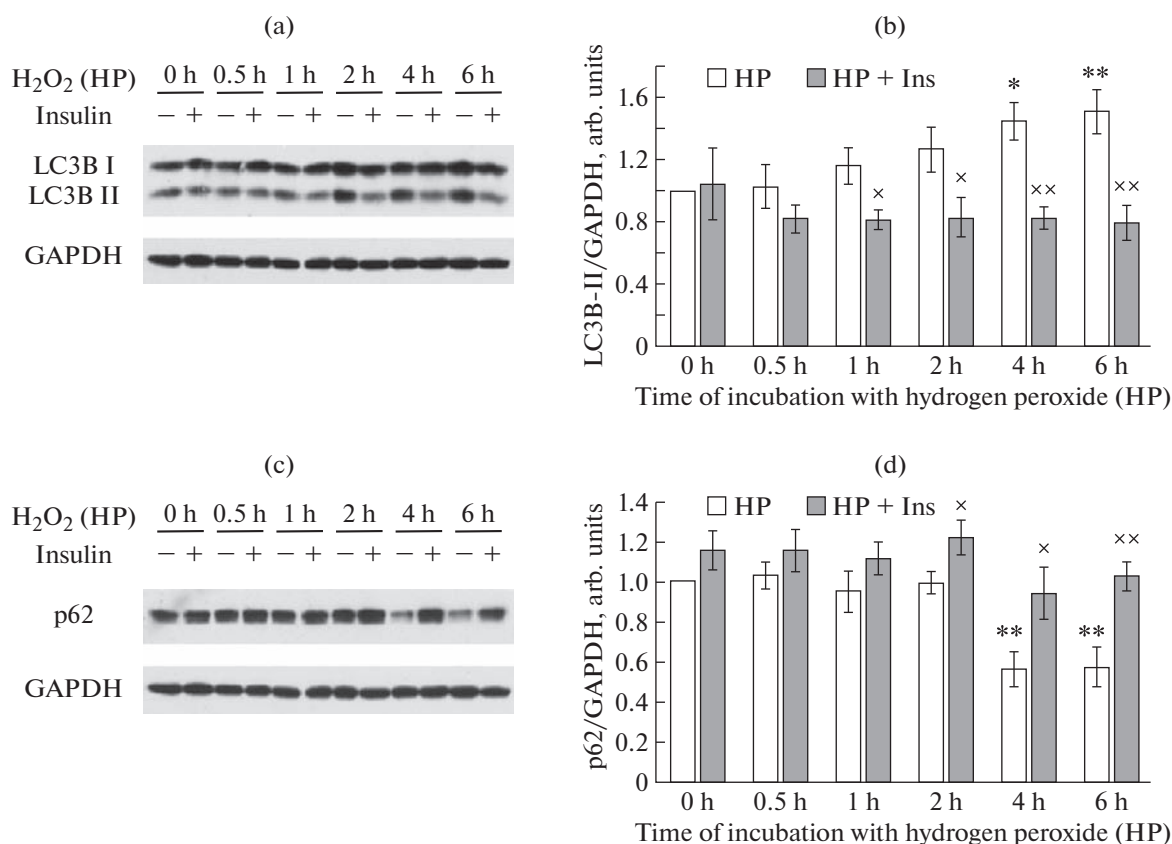


Рис. 1. Эффект инсулина и перекиси водорода на уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) в нейронах коры мозга крыс на разных этапах развития окислительного стресса. (a) и (b) – изменение уровня LC3B-II, (c) и (d) – изменение уровня sqstm1/p62. (a) и (c) – иммуноблоты, (b) и (d) – результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 4-5$) представлены как среднее \pm SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение разного времени. Сокращения на рисунке: HP – перекись водорода, Ins – инсулин. Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$, по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

Следует отметить, что в присутствии BMS-754807, ингибитора рецепторов инсулина и IGF-1, эффект инсулина на уровень маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62 полностью пропадал (рис. 2b и 2d), в этом случае уровень маркеров аутофагии при действии на нейроны инсулина и перекиси водорода достоверно не отличался от их уровня при действии одного прооксиданта. Эти данные свидетельствуют о том, что нейропротекторное действие инсулина при чрезмерной активации аутофагии в нервных клетках опосредуется через рецепторы самого инсулина и IGF-1.

Изучалось также воздействие ингибиторов аутофагии и апоптоза на уровень маркеров аутофагии в нейронах коры мозга в условиях окислительного стресса. Ингибитор аутофагии (3-MA) достоверно снижал содержание LC3B-II в нейронах, увеличенное под действием перекиси водорода (рис. 2b) до уровня, характерного для контроля. При этом этот ингибитор, напротив, достоверно повышал, практически также до контрольных величин, уровень другого маркера аутофагии –

SQSTM1/p62, который значительно и достоверно снижался в нейронах при действии на них перекиси водорода (рис. 2d). Эти данные показывают, что при действии такого прооксиданта, как перекись водорода, в нейронах коры мозга происходит активация аутофагии, тогда как преинкубация клеток с ингибитором аутофагии, как и следовало ожидать, предотвращает изменения экспрессии характерных для данного процесса маркеров, делая их уровень сходным с уровнем в контроле.

Представляло интерес также проверить, оказывает ли влияние интенсивность апоптотических процессов, развивающихся при действии прооксиданта, на интенсивность аутофагии. Однако нами не выявлено достоверных изменений в уровне обоих изученных маркеров аутофагии под воздействием z-DEVD-FMK, ингибитора каспазы-3 и апоптотических процессов (рис. 2b и 2d). Уровень LC3B-II и SQSTM1/p62 в нейронах коры мозга под воздействием перекиси водорода и z-DEVD-FMK достоверно не отличался от их уровня, наблюдавшегося при действии одной перекиси водорода.

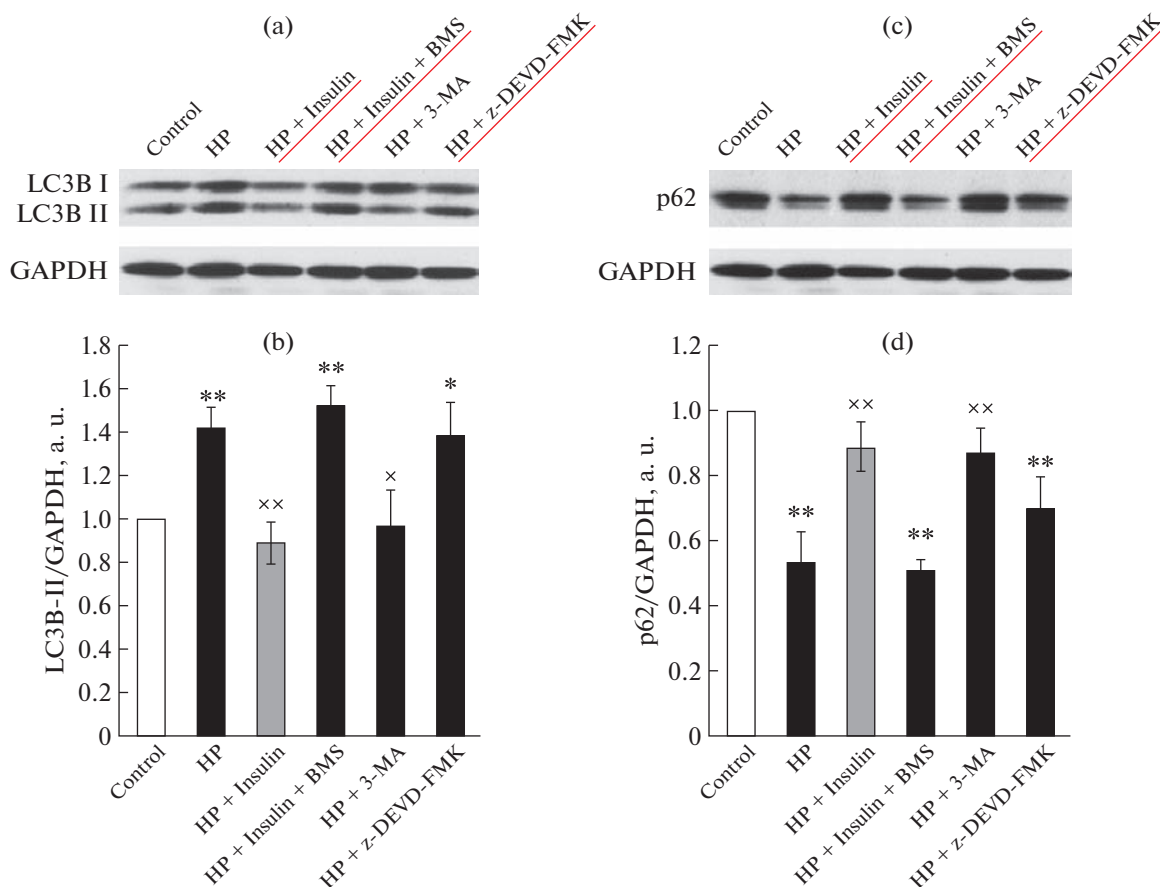


Рис. 2. Эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-MA) и апоптоза (z-DEVD-FMK) на уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и SQSTM1/p62) в нейронах коры мозга крыс в культуре, подвергнутых действию перекиси водорода. (a) и (b) – изменение уровня LC3B-II, (c) и (d) – изменение уровня SQSTM1/p62. (a) и (c) – иммуноблоты, (b) и (d) – результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 6$) представлены как среднее \pm SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, либо в течение 30 мин с 5 мМ 3-MA или 5 мкМ z-DEVD-FMK, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение 6 ч. Сокращения на рисунке: HP – перекись водорода, 3-MA – 3-метилаланин, BMS – BMS-754807 (ингибитор рецепторов инсулина и IGF-1). Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$, по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

Перекись водорода достоверно увеличивала (более, чем в 2 раза) активность каспазы-3 (содержание расщепленного фрагмента 17–19 кДа) в нейронах коры мозга ($p < 0.02$) через 6 ч после ее добавления (рис. 3a). Через 4 ч после аппликации прооксиданта активность каспазы-3 возрастала в 1.5 раза, но большой разброс данных делал это увеличение недостоверным. Инсулин достоверно снижал активность каспазы-3, а значит и апоптотическую гибель клеток через 6 ч после аппликации перекиси водорода (рис. 3a). На некоторых более ранних сроках окислительного стресса, например, через 2 ч после начала действия перекиси водорода, наблюдалась тенденция к снижению расщепленной каспазы-3 (17–19 кДа), но различия не были достоверными ($p = 0.06$).

Нами было показано (рис. 3b) увеличение активности каспазы-3 через 6 ч после аппликации перекиси водорода, и снижение активации каспа-

зы-3 под влиянием преинкубации с инсулином на этом сроке воздействия перекиси водорода ($p < 0.02$). Интересно отметить, что в присутствии ингибитора рецепторов инсулина и IGF-1 (BMS-754807) эффект инсулина полностью исчезал (рис. 3d). Это свидетельствует о том, что инсулин осуществляет свое антиапоптотическое действие на нейроны коры мозга в культуре, взаимодействуя со своими рецепторами и рецепторами IGF-1 на этих клетках.

Мы попытались также выявить, используя ингибитор 3-MA, влияние ингибирования аутофагии на интенсивность апоптоза и апоптотической гибели клеток. Однако в условиях окислительного стресса в присутствии ингибитора аутофагии 3-MA накопление расщепленного фрагмента каспазы-3 (17–19 кДа), показывающее степень гибели нейронов от апоптоза, в условиях наших опытов не претерпело достоверных изменений (рис. 3d).

