



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

www.sciensejournals.ru

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



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 6, 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.

Памяти академика Николая Петровича Веселкина
(10 января 1937 г.—24 ноября 2023 г.)

443

ОБЗОРЫ

Структура и свойства гломерулярного фильтра позвоночных:
роль заряда для фильтрации белков

Е. В. Балботкина, А. В. Кутина

445

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Сравнительная нейроанатомия нисходящих нейронов
в надглоточных ганглиях тараканов из семейства Blaberidae (Blattodea)

И. Ю. Северина, И. Л. Исавнина

463

Исследование функционального статуса астроглии гиппокампа
у крыс с генетической предрасположенностью к аудиогенным судорогам

Ю. С. Григорьева, А. А. Наумова, С. Д. Николаева, М. В. Глазова

475

Коррекция когнитивных нарушений и сигнальных путей в гиппокампе крыс
с сахарным диабетом 2-го типа с помощью интраназально вводимых инсулина и ганглиозидов

И. О. Захарова, Л. В. Баюнова, К. В. Деркач, А. О. Шпаков, Н. Ф. Аврова

485

Некоторые компоненты серотонинергической системы в глазах
двух видов пресноводных моллюсков

И. Н. Доминова, А. А. Хусенова, В. В. Котова, М. В. Сидорова, В. В. Жуков

503

Медиаторы симпатической нервной системы АТФ и норадреналин
в модуляции антителообразования при глубоком охлаждении организма

Т. В. Козырева, Е. С. Мейта

514

Экспрессия белка NeuN в спинальных нейронах, организующих проекции
к мозжечку

А. А. Вещицкий, Н. В. Павлова, П. Ю. Шкорбатова, Н. И. Никитина, Н. С. Меркульева

522

Показатели энергетического обмена и аденилатная система тканей
Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) в условиях умеренной гипоксии

*А. С. Кохан, А. А. Солдатов, И. В. Головина, Ю. В. Богданович,
Н. Е. Шалагина, В. Н. Рычкова*

532

Каталитические свойства лактатдегидрогеназы скелетных мышц и печени
озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*) зависят
от эколого-географической локации ее в популяции

З. Г. Рабаданова, А. М. Джафарова

541

Правила для авторов

551

Contents

Vol. 59, No. 6, 2023

In Memory of Academician Nikolai Petrovich Veselkin
(January 10, 1937–November 24, 2023)

443

REVIEWS

Structure and Properties of the Glomerular Filtration Barrier of Vertebrates:
Role of Charge for Filtering Proteins

E. V. Balbotkina and A. V. Kutina

445

EXPERIMENTAL ARTICLES

Comparative Neuroanatomy of Descending Neurons of the Supraesophageal Ganglion
of Cock-roaches of the Family Blaberidae (Blattodea)

I. Yu. Severina and I. L. Isavnina

463

Analysis of the Functional State of Astroglia in the Hippocampus
of Rats Genetically Prone to Audiogenic Seizures

Y. S. Grigorieva, A. A. Naumova, S. D. Nikolaeva, and M. V. Glazova

475

Correction of Cognitive Impairments and Signaling Pathways in the Hippocampus
of Rats with Type 2 Diabetes Mellitus Using Intranasally Administered Insulin and Gangliosides

I. O. Zakharova, L. V. Bayunova, K. V. Derkach, A. O. Shpakov, and N. F. Avrova

485

Some Components of the Serotonergic System in the Eyes of Two Species of Freshwater Molluscs

I. N. Dominova, A. A. Husenova, V. V. Kotova, M. V. Sidorova, and V. V. Zhukov

503

Mediators of the Sympathetic Nervous System ATP and Noradrenaline
in the Modulation of Antibody Formation During Deep Cooling of the Organism

T. V. Kozyreva and E. S. Meyta

514

NeuN Expression in Spinal Neurons Organizing Projections to the Cerebellum

A. A. Veshchitskii, N. V. Pavlova, P. Y. Shkorbatova, N. I. Nikitina, and N. S. Merkulyeva

522

Parameters of Energy Metabolism and Adenylate System
of *Mytilus Galloprovincialis* Tissues (Lamarck. 1819) in Conditions of Moderate Hypoxia

*A. S. Kokhan, A. A. Soldatov, I. V. Golovina, Yu. V. Bogdanovich,
N. E. Shalagina, and V. N. Rychkova*

532

The Catalytic Properties of Lactate Dehydrogenase in Skeletal Muscles and Liver
of the Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*) Depend on Its Ecological and Geographical Location

Z. G. Rabadanova and A. M. Dzhafarova

541

Author for Rules

551

ПАМЯТИ АКАДЕМИКА НИКОЛАЯ ПЕТРОВИЧА ВЕСЕЛКИНА (10 ЯНВАРЯ 1937 г.–24 НОЯБРЯ 2023 г.)

DOI: 10.31857/S004445292396001X, EDN: NYBPVG



24 ноября 2023 г. ушел из жизни академик РАН Николай Петрович Веселкин, признанный во всем мире специалист в области сравнительной и эволюционной физиологии и морфологии нервной системы.

Вся научная жизнь Н.П. Веселкина тесно связана с Институтом эволюционной физиологии им. И.М. Сеченова, куда он пришел в 1960 г. после окончания 1-го Ленинградского медицинского института и прошел все ступени научного роста от старшего лаборанта в лаборатории сравнительной физиологии центральной нервной системы до заведующего лабораторией и директора Института.

Академик Н.П. Веселкин внес значительный вклад в мировую науку в области исследований морфологии и физиологии зрительной и соматосенсорной систем у разных классов хордовых животных. Им высказана и экспериментально обоснована гипотеза о ведущей роли архипаллиума и стриатума в обеспечении пластичности поведения на ранних уровнях филогенеза позвоночных. Его исследования позволили пересмотреть представления о роли обонятельной и других сенсорных систем в эволюции ростральных отделов мозга. Полученные данные позволили Н.П. Веселкину сформулировать ряд положений о факторах филогенетического разви-

тия конечного мозга, о применимости теории перемещения функций, о развитии таламо-телэнцефальных систем. Результаты исследований его лаборатории о межнейронных взаимодействиях в спинном мозге позвоночных, ионных механизмах пейсмекерной активности, механизмах пресинаптического торможения, функциональных механизмах регуляции синаптической передачи легли в основу новых представлений о нейро-химической интеграции, о значении множественности мессенджеров и роли параллельных каналов регуляции в ЦНС.

Интенсивную научную деятельность Николай Петрович всегда сочетал с педагогической и большой научно-организационной работой. С 2004 по 2014 г. Н.П. Веселкин был директором Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, возглавлял диссертационный совет Института. Многие годы Николай Петрович заведовал кафедрой физиологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета. Н.П. Веселкин входил в состав редакционных коллегий большого числа российских и международных научных журналов и был главным редактором Журнала эволюционной биохимии и физиологии.

Н.П. Веселкин активно привлекал для обучения и сотрудничества молодых исследователей — студентов, стажеров, аспирантов не только из России, но и их других стран — Франции, Германии, Югославии, Армении и Азербайджана. Под его руководством выполнены и защищены 15 кандидатских и 3 докторских диссертации. Его ученики работают сейчас в различных научных центрах России, США, Франции, Германии. Сам он провел часть своих исследований в тесном содружестве с французскими учеными на базе Национального музея естественной истории (проф. Ж. Реперан), Национального института медицинских исследований (проф. К. Сотело) и был избран членом-корреспондентом Национального музея естественной истории в Париже.

В 1997 г. Николай Петрович был избран членом-корреспондентом РАН, а в 2011 г. — академиком РАН. За цикл работ по исследованию морфо-функциональной эволюции нервной системы позвоночных Н.П. Веселкин в 2007 г. был награжден премией им.

Л.А. Орбели президиума РАН, а в 2009 г. — премией им. И.П. Павлова в области физиологии и медицины, утвержденной Правительством Санкт-Петербурга и Санкт-Петербургским научным центром РАН.

Н.П. Веселкин представляет собой замечательный пример преемственности четырех поколений российских ученых-физиологов. Его отец — академик РАМН Петр Николаевич Веселкин, дед — профессор-физиолог Николай Васильевич Веселкин, а прадед — крупнейший патофизиолог, профессор ВМА Петр Михайлович Альбицкий. Коллеги, ученики и друзья Н.П. Веселкина всегда ценили в нем сочетание принципиальности и демократизма, недогматический склад ума, интерес ко всем новым достижениям науки, литературы и искусства, необыкновенно широкую эрудицию и неподдельное дружелюбие. Мы все скорбим о постигшей нас утрате и выражаем глубочайшие соболезнования семье Николая Петровича. Память о нем навечно останется в наших сердцах и стенах Института им. И.М. Сеченова.

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА ПОЗВОНОЧНЫХ: РОЛЬ ЗАРЯДА ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ БЕЛКОВ

© 2023 г. Е. В. Балботкина¹, А. В. Кутина^{1,*}

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

*e-mail: kutina_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 23.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

Почечный клубочек — уникальная структура, отличающая нефроны позвоночных от нефридиев беспозвоночных животных, обеспечивающая непосредственную связь кровеносной и выделительной систем и наиболее эффективный контроль состава внутренней среды за счет значительной интенсификации фильтрации. Рассмотрены современные представления о структуре гломерулярного фильтра у представителей всех основных групп позвоночных животных (круглоротые, рыбы, амфибии, рептилии и птицы, млекопитающие). Сделан акцент на роли заряда структур гломерулярного барьера для его селективных свойств, описаны подходы к изучению вклада анионных компонентов клубочка в предотвращение потери белков плазмы крови. Рассмотрены представленные в литературе основные модели работы гломерулярного фильтра. Продемонстрировано, что отрицательный заряд является отличительной чертой гломерулярного фильтра у всех позвоночных. Показано, что многократный рост скорости клубочковой фильтрации (от низших позвоночных к птицам и млекопитающим) сопровождался рядом структурных изменений, обеспечивающих прохождение значительного объема воды и растворенных низкомолекулярных веществ через гломерулярный фильтр: увеличение числа и упорядоченности фенестр в эндотелии гломерулярных капилляров, уточнение гломерулярной базальной мембраны и полное исключение из нее клеточных элементов. Данные проведенного сравнительно-физиологического анализа гломерулярного барьера у разных групп позвоночных в наибольшей степени свидетельствуют о справедливости электрокинетической модели работы фильтра, так как именно она объясняет важность эволюционно консервативной структуры подоцитов и роль совокупности фиксированных отрицательных зарядов в стенке гломерулярного фильтра для предотвращения потери макромолекул (прежде всего белков) из крови при различной интенсивности ультрафильтрации.

Ключевые слова: гломерулярный фильтр, заряд, гломерулярная базальная мембрана, подоцит, гликозаминогликан, гликокаликс, позвоночные

DOI: 10.31857/S0044452923060025, **EDN:** GXCZYJ

ВВЕДЕНИЕ

Почечный клубочек — уникальная структура, отличающая нефроны позвоночных от нефридиев беспозвоночных животных, включая бесчерепных [1]. Именно клубочек, осуществляющий непосредственную связь кровеносной и выделительной систем, обеспечивает наиболее эффективный контроль состава внутренней среды за счет значительной интенсификации фильтрации [2]. В ряду позвоночных от круглоротых до птиц и млекопитающих прослеживается отчетливая тенденция к росту скорости гломерулярной фильтрации. Скорость клубочковой фильтрации возрастает с 0.5–1.2 мл/ч/100 г веса у круглоротых и рыб до 42–50 мл/ч/100 г веса у млекопитающих и 16–30 мл/ч/100 г веса у птиц [3, 4]. Несмотря на такое существенное повышение скорости, качество ультрафильтрации не снижается: гломерулярный фильтр млекопитающих эф-

фективно задерживает большинство макромолекулярных соединений, препятствуя их попаданию в мочу. Прошло уже несколько десятков лет с первых описаний ультраструктурной организации стенки клубочковых капилляров с помощью электронной микроскопии, но общепринятой теории о механизмах, посредством которых клубочковый фильтр ограничивает трансмуральный переход большинства белков плазмы, нет [5]. Многочисленные исследования показали, что возможность прохождения макромолекул из крови в пространство капсулы Боумена зависит от их размера, конфигурации и электрического заряда. В последние годы ставится под сомнение важность заряда структур гломерулярного фильтра в ограничении фильтрации белков, и, в частности, альбумина [6].