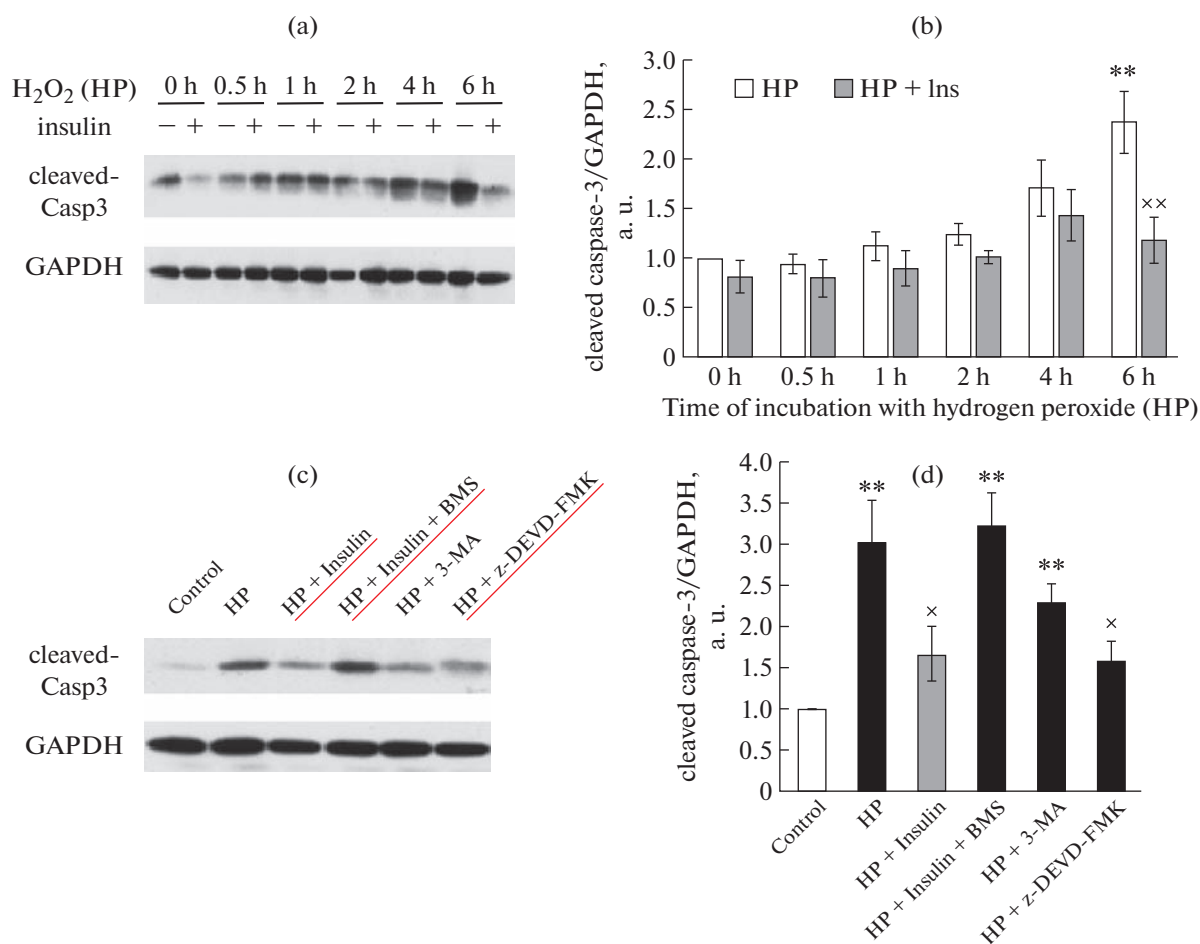


Рис. 3. Эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-МА) и апоптоза (z-DEVD-FMK) на уровень расщепленной каспазы-3 (маркер апоптоза) в нейронах коры мозга крыс в культуре, подвергнутых действию перекиси водорода. (а) и (b) – эффект инсулина и перекиси водорода на уровень расщепленной каспазы-3 (17–19 кДа) в нейронах на разных этапах развития окислительного стресса. (с) и (d) – эффект инсулина, 3-МА и z-DEVD-FMK на уровень расщепленной каспазы-3 (17–19 кДа) в нейронах на позднем этапе действия перекиси водорода (6 ч). (а) и (с) – иммуноблоты, (b) и (d) – результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 4-5$ для В и $n = 6$ для D) представлены как среднее \pm SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина или в течение 30 мин с 3-МА или с z-DEVD-FMK, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение разного времени. Сокращения на рисунке: HP – перекиси водорода, Ins – инсулин, 3-МА – 3-метилаланин, BMS – BMS-754807 (ингибитор рецепторов инсулина и IGF-1). Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * и ** – по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

Перед нами стояла также задача выявить, влиянием на какие сигнальные пути можно объяснить ингибирование инсулином аутофагии и аутофагической гибели клеток, а также апоптоза и апоптотической гибели клеток. Для этого мы проверили, как влияют в условиях наших опытов перекись водорода и инсулин на активность протеинкиназ Akt, GSK3-beta и AMPK и на соотношение проапоптотического белка Вах и антиапоптотического белка Bcl-2 (Вах/Bcl-2).

Как видно из представленных на рисунке данных, активность протеинкиназы В (Akt) в нейронах коры мозга через 6 ч после аппликации перекиси водорода мало отличается от контрольных величин (рис. 4b). Но, если клетки в культуре преинкуби-

вали с инсулином, то активность Akt остается очень высокой и через 6 ч после воздействия перекиси водорода, при этом она более, чем в 6 раз превышает активность в контроле и при действии одной перекиси водорода (рис. 4а). Активация Akt лежит в основе защитного действия инсулина. Хорошо известно и документировано антиапоптотическое действие инсулина, основанное на активации Akt. В его реализации важную роль играет инактивация при действии Akt протеинкиназы GSK-3beta благодаря ее фосфорилированию по Ser⁹. Как видно из данных, представленных на рисунке, через 6 ч после аппликации перекиси водорода активность этой протеинкиназы в нейронах мало отличается от контрольных величин. Но, если

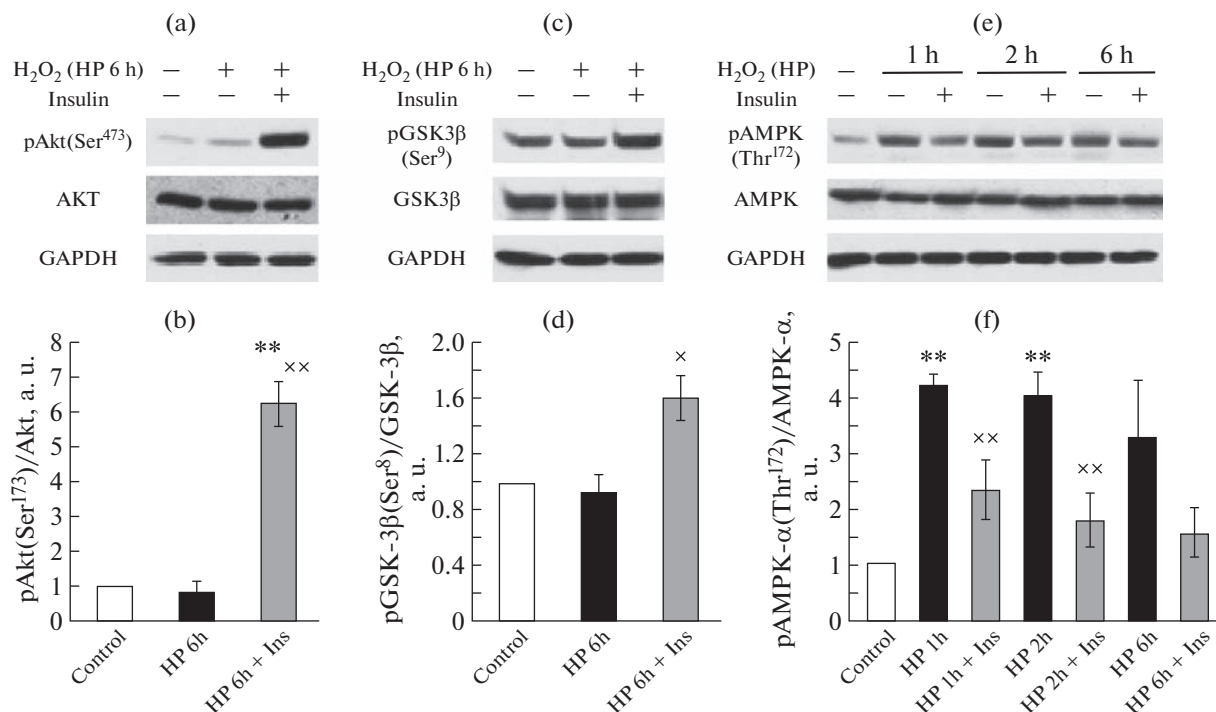


Рис. 4. Влияние перекиси водорода и инсулина на активность протеинкиназы B (Akt), GSK-3beta и AMPK в нейронах коры мозга крыс. (a) и (b) – активность протеинкиназы B (Akt) определяли по уровню pAkt (Ser⁴⁷³), (c) и (d) – степень инактивации GSK 3-beta – по уровню pGSK-3beta (Ser⁹), (e) и (f) – активность протеинкиназы AMPK – по уровню pAMPK (Thr¹⁷²). (a), (c) и (f) – иммуноблоты, (b), (d) и (f) – результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 5-7$) представлены как среднее \pm SEM. Данные выражали в виде соотношения содержания фосфорилированного фермента к его общему содержанию: pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt (a), pGSK-3beta (Ser⁹)/GSK-3beta (b), pAMPK-alpha (Thr¹⁷²)/AMPK-alpha (c). Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, а затем подвергали воздействию 100 мкМ перекиси водорода в течение 6 ч. Сокращения на рисунке: HP – перекись водорода, Ins – инсулин. Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: ** – $p < 0.02$ по сравнению с эффектом одной перекиси водорода; x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

нейроны преинкубировали с инсулином, то на этом сроке действия перекиси водорода в пробах достоверно и довольно значительно повышен уровень этого фермента, фосфорилированного по Ser⁹ (рис. 4b). Это свидетельствует о том, что под влиянием инсулина происходит инактивация GSK-3beta, что очень важно для поддержания жизнеспособности нейронов, т.к. при активации этой протеинкиназы нарушаются функции митохондрий этих клеток, что может приводить к их апоптотической гибели.

Нужно также отметить, что активация Akt может приводить к ингибированию аутофагических процессов, к предотвращению чрезмерной активации аутофагии, приводящей к гибели нервных клеток. Так, активация сигнального пути Akt–mTOR, как известно, приводит к ингибированию процессов аутофагии.

Для объяснения механизма защитного эффекта инсулина, связанного с подавлением процессов аутофагии и аутофагической гибели нервных клеток, важно было также изучить влияние инсулина на активность AMPK (рис. 4c). Как известно, активация этой протеинкиназы является триггером

процесса аутофагии. Как видно из данных, представленных на рис. 4c, инсулин достоверно и более чем в 2 раза уменьшает активность AMPK через 1 и 2 ч после начала действия перекиси водорода. Через 6 ч после начала действия перекиси водорода наблюдается тенденция к снижению инсулином активности этой протеинкиназы ($p < 0.1$, но $p > 0.05$), но его эффект становится недостоверным. По-видимому, значительное снижение активности фермента инсулином через 1 ч и 2 ч после начала действия перекиси водорода приводит к уменьшению интенсивности аутофагического процесса не только на этих, но и на последующих временных промежутках.

Нами также показаны значительное увеличение отношения проапоптотического белка Вах к антиапоптотическому белку Bcl-2 (Вах/Bcl-2) под действием на нейроны коры мозга перекиси водорода и нормализация этого отношения под влиянием инсулина (рис. 5b и c).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аутофагия представляет собой “самопоедание”, катаболический путь, с помощью которого долго-

живущие белки, поврежденные клеточные органеллы и неправильно свернутые белки подвергаются деградации и затем вновь используются для поддержания гомеостаза клеток и их нормального функционирования. Для доставки подлежащих утилизации белков или компонентов клетки в лизосомы для их дальнейшего использования природа создала специальные частицы – аутофагосомы. Они представляют собой покрытые двойной оболочкой вакуоли, содержащие цитоплазму клеток с включенными в нее митохондриями или другими органеллами. Долгое время считалось, что аутофагия играет только защитную роль, в том числе и в ЦНС, предохраняя нейроны и другие клетки мозга от пагубного влияния стрессорных воздействий, в том числе от ишемии мозга и его последующей реперфузии. При этом защитный эффект нейропротекторов при разных формах ишемии и реперфузии приписывали преимущественно их способности противостоять апоптотической и некротической гибели нервных клеток. Но в настоящее время представления об исключительно защитном воздействии аутофагии на клетки разных органов пересмотрены. Так, в современной литературе есть многочисленные примеры того, что активация аутофагии может приводить к гибели нейронов при различных поражениях мозга, особенно при сильных воздействиях на него. Так, получены свидетельства того, что защитный эффект многих нейропротекторов при ишемии и реперфузии мозга связан прежде всего с их способностью ингибировать и аутофагические, и апоптотические процессы, предотвращая таким образом гибель нервных клеток мозга. К таким протекторам относятся некоторые флавоноиды, ганглиозид GM1, финголимод (аналог сфингозин-1-фосфата), N-ацетил-серотонин (предшественник мелатонина) и многие другие соединения [13–17, 27, 28].