В настоящем обзоре собраны данные о строении и функциональных свойствах фильтрационного барье-

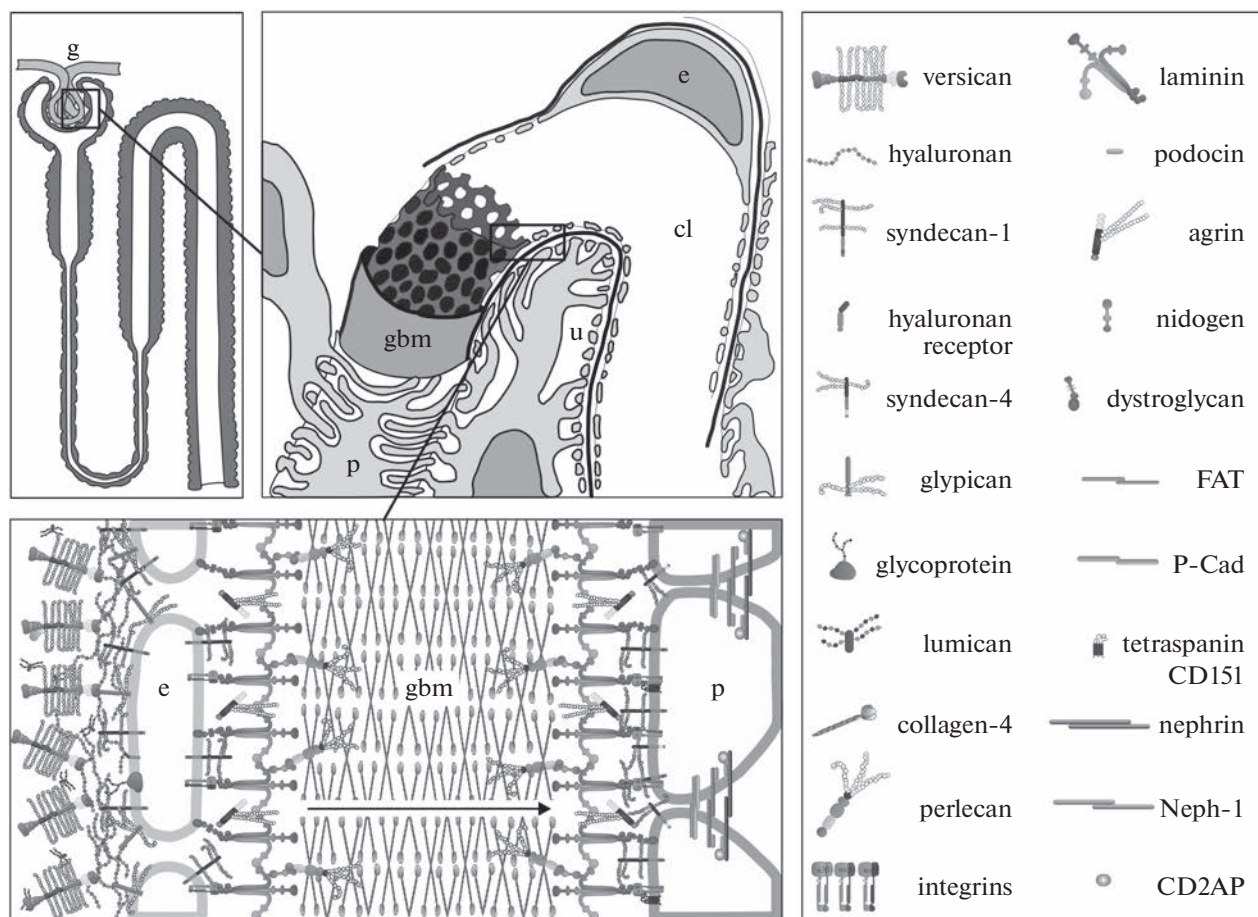


Рис. 1. Схема строения нефрона, стенки гломерулярного капилляра и клубочкового фильтра на клеточном и молекулярном уровне. cl – просвет капилляра, e – эндотелий, g – почечный клубочек, gbm – ГБМ, p – подоцит, u – мочевое пространство. Стрелка – направление, в котором происходит ультрафильтрация.

ра у разных групп позвоночных, рассмотрены основные гипотезы о механизмах ультрафильтрации в клубочке. Проанализированы экспериментальные работы последних лет, посвященные изучению заряд-селективных свойств клубочкового фильтра. Поиск оригинальных экспериментальных статей осуществлялся по базе PubMed (временной интервал 2000–2023 гг.) по ключевым словам: glomerular, filter or barrier, charge.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА ПОЗВОНОЧНЫХ

Гломерулы являются одной из основных частей нефрона позвоночных, исключение представляют лишь некоторые морские костистые рыбы, имеющие агломерулярные нефроны [2]. У миксин около 60 гломерул, открывающихся короткими шейными отделами в один из двух архинефрических протоков [7]. У миног несколько клубочков объединяются вместе в гломеру с общим мочевым пространством, из которого начинаются каналцы нефронов [8]. У всех

остальных позвоночных каждый нефрон имеет собственный капиллярный клубочек. Количество нефронов и соответственно клубочков в почках различных позвоночных варьирует от 2 в пронефросе рыб, до миллиона в каждой почке (метанефросе) у млекопитающих. Интересно, что возрастание интенсивности функционирования клубочка не сопровождается радикальными перестройками его микроанатомии. Структура фильтрационного барьера от круглоротых до млекопитающих чрезвычайно консервативна и образована одними и теми же элементами (рис. 1): фенестрированный эндотелий, гломерулярная базальная мембрана (ГБМ) и подоциты [9].

ЭНДОТЕЛИЙ ГЛОМЕРУЛЯРНЫХ КАПИЛЛЯРОВ

Почечные клубочки у позвоночных варьируют по размеру, а также по числу и диаметру капилляров, входящих в их состав [8, 10]. Для круглоротых и хрящевых рыб характерны очень крупные капиллярные клубочки, у представителей остальных

классов позвоночных они существенно мельче. Диаметр микрососудов (в том числе клубочковых капилляров) у млекопитающих меньше, чем у большинства позвоночных, что связывают с различиями в размерах эритроцитов [11].

Первая часть клубочкового фильтра представлена гломерулярным эндотелием, особенностью которого является наличие в нем сквозных отверстий — фенестр. У представителей разных классов позвоночных численность и ширина фенестр в эндотелии варьируют. У круглоротых и хрящевых рыб фенестры в эндотелии встречаются редко [8, 12], у остальных групп фенестры встречаются регулярно и составляют существенную часть от площади капилляров. Предполагается, что при росте скорости клубочковой фильтрации фенестры необходимы для обеспечения беспрепятственного потока значительных объемов воды и растворенных веществ. У млекопитающих до 30% поверхности гломерулярных капилляров занято фенестрами [13, 14].

По данным просвечивающей электронной микроскопии наблюдаются некоторые межвидовые различия в диаметре фенестр: 100–300 нм у *Rana catesbeiana*, *Geotrypetes seraphini*, *Necturus maculosus* [15–17], 60–120 нм у *Xenopus laevis* [18], 50–200 нм у головастика *Bufo viridis* [19], 80–185 нм у черепахи *Pelodiscus sinensis* [20], 30–150 нм у крысы, 40–100 нм у утконоса [21], 60–80 нм у человека [22]. По данным сканирующей электронной микроскопии размер фенестр у млекопитающих (*Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*), рептилий (*Iguana iguana*), амфибий (*Rana catesbeiana*) и костистых рыб (*Cyprinus carpio*) составляет около 80 нм [23]. Изначально первому компоненту клубочкового барьера не придавалась большого значения в ограничении прохождения альбумина и других белков плазмы крови, так как диаметр фенестр в эндотелии намного превышает размер белков, которые в норме задерживаются почечным фильтром (орозомукоид — 2.9 нм, альбумин — 3.6 нм, трансферрин — 4.3 нм, IgG — 5.5 нм, α₂-макроглобулин — 9.0 нм, фибриноген 10.8 нм) [5, 14]. Использование методов визуализации гликокаликса с введением различных красителей или маркерных молекул показало, что нативный гликокаликс эндотелия гломерулярных капилляров и адсорбированные на нем компоненты формируют слой толщиной 200–400 нм и практически полностью перекрывают фенестры и ограничивают свободную фильтрацию макромолекул [14, 24–26].