Настоящая работа посвящена изучению роли антиаутофагического и антиапоптотического эффектов инсулина в его нейропротекторном действии на нейроны коры мозга в культуре в условиях окислительного стресса. Было найдено, что основными причинами гибели нейронов коры мозга крыс в культуре при токсическом действии на них перекиси водорода являются аутофагия и апоптоз. Показано повышение жизнеспособности нейронов при действии на них ингибитора аутофагии (3-MA) или апоптоза (z-DEVD-FMK). При этом нейропротекторный эффект инсулина более выражен, чем эффект ингибиторов аутофагии или апоптоза по отдельности. Интересно отметить, что при совместном действии на нейроны коры мозга в культуре ингибитора аутофагии и инсулина защитный эффект был достоверно выше, чем при действии одного из этих двух протекторов. А также при совместном действии ингибитора апоптоза и инсулина защитный эффект был выше, чем при действии одного из этих соединений. В совокупности полу-

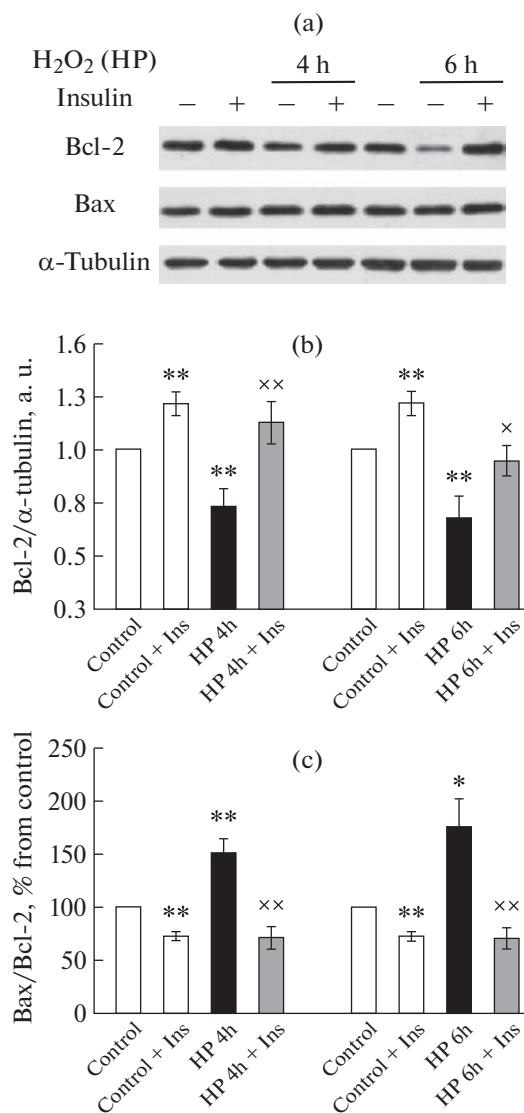


Рис. 5. Влияние инсулина и перекиси водорода на уровень антиапоптотического белка Bcl-2 и отношение Bax/Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс в культуре. (a) и (b) – влияние инсулина и перекиси водорода на уровень Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс. (c) – влияние инсулина и перекиси водорода на отношение Bax/Bcl-2 в нейронах коры мозга крыс. (a) – иммуноблоты, (b) и (c) – результаты денситометрии проведенных опытов ($n = 8$) представлены как среднее \pm SEM. Нейроны коры мозга крыс преинкубировали в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, а затем подвергали воздействию перекиси водорода в течение 6 ч. Сокращения на рисунке: HP – перекись водорода, Ins – инсулин. Различия достоверны по сравнению с контрольными величинами: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.02$, по сравнению с эффектом одной перекиси водорода: x – $p < 0.05$, xx – $p < 0.02$.

ченные данные позволяют прийти к выводу, что инсулин способен снижать как аутофагическую, так и апоптотическую гибель нейронов коры мозга в опытах *in vitro*.

Способность инсулина ингибировать процессы аутофагии (и, соответственно, аутофагической гибели нейронов при патологических воздействиях, приводящих к чрезмерной активации этого процесса) была подтверждена в опытах по изучению воздействия инсулина на уровень маркеров аутофагии LC3B-II и SQSTM1/p62. В настоящей работе найдено, что такой прооксидант, как перекись водорода, достоверно увеличивает в нейронах уровень маркера аутофагии LC3B-II, и, напротив, уменьшает уровень другого маркера SQSTM1/p62, для которого характерно снижение его уровня при активации аутофагии. Впервые показано, что инсулин при этом нормализует уровень маркеров аутофагии в нейронах, изменяя их содержание практически до контрольных значений. Таким образом, впервые показано, что инсулин способен ингибировать процессы аутофагии в нейронах, активированные при неблагоприятном воздействии на эти клетки.

Найдено, что в условиях наших опытов перекись водорода активировала процессы аутофагии и апоптоза, что приводило к гибели нейронов коры мозга. В присутствии ингибиторов аутофагии или апоптоза (3-MA или z-DEVD-FMK, соответственно) гибель нейронов значительно и достоверно снижалась (более чем на 35% в присутствии каждого из ингибиторов). Это свидетельствует о том, что активация каждого из этих процессов приводит к гибели значительной части нейронов. Инсулин же в случае преинкубации с ним нейронов коры мозга в значительно большей мере, чем ингибитор аутофагии или апоптоза, повышал жизнеспособность нейронов коры мозга. При этом он снижал интенсивность аутофагии и апоптоза, нормализуя уровень маркеров аутофагии (LC3B-II и p62) и апоптоза (расщепленная каспаза-3). Совокупность этих данных позволяет сделать вывод, что инсулин способен достоверно снижать интенсивность аутофагии и апоптоза и в значительной мере предотвращать не только апоптотическую, но и аутофагическую гибель нейронов коры мозга в условиях окислительного стресса в опытах *in vitro*.

Наши данные согласуются с данными других авторов, в литературе есть свидетельства того, что инсулин ингибирует процессы аутофагии в экстракстрактивных клетках и органах. Так, найдено, что этот протектор ингибирует процессы аутофагии в скелетных мышцах, усиливая фосфорилирование протеинкиназы ULK-1 по Ser⁷⁵⁷ (ингибирующий сайт) [29]. Наряду с этим найдено, что инсулин ингибирует процессы аутофагии в хондроцитах человека [30]. В этих клетках инсулин уменьшает уровень LC3-II и усиливает фосфорилирование Akt и рибосомной S6 киназы, активируя эти протеинкиназы, ингибирующие процессы аутофагии [30].

Получены также данные о том, что инсулин снижает в нейронах уровень одного из маркеров

апоптоза (расщепленной каспазы-3). Эти данные согласуются с аналогичными данными, полученными ранее другими авторами, свидетельствующими о том, что нейропротекторный эффект инсулина в большой мере зависит от его способности ингибировать апоптотические процессы в нервных клетках [31–33].

Среди сигнальных систем, регулирующих процессы аутофагии, важную роль играет протеинкиназа AMPK, способная инициировать процессы аутофагии при накоплении аденозинмонофосфата (AMP), которое может происходить, в частности, при недостатке пищи. Наряду с этим в регуляции процессов аутофагии у млекопитающих активно участвует mTOR комплекс 1 (mTORC1), ингибирующий процессы аутофагии, благодаря в том числе фосфорилированию регуляторно-ассоциированного с mTOR белка Raptor или TSC2. При нормальных условиях существования нервных клеток и достаточном количестве пищи уровень AMP и, соответственно, активность AMPK относительно низки, а комплекс mTORC1 гиперактивирован. Напротив, при различных стрессорных и неблагоприятных воздействиях на мозг, в том числе при ишемии и реперфузии мозга, либо при неблагоприятных воздействиях на нервные клетки в культуре, происходит активация AMPK. К этим стрессорным факторам относятся увеличение уровня AMP, уменьшение уровня АТФ, увеличение образования активных форм кислорода (АФК) и концентрации цитозольного кальция. Все эти факторы способствуют активации протеинкиназы AMPK и ингибированию Akt и mTOR, что запускает аутофагию.

Для выяснения механизма действия инсулина важно было показать, как он влияет на активность протеинкиназ AMPK-alpha и Akt. Нами найдено, что в условиях наших опытов перекись водорода достоверно активировала, а инсулин ингибировал активность протеинкиназы AMPK-alpha через 1 и 2 ч после аппликации перекиси водорода (рис. 4с). Через 6 ч после аппликации перекиси водорода наблюдались тенденция к увеличению активности AMPK-alpha под влиянием перекиси водорода и тенденция к уменьшению активности этого фермента под влиянием инсулина, но различия не были достоверными из-за большого разброса данных, чем на более ранних этапах воздействия прооксиданта. Ранее способность инсулина ингибировать активность AMPK-alpha была показана *in vivo* в ряде районов гиппокампа при изучении механизмов регуляции пищевого поведения животных [34]. Ингибирование инсулином активности AMPK-alpha было ранее отмечено также в экстракстрактивных клетках и органах (см., например, [35]).

Наряду с этим в настоящей работе показано, что инсулин активирует сигнальный путь PI3K-Akt1 (рис. 4а), который активирует комплекс mTORC1,

являющийся действенным ингибитором аутофагии. Нами показано, что в условиях наших опытов через 6 ч после добавления к нейронам коры мозга перекиси водорода ее эффект на активность Akt не выражен. На более ранних этапах своего воздействия перекись водорода способна активировать эту протеинкиназу [36]. Но и при этом относительно длительном сроке воздействия перекиси водорода инсулин многократно активирует эту протеинкиназу. Активация Akt инсулином лежит в основе его защитного эффекта на клетки, подвергнутые действию токсических веществ.

Способность инсулина противостоять апоптотической гибели нейронов в условиях окислительного стресса показана в ряде ранее опубликованных работ [см., например, [31–33]. В настоящей работе нами найдено, что перекись водорода достоверно увеличивает, а инсулин достоверно снижает активность каспазы-3 в нейронах коры мозга через 6 ч после аппликации перекиси водорода (рис. 3а, 3б, 3с, 3д). Что касается механизма антиапоптотического эффекта инсулина, то в основе его, по-видимому, лежит способность активировать Akt (рис. 4а), которая затем фосфорилирует по Ser⁹ и таким образом инактивирует GSK-3 β . Дело в том, что чрезмерная активация этого фермента приводит к нарушению метаболизма и функций митохондрий в клетках, в том числе в нервных [37]. Способность инсулина фосфорилировать по Ser⁹ и таким образом инактивировать GSK-3 β в нейронах была до нас показана и в других работах (см., например, [37, 38]). Нейропротекторный эффект активации Akt инсулином заключается также в способности активированной Akt увеличивать синтез антиапоптотического белка митохондрий Bcl-2 и снижать отношение Bax/Bcl-2 в нейронах. В этом отношении наши данные согласуются с данными Дуарте и соавт. [39].

Таким образом, в основе способности инсулина ингибировать чрезмерную активацию аутофагии и аутофагическую гибель нейронов в условиях окислительного стресса лежит, очевидно, его способность ингибировать активность энергетического сенсора AMPK- α и активировать протеинкиназу Akt, которая, в свою очередь, обладает способностью активировать комплекс mTORC1, ингибирующий процессы аутофагии. Способность же инсулина противостоять апоптотической гибели нейронов при окислительном стрессе определяется, очевидно, прежде всего его способностью активировать протеинкиназу Akt которая, фосфорилируя протеинкиназу GSK-3 β по Ser⁹, приводит к ее инактивации и таким образом предотвращает нарушение функций митохондрий. Активация Akt также способствует увеличению синтеза антиапоптотического белка Bcl-2.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

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 этического комитета ИЭФБ РАН № 1-11/2022, от 27.01.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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>
2. *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>
3. *Farzampour S, Majdi A, Sadigh-Eteghad S* (2016) Intranasal insulin treatment improves memory and learning in a rat amyloid-beta model of Alzheimer's disease. *Physiol Int* 103 (3): 344–353. <https://doi.org/10.1556/2060.103.2016.3.7>
4. *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>
5. *Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, Donohue MC, Brewer JB, Jenkins C, Harless K, Gessert D, Aisen PS* (2020) Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia. *JAMA Neurol* 77 (9): 1099–1109. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1840>
6. *Hallschmid M* (2021) Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* 35 (1): 21–37. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00781-x>
7. *Woodfield A, Gonzales T, Helmerhorst E, Laws S, News-holme P, Porter T, Verdile G* (2022) Current Insights on the Use of Insulin and the Potential Use of Insulin Mi-

- metics in Targeting Insulin Signalling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 23 (24):15811.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415811>
8. *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>
 9. *Rizk NN, Rafols JA, Dunbar JC* (2006) Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. *Brain Res* 1096 (1): 204–212.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.060>
 10. *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>
 11. *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 Physiol* 54 (3): 246–250.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018030109>
 12. *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.
 13. *Huang SM, Tsai SY, Lin JA, Wu CH, Yen GC* (2012) Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid β -induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. *Mol Nutr Food Res* 5: 601–609.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201100682>
 14. *Wang M, Li YJ, Ding Y, Zhang HN, Sun T, Zhang K, Yang L, Guo YY, Liu SB, Zhao MG, Qu YM* (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>
 15. *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>
 16. *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>
 17. *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>
 18. *Nabavi SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima DK, Ahmed T, Shahid M* (2019) Novel therapeutic strategies for stroke: the role of autophagy. *Critical Rev Clin Lab Sci* 56 (3): 182–199.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1575333>
 19. *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)
 20. *He C, Xu Y, Sun J, Li L, Zhang JH, Wang Y* (2023) Autophagy and apoptosis in acute brain injuries: From mechanism to treatment. *Antioxid Redox Signal* 38 (1–3): 234–257.
<https://doi.org/10.1089/ars.2021.0094>
 21. *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 C1 region and frontal cortex under forebrain ischemia-reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 59 (1): 45–57.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010040>
 22. *Dichter MA* (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res* 149: 279–293.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90476-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90476-6)
 23. *Mironova EV, Evstratova AA, Antonov SM* (2007) A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J Neurosci Methods* 163 (1): 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.010>
 24. *Hansen MB, Nielsen SE, Berg K* (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Immunol Methods* 119 (2): 203–210.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9)
 25. *Zakharova O, Sokolova TV, Bayunova LV, Vlasova YA, Rychkova MP, Avrova NF* (2012) α -Tocopherol in nanomolar concentrations protects PC12 cells from hydrogen peroxide-induced death and modulates protein kinase activities. *Int J Mol Sci* 13: 11543–11668.
<https://doi.org/10.3390/ijms130911543>
 26. *Zakharova IO, Sokolova TV, Zorina II, Bayunova LV, Rychkova MP, Avrova NF* (2018) Protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on modulation of protein kinase B (Akt) activity. *J Evol Biochem Physiol* 54 (3): 192–205.
<https://doi.org/10.134/S0022093018030043>
 27. *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-acetylserotonin 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>
 28. *Li X, Wang M, Qin C, Fan WH, Tian DS, Liu JL* (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>
 29. *Moller AB, Voss TS, Vendelbo MH, Pedersen SB, Moller N, Jessen N* (2018) Insulin inhibits autophagy signaling independent of counter-regulatory hormone levels, but does not affect the effects of exercise. *J Appl Physiol* 125: 1204–1209.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00490.2018>