Гликокаликс эндотелиальных клеток состоит из закрепленных на мембране протеогликанов и сиалопротеинов, которые в сочетании с секретируемыми протеогликанами и гиалуроновой кислотой образуют организованный, чрезвычайно гелативизированный гель. В гликокаликсе в области фенестр выше соотношение гепарансульфата и гиалуроновой кислоты к сиалопротеинам, чем в участках

между фенестрами. Молекулы гликокаликса эндотелиальных клеток проникают в субэндотелиальную ГБМ, а также в эндотелиальный поверхностный слой со стороны просвета капилляров [22].

Протеогликаны состоят из сердцевинного белка и набора ковалентно связанных с ним боковых цепей гликозаминогликанов (ГАГ) (обычно не менее 60% молекулярной массы). В дополнение к ГАГ цепям протеогликаны также могут быть модифицированы разветвленными боковыми цепями олигосахаридов, некоторые из которых оканчиваются сиаловой кислотой. ГАГ представляют собой длинные неразветвленные полимеры из повторяющихся дисахаридных звеньев. Некоторые ГАГ сильно сульфатированы, вследствие чего имеют выраженный отрицательный заряд (гепарансульфат, хондроитинсульфат). Из ГАГ наиболее распространенными в гликокаликсе эндотелия являются гепарансульфат и нессульфатированный ГАГ гиалуронан. Методом стохастической оптической реконструктивной микроскопии показано, что пучки гепарансульфата отходят вертикально от эндотелиальных клеток и переплетаются с горизонтально расположенными длинными нитями гиалуронана, образуя организованную решетчатую сеть на поверхности клеток [27].

У позвоночных гиалуроновая кислота синтезируется вне комплекса Гольджи гиалуронан-синтазами, кодируемыми тремя различными генами (*has1–3*), а разрушается гиалуронидазами 1 и 2 и Семир 1 и 2 (гиалуронидазы, индуцирующие миграцию клеток). Полимеры гиалуроновой кислоты имеют размер от 1000 до 10000 кДа и связывают по 15 молекул воды на каждый дисахарид. На люминальной поверхности эндотелиальных клеток гиалуроновая кислота связывается с другими компонентами гликокаликса и поверхностного слоя эндотелия, в том числе с секреторными протеогликанами [14, 24, 27].

Гепарансульфат и другие сульфатированные ГАГ (хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат) собираются на сердцевинных белках различных протеогликанов в комплексе Гольджи специфическими глюкуронилтрансферазами и затем подвергаются специфическим модификациям (деацетилирование, сульфатирование, эпимеризация). Некоторые протеогликаны являются интегральными трансмембранными белками (синдеканы), некоторые ковалентно связаны с внешним слоем плазматической мембраны с помощью гликозилфосфатидилинозитол-якоря (глипиканы), а другие секретируются (перлекан, версикан, люмикан) [14].

Синдеканы 1–4 представляют собой повсеместно распространенные протеогликаны трансмембранного типа, однократно пронизывающие мембрану. Молекулярный вес их сердцевинных белков составляет 20–45 кДа. Внеклеточные домены синде-

кана 1 и 3 содержат гепарансульфат и хондроитинсульфат, в то время как синдеканы 2 и 4 включают только гепарансульфат. Показано, что синдеканы 1 и 4 преимущественно экспрессируются в подоцитах, а синдекан 3 — в гломерулярных эндотелиальных клетках [28]. Глипиканы (1–6) представляют собой протеогликаны, состоящие из белков массой 60–70 кДа и боковых цепей гепарансульфата. С-концы глипиканов прикреплены к плазматической мембране через гликозилфосфатидилинозитол-якоря. В эндотелиальных клетках преобладает глипикан-1 [14].

Версикан — основной секреторный хондроитинсульфат-содержащий протеогликан эндотелия. Его сердцевинный белок с молекулярным весом около 400 кД имеет четыре сплайс-варианта с разным числом участков связывания с хондроитинсульфатом. Он взаимодействует с клетками через интегриновые и неинтегриновые рецепторы. Показана его выработка гломерулярным эндотелием [29] и подоцитами [28]. Перлекан — очень крупный протеогликан, состоящий из белка с молекулярной массой 470 кДа и трех цепей ГАГ (по 40 кДа), прикрепленных к N-концу. С-конец перлекана взаимодействует с трансмембранными интегринами. Перлекан, продуцируемый эндотелиальными клетками, в качестве ГАГ содержит гепарансульфат и секретируется в субэндотелиальный матрикс и в люминальный поверхностный слой эндотелиальных клеток [30]. Декорин, бигликан и люмикан — секреторные протеогликаны с небольшим сердцевинным белком (40 кДа) с умеренным количеством цепей ГАГ (кератансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат), в субэндотелиальном матриксе взаимодействуют с коллагеном [14].

Сиаломуцины (подокаликсин, эндогликан, эндомуцин) — интегральные гликопротеины плазматической мембраны, каждый из которых имеет один трансмембранный домен, большой внеклеточный “муциновый” домен и цитоплазматический домен, который взаимодействует с белками цитоскелета. “Муциновый” домен богат сериновыми, треониновыми и пролиновыми остатками, к которым прикрепляются гликаны с концевыми сиаловыми кислотами, несущими отрицательный заряд [14].

ГЛОМЕРУЛЯРНАЯ БАЗАЛЬНАЯ МЕМБРАНА (ГБМ)

Вторая часть клубочкового фильтрационного барьера представлена ГБМ. Эта структура оказалась наиболее вариабельной у разных групп позвоночных. Прослеживается общая тенденция к уменьшению толщины ГБМ от низших к высшим позвоночным (рис. 2) (круглоротые > хрящевые рыбы > амфибии > млекопитающие). Но и в пределах одной группы позвоночных могут быть существенные различия строения гломерулярного фильтра в зависимости от скорости клубочковой

фильтрации и адаптации работы почек к разным средам обитания (пресная или морская вода, пересыхающие водоемы, пустыни). Наибольшая вариабельность строения почек и ГБМ, в частности, характерна для костистых рыб и рептилий [10]. Для животных с более низкой скоростью клубочковой фильтрации характерна более толстая ГБМ, чем у представителей с высокой скоростью фильтрации [31]. Показано, что у мигрирующих рыб при смене среды обитания происходит динамическая перестройка ГБМ [32–34].

Классически в ГБМ выделяют три слоя: субэндотелиальный менее плотный слой (*lamina rara interna*), центральный электронноплотный слой (*lamina densa*) и субэпителиальный менее плотный слой (*lamina rara externa*). ГБМ представлена межклеточным матриксом и волокнами, которые вырабатываются эндотелием гломерул и подоцитами. У птиц и млекопитающих ГБМ практически не содержит клеточных элементов [35, 36]. Специализированная соединительная ткань в клубочке (мезангий) располагается ближе к основанию капилляров у млекопитающих или единым скоплением в центре клубочка у птиц [8, 11, 37]. У большинства рептилий и низших позвоночных мезангий распространяется в ГБМ, за счет этого происходит расширение субэндотелиального слоя. У круглоротых [12], хрящевых [38] и часто у костистых рыб [39, 40] мезангиальные клетки и их отростки окружают гломерулярные капилляры по всему периметру. Мезангиальный матрикс состоит из рыхло расположенных коллагеновых фибрилл и различных тонких фибрилл. У круглоротых (миксины) и хрящевых рыб (акулы, скаты) непосредственно под эндотелием выявляется его собственная прерывистая базальная мембрана [8, 36, 38], чего нет у костистых и двоякодышащих рыб [33, 39, 40]. У амфибий число клеточных элементов в перикапиллярном пространстве варьирует. У *Rana catesbeiana* описывают значительное число мезангиальных клеток вокруг капилляров [15], но у большинства изученных видов (*Xenopus laevis*, *Rana temporaria*, *Geotrypetes seraphini*, *Necturus maculosus*) в субэндотелиальный слой ГБМ заходят только отростки мезангиальных клеток [8, 16, 17, 41]. Плотность упаковки фибрилл (тонкие 3–8 нм в диаметре, более толстые 13–14 нм в диаметре, поперечно-исчерченные коллагеновые фибриллы 55–80 нм в диаметре) разная от участка к участку, а некоторые области субэндотелиального пространства вообще лишены волокон. У рептилий субэндотелиальное пространство в основном бесклеточное (*Iguana iguana*, *Thamnophis sirtalis*, *Pelodiscus sinensis*), у некоторых видов содержит отростки мезангиальных клеток (*Podarcis taurica*) [20, 23].

У миноги *Lampetra fluviatilis* общая толщина базальной мембраны гломуса составляет около 900 нм (*lamina rara externa* и центральный плотный слой по 50 нм, субэндотелиальный слой толщиной

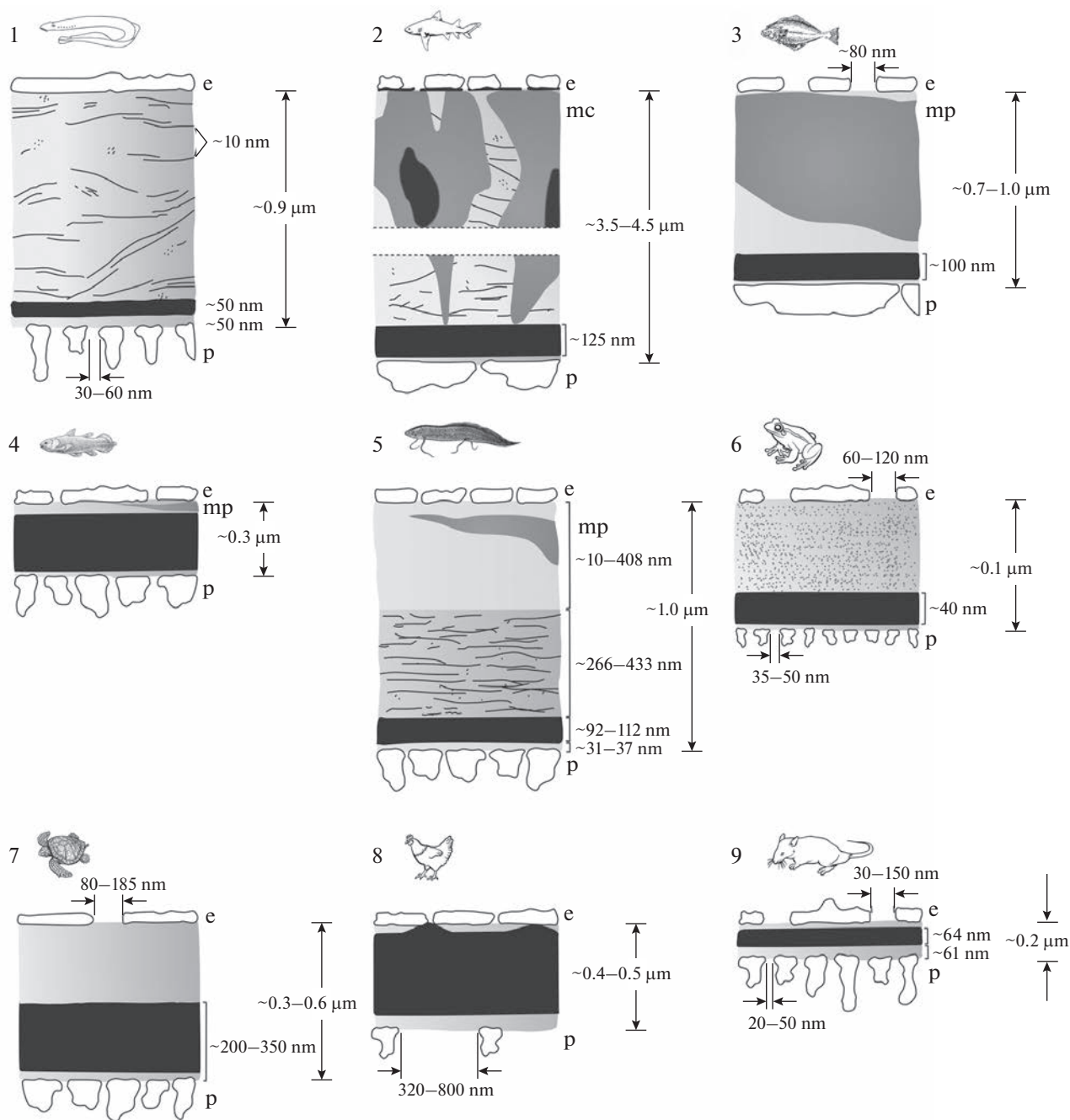


Рис 2. Схематичное изображение структуры ГБМ у представителей разных групп позвоночных. 1 – *Lampetra fluviatilis*, 2 – *Squalus acanthias*, 3 – *Parophrys vetulus*, 4 – *Latimeria chalumnae*, 5 – *Protopterus dolloi*, 6 – *Rana temporaria*, 7 – *Pelodiscus sinensis*, 8 – *Gallus gallus*, 9 – *Rattus norvegicus*, е – эндотелий, mc – мезангиальная клетка, mp – отросток мезангиальной клетки, p – подоцит.