30. *Ribeiro M, Lopes de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Carames B* (2016) Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* 24 (4): 731–739.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.017>
31. *Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW* (2001) Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 276 (35): 32814–32821.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M104738200>
32. *Yu XR, Jia GR, Gao GD, Wang SH, Han Y, Cao W.* (2006) Neuroprotection of insulin against oxidative stress-induced apoptosis in cultured retinal neurons: involvement of phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38 (4): 241–248.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00152.x>
33. *Liu Q, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y* (2023) Insulin ameliorates dim blue light at night-induced apoptosis in hippocampal neurons via the IR/IRS1/AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf* 250: 114488.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114488>
34. *Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fougelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck B.J, Kahn BB* (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569–574.
<https://doi.org/10.1038/nature02440>
35. *Valentine RJ, Coughlan KA, Ruderman NB, Saha AK* (2014) Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 562: 62–69.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.013>
36. *Zakharova IO, Sokolova TV, Bayunova LV, Zorina II, Rychkova MP, Shpakov AO, Avrova NF* (2019) The protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on the modulation of Akt, GSK-3 β , ERK1/2, and AMPK Activities. *Int J Mol Sci* 20 (15): 3702.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153702>
37. *Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasinelli C, Thiernemann C, Boccuzzi G, Fantozzi R* (2009) Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3 β . *Diabetes* 58 (1):235–242.
<https://doi.org/10.2337/db08-0691>
38. *Kim B, Sullivan KA, Backus C, Feldman EL* (2011) Cortical neurons develop insulin resistance and blunted Akt signaling. A potential mechanism contributing to enhanced ischemic injury in diabetes. *Antioxid Redox Sign* 14: 1829–1839.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.381632>
39. *Duarte AI, Santos P, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC* (2008) Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 signaling pathways and changes in protein expression. *Biochim Biophys Acta* 1783: 994–1002.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.016>

THE INHIBITION OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS BY INSULIN AS A BASIS OF ITS NEUROPROTECTIVE ACTION ON RAT BRAIN CORTICAL NEURONS UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS IN VITRO

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

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia*

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

Insulin is one of the most promising neuroprotectors. A significant gap in understanding the mechanism of its action is the lack of data on whether it is able to prevent autophagic neuronal death. The aim of our work was to evaluate the contribution of autophagy and apoptosis to the death of rat cerebral cortex neurons in culture under oxidative stress and to study the ability of insulin to prevent this death and inhibit autophagy and apoptosis in neurons. The influence of hydrogen peroxide and insulin on the level of two main autophagy markers (LC3B-II and SQSTM1/p62) and apoptosis marker (cleaved caspase-3) was studied. To assess the viability of neurons, the MTT test was used, and Western blotting was applied to measure the level of marker proteins. It was found that oxidative stress caused the activation of autophagy and apoptosis in neurons. This is manifested in a significant increase of the autophagy marker LC3B-II and apoptosis marker (cleaved caspase-3) and in a decrease in the SQSTM1/p62 protein level. The content of SQSTM1/p62, which is involved in the formation of autophagosomes, decreases with the activation of autophagy, as this protein is degraded in lysosomes. Hydrogen peroxide causes autophagic and apoptotic death of neurons, as the inhibitors of autophagy (3-methyl adenine) and apoptosis (z-DEVD-FMK) were shown to increase the viability of neurons in conditions of oxidative stress. Insulin, in its turn, prevents the death of neurons and hinders autophagy, causing a decrease of the level of lipidated form LC3B-II and the increase of the SQSTM1/p62 protein level, it hinders apoptosis as well decreasing the level of cleaved caspase-3. The protective effect of insulin is mediated by the activation of specific signaling pathways associated with receptors of insulin and IGF-1, as the inhibitor of these receptors BMS-754807 completely blocks the neuroprotective effect of insulin. Thus, the pronounced activation of autophagy under oxidative stress is one of the causes of neuron death, and the protection of neurons by insulin is associated with the suppression of not only apoptotic, but also autophagic cell death.

Keywords: brain cortical neurons, oxidative stress, insulin, autophagy, apoptosis

ХРОНИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ ТРАНСМИССИИ В ГИППОКАМПе КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ, ВЫЗВАННЫЕ МНОГОКРАТНЫМИ СУДОРОЖНЫМИ ПРИПАДКАМИ

© 2023 г. Е. П. Александрова¹, А. П. Ивлев¹, А. А. Куликов¹,
Л. С. Никитина¹, М. В. Глазова¹, Е. В. Черниговская^{1,*}

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

*e-mail: chern755@mail.ru

Поступила в редакцию 22.05.2023 г.

После доработки 17.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Для височной эпилепсии характерно развитие сопутствующих неврологических нарушений и психических заболеваний. Одной из возможных причин их возникновения, очевидно, являются нарушения в балансе возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем гиппокампа. Хронические нарушения в молекулярных механизмах регуляции активности глутаматергической системы гиппокампа при височной эпилепсии в настоящее время малоизучены. В настоящей работе мы использовали крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ), подвергнутых многократным аудиогенным судорожным припадкам, для моделирования височной эпилепсии. Анализ молекулярных механизмов регуляции продукции глутамата нейронами гиппокампа был проведен через неделю после окончания стандартного (14 судорожных припадков) и длительного (21 судорожных припадков) киндлинга. В гиппокампе крыс КМ в результате киндлинга происходит активация ERK1/2-киназа, а также активация транскрипционного фактора CREB, усиление экспрессии глутаминазы и везикулярных транспортеров глутамата VGLUT1 и 2 и транскрипционного фактора Fga1, т.е. белков, отвечающих за продукцию глутамата. Эти данные свидетельствуют о повышении активности глутаматергических нейронов гиппокампа, сохраняющейся в течение недели после завершения последней аудиогенной стимуляции. Также показано усиление экспрессии mGluR1-рецепторов глутамата, активация которых приводит к высвобождению Ca²⁺ и может вызывать эксайтотоксичность. Долговременное усиление глутаматергической трансмиссии, вызванное многократными эпилептиформными припадками, является причиной не только дальнейшего эпилептогенеза, но и может лежать в основе развития нейродегенерации.

Ключевые слова: эпилепсия, крысы линии Крушинского–Молодкиной, аудиогенный киндлинг, глутамат, гиппокамп

DOI: 10.31857/S0044452923050029, EDN: KJRGJR

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия является широко распространенным неврологическим заболеванием. При этом для эпилепсии характерна высокая распространенность сопутствующих заболеваний, в том числе показано, что многочисленные психические и соматические заболевания чаще встречаются и более опасны у людей, больных эпилепсией. Наиболее серьезные патологические последствия эпилепсии включают структурные и функциональные заболевания центральной нервной системы, такие как инсульт, деменция и мигрень. Также среди больных эпилепсией часто встречаются сопутствующие психические заболевания — депрессия и повышенная тревожность [1, 2].

Подобные неврологические и психические нарушения выявлены и на экспериментальных моделях эпилепсии [3]. Одной из таких моделей эпилепсии является формирование киндлинга, когда ежедневная электрическая стимуляция определенных областей мозга, введение пороговых доз хемоконвульсантов или звуковая стимуляция животных, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, приводят к постепенному развитию и усилению лимбических генерализованных судорог. При различных видах киндлинга также наблюдаются нарушения в пространственном ориентировании, снижение исследовательской активности, повышенная тревожность и депрессивно-подобное поведение, сохраняющиеся длительное время [4–8]. Причем даже формирование киндлинга при небольшом числе

стимуляций вызывает устойчивые изменения в эмоциональном поведении у крыс, выражающиеся в усилении тревожности и оборонительного поведения и сохраняющиеся, по крайней мере, в течение двух месяцев после последней стимуляции [9]. Таким образом, при моделировании развития височной эпилепсии наблюдаются длительно сохраняющиеся неврологические нарушения.

В основе неврологических нарушений при повторяющихся эпилептических припадках лежат прогрессирующие патологические и функциональные изменения в нервной системе, возникающие за счет нарушений молекулярных механизмов регуляции пластичности нейронов, обеспечивающих преобразование краткосрочной активности в долгосрочные изменения. При эпилепсии происходит кратковременная активация рецепторов, которая вызывает нарушения в работе внутриклеточных сигнальных каскадов, это приводит к изменению экспрессии генов в нейронах, что, вероятно, является причиной прогрессирующей патологии [10]. Активация генов, сопровождающаяся повышенной транскрипцией матричной РНК, в последующие часы приводит к усилению синтеза белков, что, в свою очередь, вызывает морфологические и анатомические изменения [10]. На пациентах и на экспериментальных моделях показаны аномальное прорастание мшистых волокон, синаптическая реорганизация, потеря нейронов и глиоз в различных отделах мозга, в частности, в гиппокампе [10–12]. На фармакологических моделях эпилепсии на животных гранулярные клетки зубчатой извилины гипервозбуждаются как сразу после развития эпилептического статуса [13], так и во время латентного периода, что было показано на модели развития височной эпилепсии [14]. Повышенная возбудимость гранулярных клеток также была зарегистрирована во время хронической формы височной эпилепсии в гиппокампе человека и на модели эпилепсии, сопровождающейся гиппокампальным склерозом [15].

Несмотря на очевидность существования многочисленных нарушений в активности вторичных сигнальных каскадов, отвечающих за состояние нейронов при эпилепсии, в настоящее время крайне мало данных о хронических нарушениях в молекулярных механизмах регуляции активности нейротрансмиттерных систем лимбической системы, в частности, гиппокампа. Однако очевидно, что возникновение подобных хронических нарушений может приводить к дальнейшему усилению тяжести заболевания, а также к развитию сопутствующих психических и соматических заболеваний. В настоящей работе мы использовали крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), подвергнутых длительной ежедневной экспозиции действию звука, вызывающей феномен киндлинга, для моделирования височной эпилепсии, что приводило к развитию лимбических генерализованных судорог.

Анализ молекулярных механизмов регуляции продукции глутамата нейронами гиппокампа через неделю после окончания стандартного (14 судорожных припадков) и длительного (21 судорожный припадок) аудиогенного киндлинга позволил выявить хронические нарушения в состоянии нейронов, возможно, являющиеся субстратом не только дальнейшего эпилептогенеза, но и возникновения неврологических нарушений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовали взрослых крыс КМ с полностью сформированной судорожной готовностью (Московский государственный университет, Россия). Крыс содержали по 4–5 животных в клетке при цикле день/ночь 12 ч/12 ч со свободным доступом к пище и воде.

Экспериментальные группы

Для оценки вызванных судорогами изменений в глутаматергической нейротрансмиссии в гиппокампе использовали аудиогенный киндлинг, модель лимбической эпилепсии. Аудиогенные судороги индуцировали один раз в день звуковой стимуляцией с частотой 10 кГц с помощью компьютерной программы NCH Tone Generator (© NCH Software, Австралия). Каждую крысу помещали в тестовую камеру для адаптации на 5 мин и затем подвергали воздействию акустического стимула. Проверяли на наличие и продолжительность стадий судорожного припадков, включающих латентный период, дикий бег, клонические и тонические судороги. Если в течение 1 мин стимуляции у животного не возникало судорог, его исключали из эксперимента, но доля таких животных составляла меньше одного процента. После повторных звуковых раздражений у животных появлялись дополнительная судорожная фаза, посттонический (лимбический) клонус, что свидетельствовало о возникновении лимбических припадков [16].

Было проведено два независимых эксперимента.

1. 14-дневная экспозиция действию звука. Крыс КМ подвергали 14 судорожным припадкам, что соответствует стадии развития лимбических генерализованных припадков. Крыс выводили из эксперимента через 7 дней (период отдыха) после последнего припадков ($n = 5$), группа 14 + 7.

2. 21-дневная экспозиция действию звука. Крыс КМ подвергали 21 судорожному припадку, что являлось моделью полностью развившейся лимбической эпилепсии со стабильными и тяжелыми лимбическими припадками. Крыс выводили из эксперимента через 7 дней (период отдыха) после последнего припадков ($n = 5$), группа 21 + 7.

3. Контрольные крысы КМ без опыта аудиогенных судорожных припадков ($n = 10$), наивная группа. Эти животные были выведены из эксперимента одновременно с экспериментальными крысами.

Поведенческий анализ

Во время аудиогенного киндлинга все судорожные припадки записывались на видео с последующим анализом продолжительности и тяжести всех стадий. Для оценки тяжести лимбических судорог, развивающихся во время аудиогенного киндлинга, мы ранее модифицировали шкалу Расина для крыс КМ [17]. Считалось, что у животных развивается лимбическая эпилепсия после того, как они демонстрировали 7 и более последовательных лимбических припадков (не менее 2–3 балла по шкале) [17]. Крысы, подвергавшиеся аудиогенной стимуляции в течение 14 и 21 дня не отличались достоверно по представленности проявлений компонентов лимбических судорог (4–5 баллов), но продолжительность лимбических судорог значительно возрастала после длительной экспозиции действию звука.

Материалы 1-го эксперимента использовали только для гистологического анализа, а материалы 2-го использовали для вестерн-блота и гистологического анализа эксперимента.