800 нм, имеющий фибриллярное строение) [8]. У морских костистых рыб (*Trachurus mediterraneus*, *Chelon auratus*, *Diplodus annularis*, *Spicara flexuosa*, *Gobius niger*, *Mullus barbatus ponticus*, *Scorpaena porcus*, *Parophrys vetulus*) толщина ГБМ варьирует в диапазоне 660–1000 нм [33, 39, 42]. У латимерии *Latimeria chalumnae* и у многих пресноводных костистых рыб умеренная толщина ГБМ (около

300 нм), что, по-видимому, способствует образованию большого количества клубочкового фильтрата [31, 43]. У двоякодышащей рыбы *Protopterus dolloi* ГБМ очень толстая – до 1000 нм (*lamina rara externa* 31–37 нм, *lamina densa* 92–112 нм, остальное – субэндотелиальный слой) [40]. У амфибий ГБМ чаще средняя по толщине, но может быть значительной (субэндотелиальный слой 100–1000 нм, плотный

центральный слой 30–400 нм) [8, 15, 17, 41]. У рептилий выраженность перикапиллярного мезангия имеет большую видовую вариабельность, а толщина ГБМ составляет от 800 до 1600 нм у чешуйчатых [20, 23], 300–600 нм у черепахи [20, 23]. У птиц общая толщина ГБМ 350–500 нм [37], у млекопитающих – 110–400 нм [21, 44], например у крысы в среднем составляет 156 нм (центральный слой 64 нм, субэндотелиальный – 31 нм, субэпителиальный – 61 нм) [36].

ГБМ с ее плотной волокнистой сетью, вероятно, обеспечивает большую часть клубочкового гидравлического сопротивления, будучи при этом хорошо проницаемой для воды и низкомолекулярных растворенных веществ. Химический состав и организация ГБМ наиболее полно изучены у млекопитающих [45]. Работы, выполненные на представителях других классов позвоночных, указывают на принципиальное сходство структуры ГБМ позвоночных. Основу ГБМ составляют коллагеновые волокна (IV тип) и ламинин (800-кДа гетеротримерный белок из α , β и γ -гликопротеиновых цепей) [46]. Также в ГБМ располагаются многочисленные протеогликаны, основные из которых коллаген VIII, агрин, перлекан, версикан и синдеканы. Часть из них являются компонентами гликокаликса мембран ножек подоцитов и эндотелиальных клеток гломерулярных капилляров. Визуализация ГБМ у млекопитающих [47] со сверхвысоким разрешением (STORM-микроскопия) выявила высокоупорядоченную структуру с двумя различными сетями из ламинина и двумя отдельными сетями из коллагена IV, которые организованы независимо подоцитами и эндотелиальными клетками. Сети ламинина и коллагена IV не взаимодействуют друг с другом непосредственно, существует множество молекул-мостиков (например, нидогены [45]), которые их стабилизируют, предположительно образуя плотную, гелеобразную субстанцию, препятствующую прохождению макромолекул. Основная часть коллагена IV, формирующая центральную часть в ГБМ, секретируется подоцитами и представлена коллагеновыми $\alpha 3(\alpha 4)5(\text{IV})$ протомерами [48, 49]. Отдельный более тонкий слой коллагеновых волокон в ГБМ, расположенный ближе к эндотелию (примерно на глубине 60 нм), формируется за счет секреции эндотелиоцитами коллагеновых протомеров $\alpha 1(\alpha 2)(\text{IV})$ [47]. Ламинин и агрин образуют два слоя внутри ГБМ, в каждом слое оба белка ориентированы своими С-концевыми доменами ближе к клеточным мембранам, а N-концевыми доменами обращены к внутренней части ГБМ. Эти данные подтверждаются и биохимическими исследованиями, показавшими, что С-концевые домены ламинина и агрина взаимодействуют с клеточными рецепторами (интегрины, дистрогликаны) [47].

Заряд ГБМ обеспечивается сульфатированными ГАГ (главным образом, гепарансульфат) протеогликанов, гиалуроновой кислотой и в меньшей степени карбоксильными и сиалильными группами гликопротеинов. Анионные участки обнаруживаются вдоль обеих *laminae rarae*, но наиболее заметны субэпителиально [50].

ПОДОЦИТЫ

Подоциты представляют из себя наиболее константную часть гломерулярного барьера у позвоночных. Сравнительно недавнее исследование подоцитов всех классов позвоночных животных с использованием методов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии выявило принципиальное сходство подоцитов всех изученных видов [51]. Подоциты синтезируют компоненты ГБМ, участвуют в регуляции проницаемости гломерулярного фильтра, а также поддерживают форму капилляров, препятствуя их расширению под действием гидравлического давления. Это высокоспециализированные клетки сложной формы, которые имеют тело, обращенное в сторону мочевого пространства, основные отростки (первичные и вторичные), располагающиеся в плоскости параллельной базальной мембране и оплетающие гломерулярные капилляры со всех сторон, и тончайшие выросты длиной 1–1.5 мкм – ножки [51] (рис. 1, 3). Представления о строении подоцитов сравнительно недавно были дополнены данными, полученными методом сканирующей электронной микроскопии серийных срезов с 3D-реконструкцией (Serial block-face scanning electron microscopy) [52]. Обычно у подоцита 4–6 первичных отростков, которые могут давать вторичные отростки (угол ветвления меняется в пределах 30–150°) [51]. От нижней поверхности тела подоцита и от всех основных отростков вниз образуются гребневидные выступы, от которых начинаются ножки [52]. Ножки подоцитов и основания гребневидных выступов контактируют с ГБМ. Таким образом, тела подоцитов и их основные отростки всегда отделены от поверхности капилляров, они приподняты над ГБМ за счет гребневидных выступов [52]. Это довольно необычно для эпителиальных клеток, и позволяет предположить, что такая особенность важна для функционирования гломерулярного фильтра. Ножки соседних подоцитов переплетаются и между ними формируются тонкие щели, перекрытые специализированными межклеточными контактами – щелевыми диафрагмами (видоизмененный плотный межклеточный контакт). Щелевые диафрагмы всегда формируются между ножками разных подоцитов, т.е. не наблюдается взаимодействия ножек соседних отростков одного подоцита [53] (рис. 3). Для поддержания сложной формы подоцита критически важен цитоскелет. В основе первичных и вторичных отростков лежат микро-

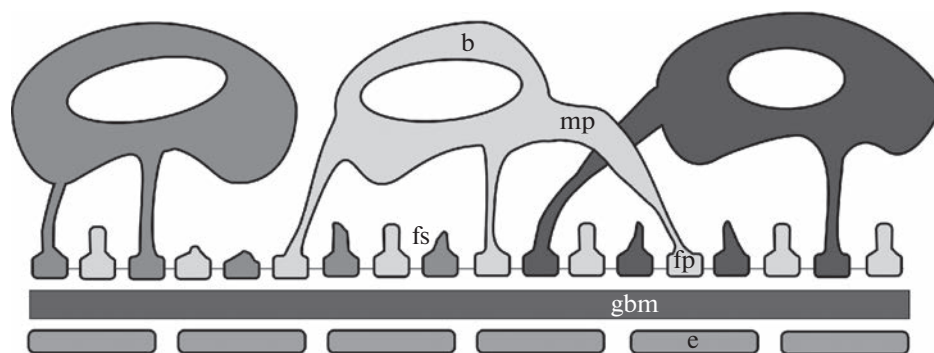


Рис. 3. Схематичное изображение трех соседних подоцитов. b — тело подоцита, e — эндотелий, gbm — ГБМ, fp — ножки подоцита, fs — фильтрационные щели, mp — основной отросток подоцита.

трубочки, а в ножках подоцитов ключевым компонентом является актин [54]. Кортикальная активная сеть под плазматической мембраной ножек подоцитов в отдельных точках связывается со специализированными белками щелевой диафрагмы (особенно нефрином, подоцином и Neph1) [55].

Мембрана ножек подоцитов покрыта достаточно выраженным слоем гликокаликса, который включает мембранные протеогликаны, содержащие сульфатированные ГАГ и сиалированные гликоконъюгаты и несущие выраженный отрицательный заряд. Основным сиалопротеином на подоцитах является сильно гликозилированный белок подокаликсин. Внеклеточный домен подокаликсина имеет сложную разветвленную структуру и несет отрицательный заряд, а внутриклеточный связан с цитоскелетом. Подоциты также продуцируют мембранные протеогликаны (глипикан 1, синдеканы 1 и 4, декорин, бигликан) и секреторные протеогликаны, входящие в состав ГБМ (агрин, перлекан, версикан) [56]. Считается, что гликокаликс подоцитов выполняет две основные функции: участвует в заряд-селективной фильтрации, т.е. не пропускает в мочевое пространство отрицательно заряженные молекулы белков и поддерживает фильтрационные щели в открытом состоянии, обеспечивая функционирование щелевых диафрагм [57].

Ширина фильтрационных щелей составляет порядка 40 нм, этот показатель практически одинаков у представителей разных групп позвоночных (у амфибий 35–50 нм, у млекопитающих — 25–60 нм) [5]. Исключения составляют птицы, у которых ширина фильтрационных щелей примерно на 40–80% больше, чем у млекопитающих, а полианионный заряд меньше. Вероятно, по этой причине мочеточниковая моча птиц обычно содержит примерно в 100 раз больше белка (5 мг/мл), чем мочеточниковая моча млекопитающих [58]. На настоящий момент белки, образующие щелевые диафрагмы, идентифицированы и наиболее подробно изучены у млекопитающих, а также выявлены их гомологи у представителей других классов позвоночных [18, 59]. Основными бел-

ками, формирующими соединение соседних ножек подоцитов, являются нефрин и подоцин, которые экспрессируются исключительно в щелевой диафрагме. Нефрин и подоцин оказались крайне консервативными, и их гомологи обнаруживаются не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных. Некоторое время считалось, что единственной группой позвоночных, лишенных нефрина, являются птицы, так как в их геноме не обнаруживали генов соответствующих белков [60, 61]. Однако недавние работы с использованием метода ПЦР единичных клеток позволили обнаружить ряд генов (и среди них *nhps1*), которые не выявлялись при полногеномном секвенировании ДНК из-за большого количества ГЦ-повторов в некоторых участках хромосом у птиц [62]. Таким образом, нефрин и подоцин представляют собой белки, критически важные для формирования межклеточных контактов между ножками подоцитов. Белки образуют гибкие пружиноподобные мостики, которые препятствуют прохождению макромолекул, а также прикрепляют цитоскелет к плазматической мембране. Генетические дефекты этих белков вызывают врожденный нефритический синдром финского типа (нефрин) и стероид-резистентный нефритический синдром (подоцин) [63].

Нефрин — трансмембранный белок, содержащий примерно 1200 аминокислотных остатков, кодируемый геном *nphs1*. В почке только подоциты экспрессируют нефрин. Нефрин имеет короткий внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен с восемью IgG-подобными фрагментами и одним фибронектин-III-подобным. Длина внеклеточного домена нефрина составляет около 35 нм [64]. Молекулы нефрина из соседних ножек подоцитов гомофильно взаимодействуют друг с другом в середине фильтрационной щели и формируют каркас щелевой диафрагмы [9]. В комплексе с нефрином находятся также белки Neph1, Neph2, ZO-1, FAT1, FAT2, P-cadherin и другие. Внутриклеточный домен нефрина через бел-

ки подоцин и CD2-ассоциированный белками связан с актиновым цитоскелетом клетки и принимает участие в передаче внутриклеточных сигналов.

Подоцин — шпилькообразный интегральный мембранный белок массой 42 кДа, кодируемый геном *nphs2*, способствующий структурной организации щелевой диафрагмы. В отличие от нефрина и Neph1, его N- и C-концы располагаются внутриклеточно [65]. Подоцин взаимодействует с внутриклеточными доменами нефрина и Neph1, а также с CD2-ассоциированным белком. У мышей с нокаутом гена подоцина развивается тяжелая протеинурия, и они умирают в течение нескольких дней после рождения [65].

ВЗАИМОСВЯЗЬ АНИОННОГО ЗАРЯДА И ПРОНИЦАЕМОСТИ СТРУКТУР ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА

Как было показано в предыдущих разделах обзора, все элементы клубочкового фильтрационно-го барьера почек позвоночных содержат значительное количество анионных полимеров. Под избирательностью к заряду частиц понимают свойство клубочкового фильтра затруднять прохождение отрицательно заряженных макромолекул по сравнению с нейтральными или положительно заряженными. Представления базировались на наблюдениях, что у крыс альбумин имеет более низкий коэффициент фильтрации по сравнению с фиколлом и декстранами эквивалентного размера (3.6 нм). Также показано, что через клубочковый фильтр проходит 11% нейтрального декстрана, 42% декстрана в катионной форме, в то время как отрицательно заряженные молекулы декстран-сульфата практически не фильтруются; аналогичные данные были показаны для пероксидазы хрена и миоглобина с различным зарядом [6]. Суммарный отрицательный заряд гломерулярного фильтра у млекопитающих оценивается в 50 мэкв/л [66].