Подготовка материала для анализа

Крыс из 1-й группы ($n = 5$), половину крыс из 2-й группы ($n = 5$) и половину контрольных (наивных) крыс ($n = 5$) наркотизировали смесью золетил/ксилазин (60 мг/кг + 10 мг/кг; Virbac, Франция). Затем животных перфузировали транскардиально охлажденным 0.01 М фосфатно-буферным солевым раствором PBS, содержащим (в мМ) 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 1.76 KH₂PO₄, pH 7.4, затем 5%-ным раствором формалина и декапитировали. Мозг всех животных извлекали, постфиксировали в 5%-ном растворе формалина при 4°C в течение 5 дней, затем погружали в 20%-ный раствор сахарозы/PBS для криозащиты (4°C, 3 дня), далее замораживали и хранили при –80°C до дальнейшего использования.

Гистологический анализ

Срезы гиппокампа толщиной 10 мкм были изготовлены с помощью криостата (Leica, Германия). Изготавливали 15 чередующихся серий препаратов, содержащих фронтальные срезы дорсальных гиппокампов на одном уровне в росто-каудальном направлении. После стандартных предварительных процедур срезы одной из 15 серий инкубировали с первичными антителами к каждому исследуемому белку. Анализ глутаматергических клеток проводили с использованием антител против ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technolo-

gy, #4376; кроличьи, 1: 250); Fra1 (Invitrogen, # PA5-40361, кроличьи, 1: 100); CREB (Ser133, Novusbio, # NB300-273, кроличьи, 1:200); глутаминазы (Novusbio, #NBP2-67683, кроличьи, 1: 100); VGLUT1 (Millipore, # MAB5502, мышинные, 1: 500); VGLUT2 (Millipore, # MAB5504, мышинные, 1: 500); GAD67 (Millipore, # MAB5406, мышинные, 1–500); GluN2B (Invitrogen, # PA3-104, 1: 500). Затем срезы промывали в PBS и инкубировали в течение 1 ч с биотинилированными вторичными антителами (1:300, Vector Laboratories Inc.), после чего следовала часовая инкубация со стрептавидин-пероксидазным комплексом (1: 500, Supelco, #S2438). Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%).

Для анализа уровня активности глутаматергических нейронов проводили двойное иммуноокрашивание с использованием первичных антител против GAD67 (Millipore, # MAB5406, мышинные, 1: 500) и Fra1 (Invitrogen, # PA5-40361, кроличьи, 1: 100), что позволило исключить из обчетов ГАМК-ергические нейроны. В этом случае после инкубации с первичными моноклональными антителами против GAD67 срезы промывали в PBS и подвергали стандартной обработке биотинилированными вторичными моноклональными антителами (1:300, Vector Laboratories Inc.), после чего следовала часовая инкубация со стрептавидин-пероксидазным комплексом (1:500, Supelco, #S2438). Пероксидазную реакцию выявляли в буфере, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB, Sigma-Aldrich, #D5637) и перекись водорода (0.01%). Затем срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами против Fra1 и также проводили последующую иммуногистохимическую реакцию. В этом случае пероксидазную реакцию выявляли с помощью коммерческого набора SK4700 (Vector® SG Substrate Kit, Peroxidase (HRP), что позволяло получить синее окрашивание продукта иммуногистохимической реакции.

Вестерн-блот анализ

Половину крыс из 2 группы ($n = 5$) и половину наивных крыс ($n = 5$) декапитировали, гиппокампы препарировали и гомогенизировали для дальнейшего биохимического анализа. Экспрессию и активность белков, регулирующих активность глутаматергических нейронов, исследовали с помощью Вестерн-блот анализа. Гиппокампы гомогенизировали в буфере для лизиса при 4°C (20 мМ Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА) с ингибиторами протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз (Roche, #04 906 837 001). Нерастворимый осадок удаляли центрифугированием. Общее содержание белка в образцах определяли методом Лоури с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в качестве стандарта. Супернатант

смешивали в соотношении 2 : 1 с 3-загрузочным буфером (0.2 М Трис-НСl pH 6.7, 6% додецилсульфата натрия, 15% глицерина, 0.003% бромфенолового синего и 10% β -меркаптоэтанола) и инкубировали в течение 10 мин при 96°C. Равные количества проб (10 мкг белка на линию) загружали для электрофореза. Белки разделяли в 10%- или 12%-ном полиакриламидном геле, а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3718). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке или в 3%-ном БСА в Tris буфере с добавлением Tween (TBST; 0.1% Tween 20, 20 мМ Tris, 137 мМ NaCl; pH 7.4) в течение 1 ч и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами против актина (1:2000; Abcam, #ab3280,); mGluR1 (Invitrogen, # PA-4516, 1: 1000); mGluR5 (Invitrogen, # MA5-32155, 1: 1000); GluA1 (Millipore, # MAB-2263, 1: 1000); GluN2B (Invitrogen, # PA3-104, 1: 1000); GluN2A (Invitrogen, # PA5-35377, 1: 1000). Затем мембраны промывали в буфере TBST и инкубировали со вторичными поликлональными (1: 10000; Sigma-Aldrich, #A5420) или моноклональными (1: 40000; Sigma-Aldrich, #A9044) антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Специфические белки визуализировали с помощью хемилюминесцентной реакции с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad). Относительную плотность каждой белковой полосы оценивали количественно с помощью программного обеспечения ImageLab (версия 6.0; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, США).

Оценка иммуногистохимической реакции и статистический анализ

Обработку срезов проводили в стандартных условиях в каждом эксперименте, т.е. контрольные и экспериментальные группы в каждом эксперименте собирали, фиксировали и обрабатывали одновременно. Для изучения специфичности иммуноокрашивания проводили отрицательный контроль (тот же протокол без первичных антител), который не показал иммунореактивности. Анализ срезов проводили с микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Изменения, вызванные судорожной активностью, анализировали в гранулярном, внутреннем молекулярном слоях и в хилусе зубчатой извилины, а также в stratum lucidum поля CA3–4 гиппокампа. Для каждого животного анализировали пять срезов на одном уровне исследуемой зоны. Экспрессию интересующих белков при Вестерн-блот анализе оценивали по соотношению каждого исследуемого белка к актину или β -тубулину.

Статистическую обработку данных проводили с помощью U-теста Манна–Уитни и теста Краске-

ла–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна при $p < 0.05$. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., Сан-Диего, Калифорния). Все результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе мы провели анализ глутаматергических нейронов гиппокампа крыс, подвергнутых ежедневной экспозиции действию звука, через 7 дней после завершения последнего судорожного припадка, т.е. в период, когда острые нарушения в молекулярных механизмах регуляции активности нейронов, вызванные эпилептиформной активностью, сменяются хроническими, долговременными. Повышенное содержание pERK-киназ может быть одним из самых ранних иммуногистохимических индикаторов активации нейронов при эпилептиформной активности [18]. Однако мы показали значительную активацию киназ через неделю после окончания 14 и 21 ежедневной экспозиции действию звука во внутреннем молекулярном слое и в гранулярном слое зубчатой извилины, пирамидных нейронах CA4 поля гиппокампа, в хилусе и в области пролегания мшистых волокон CA3–4 поля (рис. 1a, 1b, 1c, 1d).

Одним из транскрипционных факторов, активно участвующим в развитии эпилептиформных состояний, является ERK1/2-зависимый белок CREB. Интересно отметить, что повышенная активность ERK1/2-киназ в гранулярных клетках и пирамидных нейронах CA4 поля после окончания 14 и 21 ежедневной экспозиции действию звука сопровождалась увеличением числа пирамидных нейронов поля CA4 и гранулярных клеток, содержащих фосфо-CREB-иммунопозитивные ядра (рис. 2a, 2b, 2c).

Также в глутаматергических нейронах гранулярного слоя зубчатой извилины и CA4-поля гиппокампа показано увеличение содержания другого ERK1/2-зависимого транскрипционного фактора Fra1 (рис. 3a, 3b, 3c).

Мы показали, что после 14-дневной экспозиции действию звука в хилусе наблюдается увеличение числа клеток, экспрессирующих глутаминазу (катализирует расщепление аминокислоты глутамината до аммиака и глютаминовой кислоты) (рис. 4c, 4d). Через неделю после окончания длительной, 21-дневной экспозиции действию звука, увеличение экспрессии глутаминазы наблюдалось не только в глутаматергических нейронах хилуса, но и в гранулярных клетках зубчатой извилины и в пирамидных нейронах CA3–CA4-полей гиппокампа (рис. 4a, b, c, d), что свидетельствует об усиливаю-

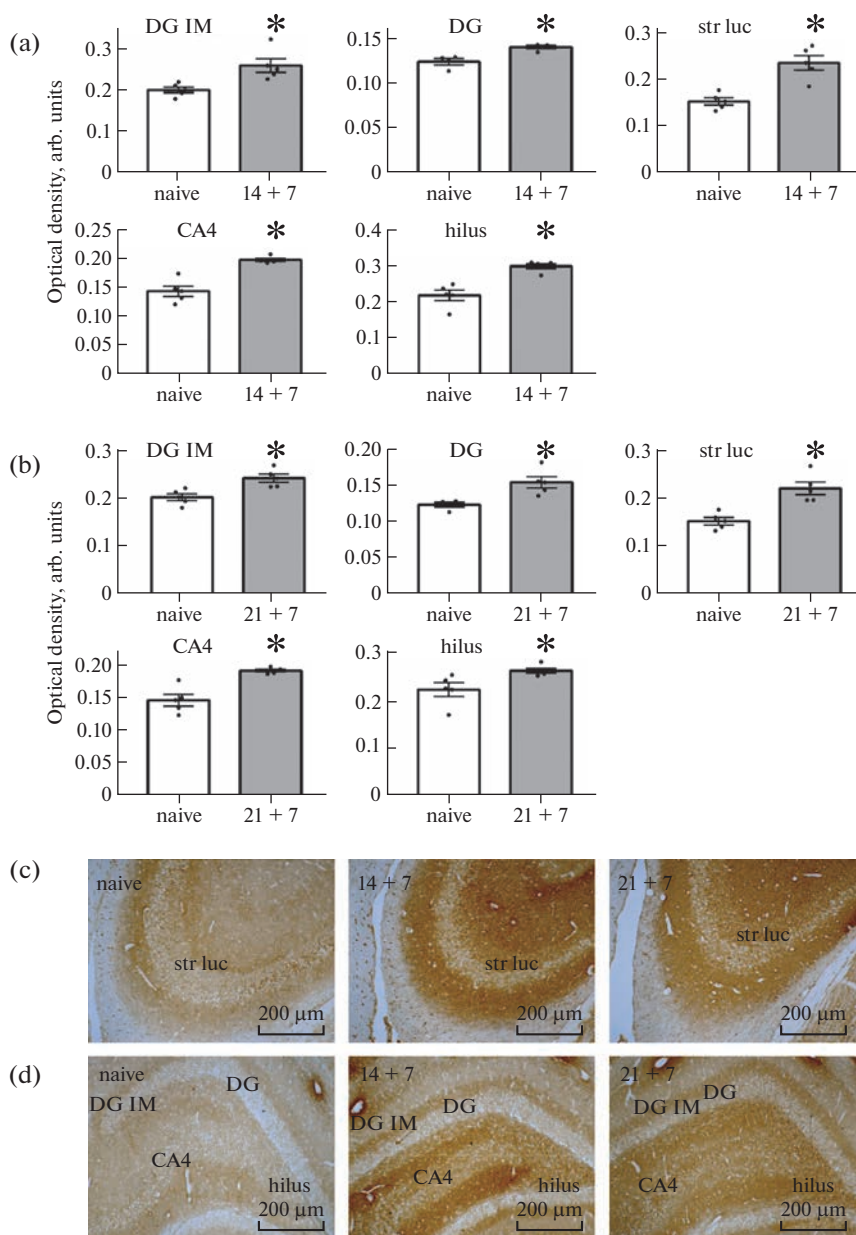


Рис. 1. Анализ ERK1/2-киназ в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания фосфорилированных активных(Thr202/Tyr204) ERK1/2-киназ во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (DG IM), в гранулярном слое зубчатой извилины (DG), в stratum lucidum (str luc), в поле CA4 гиппокампа (CA4) и в хилусе (hilus) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го аудиогенного судорожного припадка. (б) — иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания фосфорилированных активных(Thr202/Tyr204) ERK1/2-киназ во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины (DG IM), в гранулярном слое зубчатой извилины (DG), в stratum lucidum (str luc), в CA4-поле гиппокампа (CA4) и в хилусе (hilus) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка. (с) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания ERK1/2(Thr202/Tyr204) в зубчатой извилине и гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (д, е) — репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания ERK1/2(Thr202/Tyr204) в stratum lucidum и в зубчатой извилине крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Графики (а) и (б) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а.у.). Иммуногистохимические данные представлены как среднее ± SEM. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

щейся по мере развития феноменов височной эпилепсии продукции глутамата.

Высокая экспрессия VGLUT1 после 14- и 21-дневного киндлинга была выявлена в грануляр-

ных клетках и в молекулярном слое зубчатой извилины, где была также показана повышенная активность ERK1/2-киназ (рис. 5а, 5б, 5с). Содержание VGLUT2 после 14-дневного киндлинга не отлича-

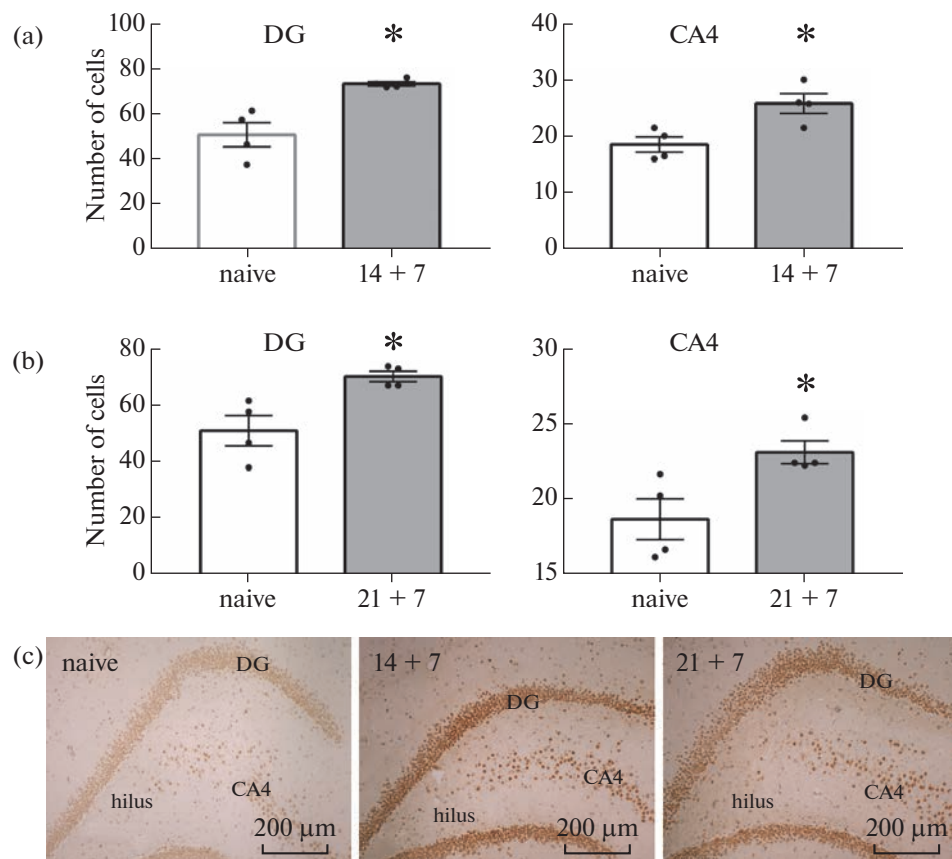


Рис. 2. Анализ транскрипционного фактора CREB в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат фосфорилированный активный (Ser133) CREB в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в CA4-поле гиппокампа (CA4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го аудиогенного судорожного припадка. (б) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат фосфорилированный активный (Ser133) CREB в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в CA4-поле гиппокампа (CA4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка. (в) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания CREB (Ser133) в зубчатой извилине и гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (г) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания (Ser133) CREB в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Графики (а) и (б) показывают число иммунопозитивных ядер нейронов (number of cells). Иммуногистохимические данные представлены как среднее \pm SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

лось от базального уровня, а после 21-дневной экспозиции действию звука было повышено только в хилусе (рис. 5d, 5e).

Мы оценили уровень экспрессии рецепторов глутамата через неделю после окончания 21-дневного киндлинга. Уровень экспрессии субъединицы GluA1 AMPA-рецепторов не отличался от контрольного уровня. Также не менялась экспрессия субъединиц GluN2A и GluN2B ионотропных NMDA-рецепторов и метаботропного рецептора mGluR5. Однако уровень mGluR1 был значительно выше через неделю после окончания киндлинга, что свидетельствует о длительном нарушении его экспрессии (рис. 6а–6г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было показано, что аудиогенный киндлинг крыс линии КМ в течение 14 и 21 дня вы-

зывает появление лимбических генерализованных судорог [17], что позволяет говорить о развитии феномена, сходного с височной эпилепсией человека. В настоящей работе проведенный анализ глутаматергических нейронов гиппокампа крыс через 7 дней после завершения последнего судорожного припадка показал хронические нарушения в молекулярных механизмах регуляции активности нейронов, возникающих в результате формирования феномена, сходного с височной эпилепсией человека.

В регуляции глутаматергических нейронов активное участие принимают ERK1/2-киназы, вовлеченные в контроль за транскрипцией различных генов и отвечающие за фосфорилирование многих белков, участвующих на разных этапах в регуляции глутаматергической трансмиссии [19]. Участие этих киназ в реализации эпилептиформной активности хорошо доказано. В частности, по-

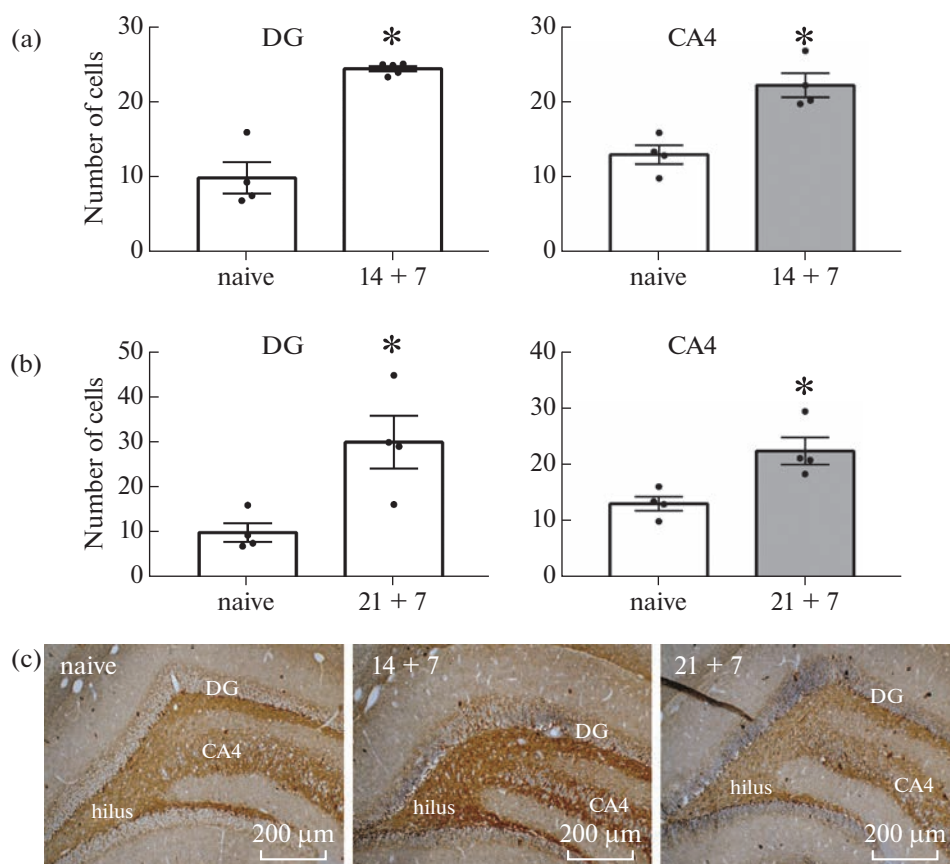


Рис. 3. Анализ транскрипционного фактора Fra1 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (а) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат Fra1 в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в СА4-поле гиппокампа (СА4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го аудиогенного судорожного припадка. (б) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, ядра которых содержат Fra1 в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в СА4-поле гиппокампа (СА4) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка. (с) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания Fra1 (голубой цвет иммуногистохимической реакции) в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Графики (а) и (б) показывают число иммунопозитивных ядер нейронов (number of cells). Иммуногистохимические данные представлены как среднее \pm SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

вышенная экспрессия ERK1/2 показана с помощью транскриптомного анализа нижних бугров четверохолмия крыс линии КМ [20]. Повышенная активность киназ у трансгенных мышей приводила к формированию у них судорожных состояний [21], а ингибирование ERK1/2 вызывало торможение судорожной активности у крыс линии КМ, приводившее к отмене судорожных припадков в ответ на звуковую стимуляцию [22]. Также в экспериментах с использованием пилокарпина, во время спонтанных судорог было показано значительное увеличение фосфорилирования pERK в гранулярных клетках, во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины и в области, содержащей мшистые волокна, при этом через 30 мин после спонтанного припадка уровень фосфорилирования pERK практически снижался до контрольных значений [18]. Эти данные позволяют предположить, что повышенное содержание pERK может быть одним из самых ранних иммуногистохимических ин-

дикаторов активации нейронов во время спонтанного припадка. Однако наши данные свидетельствуют о значительной активации ERK1/2-киназ через неделю после окончания как краткосрочной, так и длительной ежедневной экспозиции действию звука в пирамидных нейронах СА4-поля гиппокампа, в хилусе и в области пролегания мшистых волокон СА3-4 поля. Активация ERK1/2-киназ во внутреннем молекулярном слое зубчатой извилины, где расположены дендриты гранулярных клеток, контактирующие с аксонами глутаматергических нейронов перфорантного пути [23], позволяет говорить об усиленном возбуждающем входе из энторинальной коры, что приводит к длительно сохраняющейся активации гранулярных клеток. Повышение содержания активной формы ERK1/2 в мшистых волокнах позволяет предположить усиление выведения глутамата гранулярными клетками и соответственно активацию пирамидных нейронов поля СА4, где активность ERK1/2-киназ также

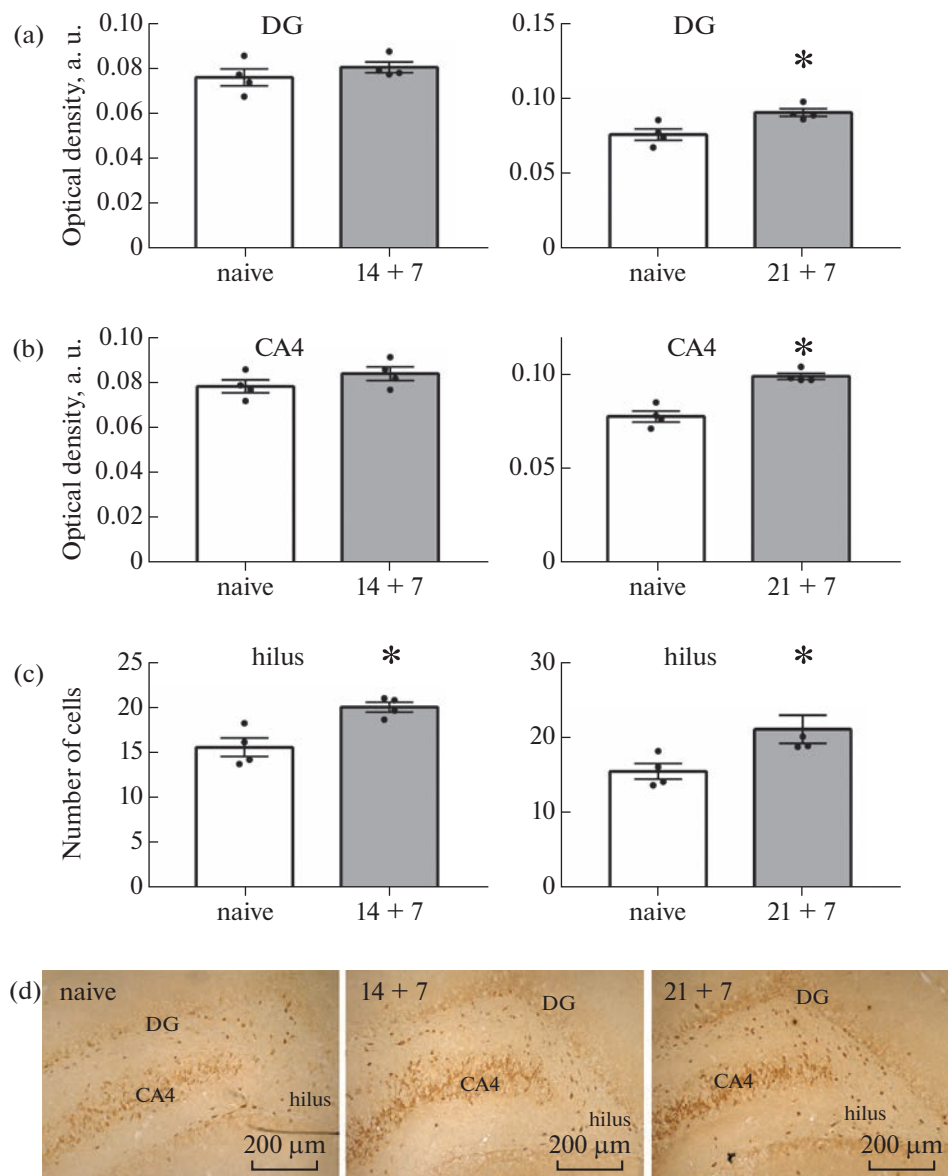


Рис. 4. Анализ глутаминазы в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (a, b) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания глутаминазы в гранулярном слое зубчатой извилины (DG) и в СА4-поле гиппокампа крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. (c) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, содержащих глутаминазу крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. Графики (a) и (b) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (а. у.). График (c) показывает число иммунопозитивных нейронов (number of cells). (d) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания глутаминазы в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Иммуногистохимические данные представлены как среднее \pm SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

оставалась повышенной через неделю после окончания киндлинга. Известно, что активация ERK1/2-киназ вызывает усиление активности транскрипционного фактора CREB [23, 24]. Транскрипционный фактор CREB активно участвует в развитии эпилептиформных состояний. Повышенная активность CREB приводит к повышенной возбудимости гиппокампа, провоцирует приступы и вызывает хронические эпилептические судорожные

расстройства [25]. Повышенная активность ERK1/2-киназ в гранулярных нейронах зубчатой извилины и в пирамидных нейронах СА4 поля гиппокампа после окончания 14- и 21-дневной экспозиции действию звука сопровождалась увеличением содержания фосфорилированной активной формы CREB в этих клетках, что свидетельствует о длительно сохраняющейся повышенной транскрипционной активности в этих клетках. Транскрипционный фак-

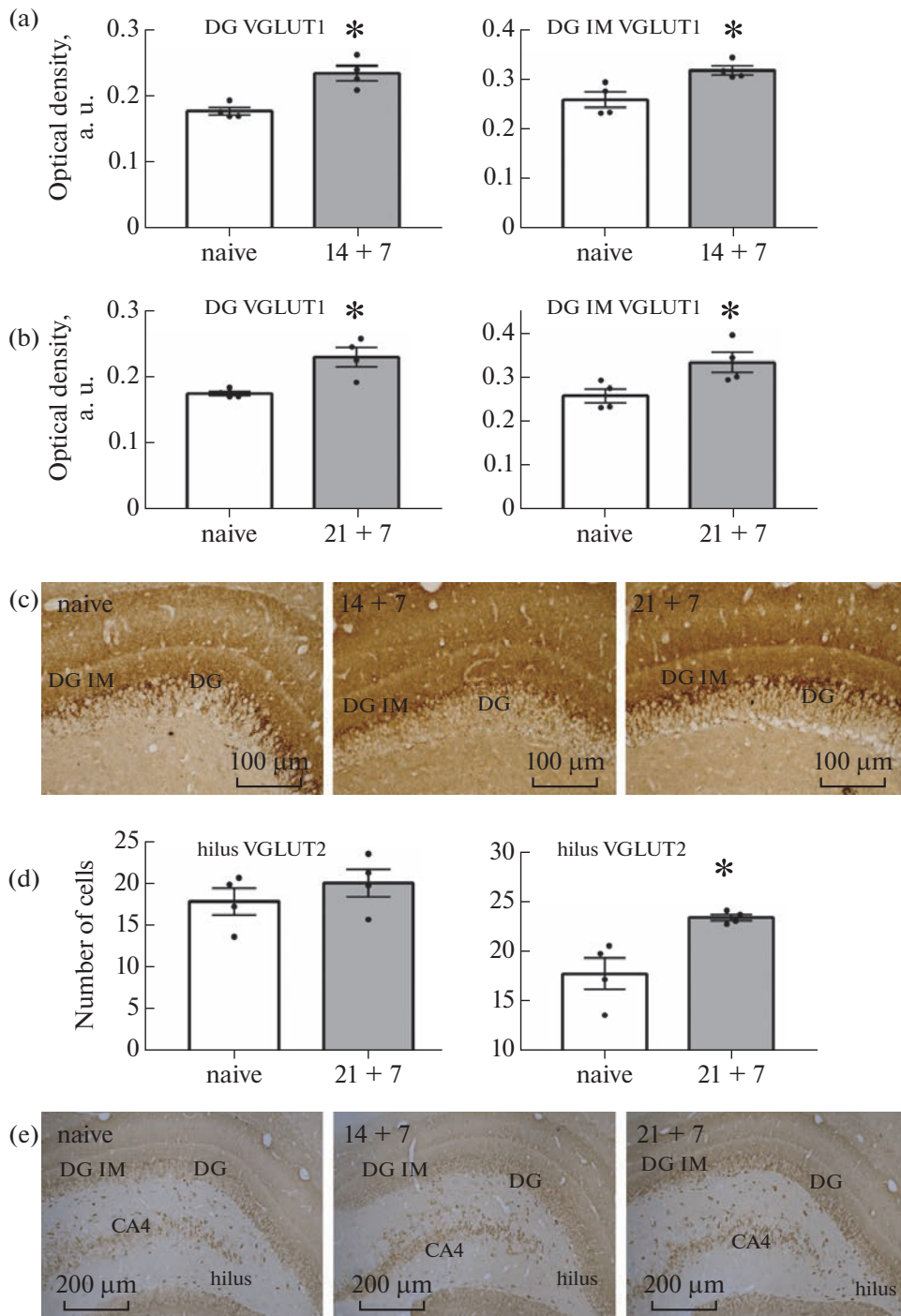


Рис. 5. Анализ везикулярных транспортеров глутамата VGLUT1 и VGLUT2 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (a, b) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение содержания VGLUT1 в гранулярном и во внутреннем молекулярном слоях зубчатой извилины крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. Графики (a) и (b) показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (a.u.). (c) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания VGLUT1 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Иммуногистохимические данные представлены как среднее \pm SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Масштабные линейки: 100 мкм. (d) – иммуногистохимический анализ выявил увеличение числа нейронов, содержащих VGLUT2 в хилусе (hilus) крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 14-го или 21-го аудиогенных судорожных припадков. График (d) показывает число иммунопозитивных нейронов (number of cells). (e) – репрезентативные микрофотографии иммуноокрашивания VGLUT2 в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. Иммуногистохимические данные представлены как среднее \pm SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

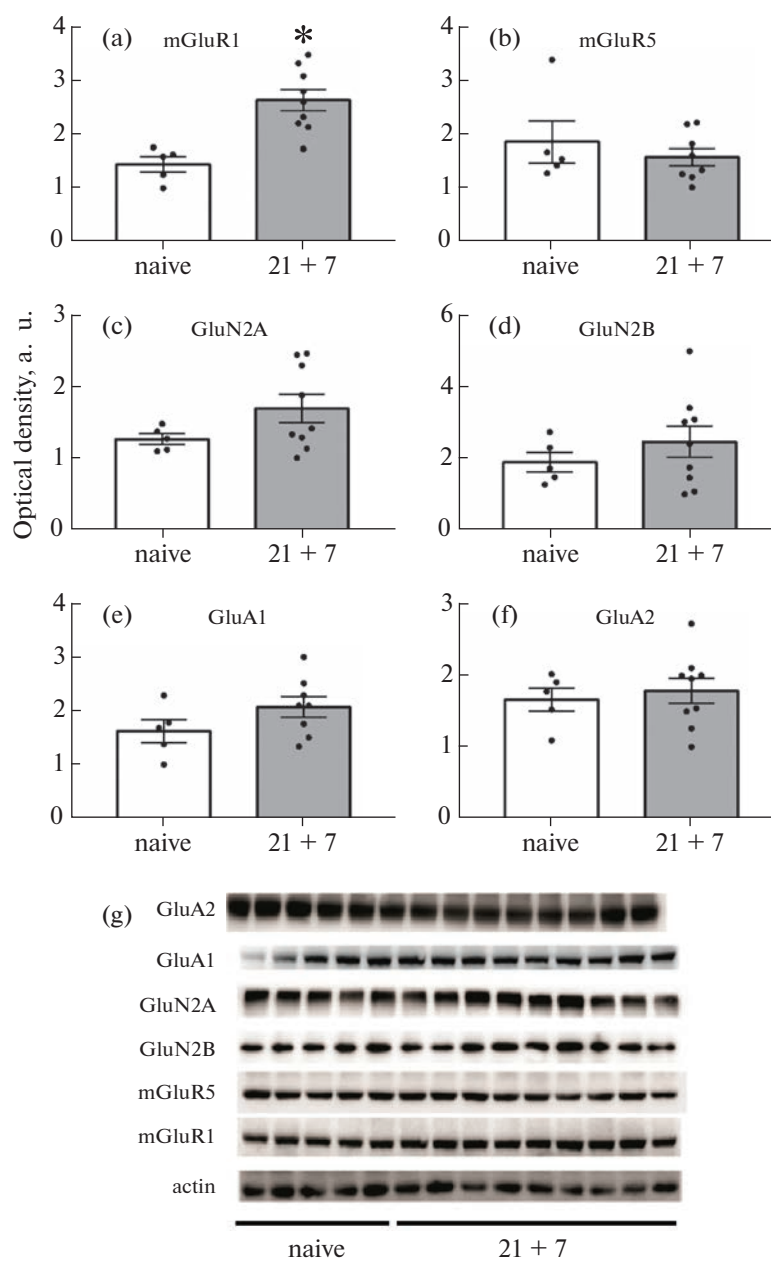


Рис. 6. Анализ рецепторов глутамата в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу. (a) – экспрессия mGluR1 в гиппокампе крыс КМ через 7 дней после окончания последнего 21-го аудиогенного судорожного припадка была значительно выше, чем в контроле. Экспрессия mGluR5 (b), GluN2A (c), GluN2B (d), GluA1 (e) и GluA2 (f) не отличалась от контроля. Данные представлены как среднее \pm SEM. * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Графики показывают оптическую плотность иммунопозитивного вещества, произвольные единицы (a.u.). (g) – репрезентативные изображения иммуноблота mGluR1, mGluR5, GluN2A, GluN2B, GluA1, GluA2 и актина в гиппокампе крыс КМ, подвергнутых аудиогенному киндлингу.

тор Fra1, входящий в состав AP1 комплекса, относится к семейству белков, регулируемых генами раннего ответа и активируется при эпилептиформных состояниях и, следовательно, вовлечен в регуляцию эпилептиформной активности [26, 27]. В регуляции экспрессии Fra1 также принимают участие ERK1/2-киназы [24, 28, 29]. Детальный анализ активности транскрипционного фактора Fra1 пока-

зал значительное повышение его экспрессии в ядрах глутаматергических нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины и пирамидных нейронах СА4-поля гиппокампа как после окончания 14-, так и 21-дневной экспозиции действию звука. Полученные данные об усилении активности ERK1/2-киназ и увеличении содержания ERK1/2-зависимых транскрипционных факторов в глутаматергических ней-

ронах гиппокампа через неделю после завершения киндлинга свидетельствуют о длительно сохраняющейся повышенной активности этих нейронов.

При височной эпилепсии показано, что увеличению высвобождения глутамата из нейронов способствует активация глутамины, фермента, расщепляющего глутамин [30]. Мы показали, что после 14-дневной звуковой стимуляции наблюдается увеличение числа клеток, экспрессирующих глутаминазу в хилусе, где в этот период наблюдается значительное увеличение числа вновь образованных эктопических глутаматергических нейронов [31]. Эктопические гранулярные клетки хилуса характеризуются постоянно повышенной активностью по сравнению с гранулярными клетками зубчатой извилины [32–36]. Эти клетки образуют аномальные связи с пирамидными нейронами СА3 [32, 37, 38], что может способствовать распространению эпилептиформной активности [36]. Через неделю после окончания длительной, 21-дневной стимуляции увеличение экспрессии глутамины наблюдалось не только в глутаматергических нейронах хилуса, но и в пирамидных нейронах СА3–СА4-полей гиппокампа и в гранулярных клетках зубчатой извилины, что свидетельствует об усиливающейся по мере развития феноменов, сходных с височной эпилепсией человека, продукции глутамата.

Известно, что повышенное содержание везикулярных транспортеров глутамата (VGLUT) коррелирует с усилением судорожной активности и гиперактивацией гранулярных клеток зубчатой извилины у хомячков, чувствительных к аудиогенной стимуляции [39]. Мы показали повышенное содержание VGLUT1 через неделю после завершения киндлинга после 14-дневной стимуляции в гранулярных клетках и в молекулярном слое зубчатой извилины, где наблюдалась повышенная активность ERK1/2-киназ, участвующих в регуляции синтеза транспортеров, что свидетельствует о длительно сохраняющейся активации глутаматергической трансмиссии. После 21-дневной стимуляции повышенное содержание VGLUT1 было показано только в телах клеток хилуса. Содержание VGLUT2 после 14- и 21-дневного киндлинга было повышено также только в хилусе, что свидетельствует о повышенной активности вновь образованных эктопических клеток.

На различных моделях височной эпилепсии было показано кратковременное нарушение экспрессии субъединиц GluA1 и GluA3 AMPA-рецепторов и субъединиц GluN2A и GluN2B NMDA-рецепторов [40–43]. Мы показали, что через неделю после окончания 21-дневной стимуляции уровень экспрессии AMPA-рецепторов глутамата GluA1 не отличался от контрольного уровня. Также не менялась экспрессия ионотропных рецепторов NMDA субъединицы GluN2A и метаболитного рецептора

mGluR5. Это можно также объяснить возвращением экспрессии этих рецепторов к базальному уровню через 7 дней после последнего судорожного припадка. При этом ежедневная звуковая стимуляция в течение 21 дня приводила к значительному повышению уровня метаболитного рецептора mGluR1, что свидетельствует о длительном нарушении его экспрессии. Известно, что активация рецепторов Gp1 (mGluR) в гиппокампе может трансформировать нормальную активность нейронов в пролонгированные эпилептиформные разряды, что приводит к развитию височной эпилепсии человека [44]. Гиперэкспрессия mGluR1 вызывает хронические эпилептиформные приступы у трансгенных мышей [45]. Активация глутаматергических нейронов при эпилептиформных состояниях приводит к усилению связывания рецепторов Gp1, что вызывает активацию ERK-киназ [46]. Кроме того, ингибирование фосфорилирования ERK1/2 предотвращает икталоподобные разряды, это позволяет предположить, что индуцированный активацией mGluR1 эпилептогенез также зависит от активности ERK-киназ [47]. Кроме того, показано, что активация mGluR1 приводит к высвобождению Ca^{2+} и усилению эксайтотоксичности [47, 48]. Ранее мы показали, что длительный киндлинг вызывает значительную гибель нейронов гиппокампа путем апоптоза [17], что, возможно, связано с увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} , вызванного показанной нами длительной активацией mGluR1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что длительно сохраняющаяся повышенная активность ERK1/2-киназ, участвующих в регуляции большинства изученных нами маркеров регуляции глутаматергических нейронов у крыс линии КМ, может быть причиной повышенного уровня трансмиссии глутамата при длительной ежедневной экспозиции действию звука, приводящей к развитию феномена, сходного с височной эпилепсией человека, что позволяет говорить о хроническом характере выявленных нарушений. Повышенная активность глутаматергических нейронов гиппокампа, очевидно, приводит к дальнейшему развитию заболевания, усилению тяжести припадков и возникновению спонтанных судорог, характерных для височной эпилепсии. Известно, что активация глутаматергической трансмиссии приводит к возникновению эксайтотоксичности [49, 50]. Эксайтотоксичность является причиной многих нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Гентингтона, которые проявляются в снижении памяти, обучения и нейропластичности [51]. Мы предполагаем, что выявленные нами нарушения работы глутаматергических нейронов гиппокампа, приводящие к усилению продукции глутамата, яв-

ляются причиной сопутствующих дегенеративных и неврологических заболеваний. Показанные нами нарушения молекулярных механизмов регуляции продукции глутамата имеют важное значение, так как на сегодняшний день основное внимание сосредоточено на создании терапевтических средств на основе регуляции рецепторов и синаптической передачи. Меньшее внимание уделяется анализу внутриклеточных механизмов регуляции продукции нейротрансмиттеров. Выяснение точных молекулярных механизмов регуляции функционирования нейронов, дефекты которых носят хронический характер, может послужить основой для разработки новых подходов лечения не только височной эпилепсии, но и коррекции сопутствующих неврологических и дегенеративных заболеваний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с крысами проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведению экспериментов на животных и были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова (Протокол № 1-21 /2023 от 26.01.2023 комиссии по биоэтике, утвержденной Приказом Директора Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова № 8 от 24.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00101).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Keezer MR, Sisodiya SM, Sander JW* (2016) Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives. *Lancet Neurol* 15: 106–115. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)
2. *Vrinda M, Arun S, Srikumar BN, Kutty BM, Shankararayan Rao BS* (2019) Temporal lobe epilepsy-induced neurodegeneration and cognitive deficits: Implications for aging. *J Chem Neuroanat* 95: 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.02.005>
3. *Epps SA, Weinshenker D* (2013) Rhythm and blues: animal models of epilepsy and depression comorbidity. *Biochem Pharmacol* 85: 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.016>
4. *Kanner AM* (2008) Mood disorder and epilepsy: a neurobiologic perspective of their relationship. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 39–45.
5. *Barnes SJ, Pineda JP* (2001) Conditioned effects of kindling. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 745–751. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00054-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00054-9)
6. *Hannesson DK, Howland J, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME* (2001) Dorsal hippocampal kindling produces a selective and enduring disruption of hippocampally mediated behavior. *J Neurosci* 21: 4443–4450.
7. *Kalinina A, Krekhno Z, Yee J, Lehmann H, Fournier NM* (2022) Effect of repeated seizures on spatial exploration and immediate early gene expression in the hippocampus and dentate gyrus. *IBRO Neurosci Rep* 12: 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.12.008>
8. *Mazarati A, Shin D, Auvin S, Caplan R, Sankar R* (2007) Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav* 10: 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.02.001>
9. *Kalynchuk LE* (2000) Long-term amygdala kindling in rats as a model for the study of interictal emotionality in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 691–704. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00031-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00031-2)
10. *Cole AJ* (2000) Is epilepsy a progressive disease? The neurobiological consequences of epilepsy. *Epilepsia* 41 Suppl 2: S13–S22. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01520.x>
11. *Blumcke I* (2009) Neuropathology of focal epilepsies: a critical review. *Epilepsy Behav* 15: 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.033>
12. *Hsu PW, Chang CN, Tseng CK, Wei KC, Wang CC, Chuang CC, Huang YC* (2007) Treatment of epileptogenic cavernomas: surgery versus radiosurgery. *Cerebrovasc Dis* 24: 116–120; discussion 121. <https://doi.org/10.1159/000103126>
13. *Zappone CA, Sloviter RS* (2004) Translamellar disinhibition in the rat hippocampal dentate gyrus after seizure-induced degeneration of vulnerable hilar neurons. *J Neurosci* 24: 853–864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1619-03.2004>
14. *Kobayashi M, Buckmaster PS* (2003) Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 23: 2440–2452.
15. *Navidhamidi M, Ghasemi M, Mehranfard N* (2017) Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. *Rev Neurosci* 28: 307–334. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0059>
16. *Vinogradova LV* (2008) Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *Epilepsia* 49: 1665–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01617.x>
17. *Kulikov AA, Naumova AA, Dorofeeva NA, Ivlev AP, Glazova MV, Chernigovskaya EV* (2022) Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky–Molodki-

- na rats correlates with the progression of limbic seizures. *Epilepsy Behav* 134: 108846. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108846>
18. *Houser CR, Huang CS, Peng Z* (2008) Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 156: 222–237. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.010>
 19. *Sun J, Nan G* (2017) The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review). *Int J Mol Med* 39: 1338–1346. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2962>
 20. *Chuvakova LN, Funikov SY, Rezykh AP, Davletshin AI, Evgen'ev MB, Litvinova SA, Fedotova IB, Poletaeva, II, Garbuz DG* (2021) Transcriptome of the Krushinsky-Molodkina Audiogenic Rat Strain and Identification of Possible Audiogenic Epilepsy-Associated Genes. *Front Mol Neurosci* 14: 738930. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.738930>
 21. *Nateri AS, Raivich G, Gebhardt C, Da Costa C, Naumann H, Vreugdenhil M, Makwana M, Brandner S, Adams RH, Jefferys JG, Kann O, Behrens A* (2007) ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J* 26: 4891–4901. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601911>
 22. *Glazova MV, Nikitina LS, Hudik KA, Kirillova OD, Dorofeeva NA, Korotkov AA, Chernigovskaya EV* (2015) Inhibition of ERK1/2 signaling prevents epileptiform behavior in rats prone to audiogenic seizures. *J Neurochem* 132: 218–229. <https://doi.org/10.1111/jnc.12982>
 23. *Roskoski R, Jr* (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66: 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
 24. *Lu N, Malemud CJ* (2019) Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20153792>
 25. *Wang G, Zhu Z, Xu D, Sun L* (2020) Advances in Understanding CREB Signaling-Mediated Regulation of the Pathogenesis and Progression of Epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg* 196: 106018. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106018>
 26. *Gass P, Herdegen T* (1995) Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic-neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions. *Prog Neurobiol* 47: 257–290.
 27. *Pozas E, Aguado F, Ferrer I* (1999) Fra-1 immunoreactivity in the rat brain during normal postnatal development and after injury in adulthood. *Neurosci Res* 33: 137–145. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(98\)00123-0](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(98)00123-0)
 28. *Jiang X, Xie H, Dou Y, Yuan J, Zeng D, Xiao S* (2020) Expression and function of FRA1 protein in tumors. *Mol Biol Rep* 47: 737–752. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05123-9>
 29. *Sobolev VV, Khashukoeva AZ, Evina OE, Geppel NA, Chebysheva SN, Korsunskaya IM, Tchepourina E, Mezentshev A* (2022) Role of the Transcription Factor FOSL1 in Organ Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031521>
 30. *Albrecht J, Zielinska M* (2017) Mechanisms of Excessive Extracellular Glutamate Accumulation in Temporal Lobe Epilepsy. *Neurochem Res* 42: 1724–1734. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2105-8>
 31. *Kulikov AA, Naumova AA, Aleksandrova EP, Glazova MV, Chernigovskaya EV* (2021) Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy Behav* 125: 108445. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108445>
 32. *Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL* (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20: 6144–6158.
 33. *Danzer SC* (2019) Adult Neurogenesis in the Development of Epilepsy. *Epilepsy Curr* 19: 316–320. <https://doi.org/10.1177/1535759719868186>
 34. *Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE* (2001) Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res* 890: 261–271. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03119-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03119-x)
 35. *Bielefeld P, van Vliet EA, Gorter JA, Lucassen PJ, Fitzsimons CP* (2014) Different subsets of newborn granule cells: a possible role in epileptogenesis? *Eur J Neurosci* 39: 1–11. <https://doi.org/10.1111/ejn.12387>
 36. *Althaus AL, Moore SJ, Zhang H, Du X, Murphy GG, Parent JM* (2019) Altered Synaptic Drive onto Birthdated Dentate Granule Cells in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* 39: 7604–7614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-18.2019>
 37. *Scharfman HE* (2019) The Dentate Gyrus and Temporal Lobe Epilepsy: An “Exciting” Era. *Epilepsy Curr* 19: 249–255. <https://doi.org/10.1177/1535759719855952>
 38. *Parent JM, Kron MM* (2012) Neurogenesis and Epilepsy. In: *Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV* (Eds) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Bethesda (MD).
 39. *Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Kim DW, Kang JH, Won MH, Kwon OS, Choi SY* (2005) Valproic acid reduces enhanced vesicular glutamate transporter immunoreactivities in the dentate gyrus of the seizure prone gerbil. *Neuropharmacology* 49: 912–921. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.007>
 40. *Szczurowska E, Mares P* (2013) NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol Res* 62: S21–S38. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932662>
 41. *Chen Q, He S, Hu XL, Yu J, Zhou Y, Zheng J, Zhang S, Zhang C, Duan WH, Xiong ZQ* (2007) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. *J Neurosci* 27: 542–552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-06.2007>
 42. *Di Maio R, Mastroberardino PG, Hu X, Montero L, Greenamyre JT* (2011) Pilocarpine alters NMDA receptor ex-

- pression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiol Dis* 42: 482–495.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.012>
43. *Ahmed MM, Carrel AJ, Cruz Del Angel Y, Carlsen J, Thomas AX, Gonzalez MI, Gardiner KJ, Brooks-Kayal A* (2021) Altered Protein Profiles During Epileptogenesis in the Pilocarpine Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol* 12: 654606.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.654606>
44. *Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Ramkema M, Troost D* (2003) Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in taylor-type focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 44: 785–795.
<https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.54802.x>
45. *Pitsch J, Schoch S, Gueler N, Flor PJ, van der Putten H, Becker AJ* (2007) Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 26: 623–633.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.03.003>
46. *Ribeiro FM, Paquet M, Cregan SP, Ferguson SS* (2010) Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 574–595.
<https://doi.org/10.2174/187152710793361612>
47. *Kano M, Watanabe T* (2017) Type-1 metabotropic glutamate receptor signaling in cerebellar Purkinje cells in health and disease. *F1000Res* 6: 416.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.10485.1>
48. *Ferraguti F, Crepaldi L, Nicoletti F* (2008) Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev* 60: 536–581.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.000166>
49. *Duman RS, Sanacora G, Krystal JH* (2019) Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron* 102: 75–90.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.013>
50. *Murrough JW, Abdallah CG, Mathew SJ* (2017) Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nat Rev Drug Discov* 16: 472–486.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.16>
51. *McGrath T, Baskerville R, Rogero M, Castell L* (2022) Emerging Evidence for the Widespread Role of Glutamatergic Dysfunction in Neuropsychiatric Diseases. *Nutrients* 14.
<https://doi.org/10.3390/nu14050917>

CHRONIC DYSREGULATION OF GLUTAMATERGIC TRANSMISSION IN THE HIPPOCAMPUS OF KRUSHINSKY–MOLODKINA RATS INDUCED BY REPEATED EPILEPTIFORM SEIZURES

E. P. Aleksandrova^a, A. P. Ivlev^a, A. A. Kulikov^a, L. S. Nikitina^a,
 M. V. Glazova^a, and E. V. Chernigovskaya^{a, #}

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

[#]*e-mail: chern755@mail.ru*

Temporal lobe epilepsy is characterised by the development of associated neurological and psychiatric disorders. One of the possible causes is obviously a disturbance in the balance of the excitatory and inhibitory neurotransmitter systems of the hippocampus. Chronic abnormalities in the molecular mechanisms of regulation of hippocampal glutamatergic system activity in temporal lobe epilepsy are currently poorly understood. In the present study, we used Krushinsky–Molodkina (KM) rats subjected to repeated audiogenic seizures to simulate temporal lobe epilepsy. Molecular mechanisms of regulation of glutamate production by hippocampal neurons were analysed one week after the end of short-term (14 seizures) and long-term (21 seizures) kindling. In the hippocampus of KM rats, kindling results in activation of ERK1/2 kinases as well as activation of the transcription factor CREB and increased expression of the transcription factor Fra1, glutaminase and the vesicular glutamate transporters VGLUT1 and 2, that is proteins responsible for glutamate production. These data indicate increased activity of glutamatergic hippocampal neurons persisting for a week at rest after the completion of the last audiogenic stimulation. Enhanced expression of mGluR1 glutamate receptors, whose activation is known to result in Ca²⁺ release and increased excitotoxicity, is also shown. Long-term enhancement of glutamatergic transmission induced by repeated epileptiform seizures is not only responsible for further epileptogenesis, but may also underlie the development of neurodegenerative complications.

Keywords: epilepsy, Krushinsky–Molodkina rats, audiogenic kindling, glutamat, hippocampus