Анионные сайты в различных структурах гломерулярного фильтра у всех групп позвоночных были продемонстрированы с использованием различных красителей (альциановый синий, рутениевый красный, сафранин О) и катионных тестовых молекул (ферритин, пероксидаза, катионный коллоид какодилата железа, полиэтиленмин). Исследования проницаемости клубочков почек миксины (*Paramyxine atami* Dean), и двух видов миног *Entosphenus japonicus* и *Petromyzon marinus* продемонстрировали, что гломерулярный фильтр круглоротых по числу и распределению анионных сайтов сравним с таковым в клубочке млекопитающих [67–69]. Отрицательно заряженные структуры выявлялись на поверхностях эндотелиальных клеток, а также в толстой фиброзной пластинке *rara interna* ГБМ клубочков и на поверхности подоцитов и их ножек. Как для миноги, так и для миксины было показано, что нативный анионный ферритин при

инъекции в дорсальную часть аорты лишь в минимальной степени проникал через стенку капилляра, тогда как катионизированные молекулы ферритина быстро проникали в ГБМ через фенестры в эндотелии капилляров и впоследствии выводились в мочевые пространства через промежутки между ножками подоцитов [67, 68]. В исследовании на почках камбалы (*Pseudopleuronectes americanus*) было показано, что структуры гломерулярного фильтра имеют отрицательный заряд; катионизированный ферритин связывался с внутренней пластинкой ГБМ с регулярными интервалами в 60 нм. Продемонстрирована значимость анионного гломерулярного барьера для снижения почечного клиренса анионных пептидов-антифризов (3–8 кДа, pI менее 5), имеющихся в крови камбалы в зимний период [39]. Данные о распределении анионных сайтов также были получены на рыбе *Danio rerio* с использованием полиэтиленмина [70]. На 15 видах рептилий из различных сред обитания было показано, что ГБМ, в отличие от других эпителиальных базальных мембран, содержит кислые мукополисахариды (сиалированные гликопротеиды) [71]. В почках представителей всех семи классов позвоночных животных с использованием красителей анионные сайты были выявлены в гликокаликсе эндотелиальных и эпителиальных (подоциты) клеток, в *lamina rara interna* и *lamina rara externa* ГБМ, на поверхности коллагеновых волокон и микрофибрилл в мезангии [36].

За десятилетия изучения свойств гломерулярного фильтра и механизмов ультрафильтрации были использованы разнообразные экспериментальные подходы для оценки роли заряда фильтра в целом, а также его отдельных элементов для предотвращения потери белка. В целом их можно разделить на подходы, которые были направлены на не селективное снижение плотности анионных сайтов во всех структурах почечного фильтра, и те, в которых анализировался вклад конкретных протеогликанов.

Первая категория более многочисленна. Показано, что гиперэкспрессия гепараназы (единственный эндогенный фермент, расщепляющий гепарансульфат) [72], вымывание нековалентно связанных с эндотелием клубочковых капилляров анионных молекул [73], введение антител к гепарансульфату протеогликанов [74] приводили к развитию альбуминурии. Напротив, у трансгенных мышей с сахарным диабетом, у которых отсутствует гепараназа, альбуминурия не развивается. Более того, альбуминурия уменьшалась за счет ингибирования гепараназы у мышей дикого типа при диабете [75]. На рыбах *Danio rerio* показана значимость сульфатирования гепарансульфата для сохранения целостности и барьерных свойств гломерулярного фильтра, продемонстрировано развитие протеинурии у рыбок, нокаутных по генам *sulf1*, *sulf2a* и *sulf2b*, кодирующим 6-О-эндосульфатазы [76]. В другой работе, напротив, показано, что глобаль-

ный дефицит гепарансульфата, вызванный нокаутом гена *ext2* (кодирует фермент полимеризации ГАГ), существенно не влияет на проницаемость клубочкового фильтра для декстрана массой 70 кДа, несмотря на снижение плотности анионных сайтов в структурах фильтра [70]. Это может указывать на роль остаточных анионных компонентов (например, коллаген 4 типа с отрицательно заряженными остатками сиаловых кислот) для обеспечения зарядовой селективности гломерулярного фильтра [70].

При ферментативном удалении отрицательно заряженных остатков сиаловых кислот из гликозилированных белков (главным образом из гликокаликса) с помощью нейроминидазы наблюдалось повышение проницаемости эндотелия для альбумина *ex vivo* [77]. У мышей с индуцибельной делецией гена галатозилтрансферазы, фермента необходимого для сиалирования всех сиаломуцинов, наблюдаются уменьшение количества анионных сайтов в гломерулярном фильтрационном барьере и выраженная альбуминурия [78]. Делеция у мышей гена другого фермента сиалирования (трансферазы цитидинмонофосфат-сиаловой кислоты) вызывает у животных массивную протеинурию и раннюю перинатальную смертность [79].

При инфузии гиалуронидазы наблюдали уменьшение высоты гликокаликса эндотелиальных клеток в гломерулярных капиллярах и увеличение экскреции альбумина [25]. У пациентов с сахарным диабетом обнаружено, что более высокие уровни циркулирующей гиалуроновой кислоты и гиалуронидазы ассоциированы с развитием микроальбуминурии, а нарушение эндотелиального гликокаликса связано со значительным снижением содержания гиалуроновой кислоты в эндотелии клубочков [80].

Нейтрализация анионных участков в почечном фильтре (преимущественно в ГБМ) с помощью поликатионов (протамина сульфат, гексадиметрин, поли-L-лизин) приводит к повышению проницаемости для анионных макромолекул, в том числе и для альбумина [81]. В наших работах был выявлен сходный эффект при введении крысам производных нитроаргина [82, 83]. Работы, проведенные на изолированных ГБМ [84], в отличие от работ *in vivo*, не продемонстрировали селективность ГБМ в отношении заряда фильтрующихся молекул и поставили под сомнение важность нативного анионного заряда фильтра для ограничения прохождения белков плазмы.

Исследование животных (крысы Munich Wistar Fromter, крысы Zucker с ожирением), у которых с возрастом спонтанно развивается альбуминурия, продемонстрировало значимость гликокаликса и эндотелиального поверхностного слоя. С помощью многофотонной микроскопии *in vivo* была выявлена потеря эндотелиального гликокаликса в гломерулярных и мезентериальных микрососудах у

старых крыс Munich Wistar Fromter [85]. У крыс Zucker развитие альбуминурии с возрастом сопровождается потерей эндотелиального поверхностного слоя в сосудах клубочков, гиперфильтрацией макромолекул и потерей экспрессии синдекана 1 в клубочках [86]. Показано снижение экспрессии гломерулярного версикана у мышей с сахарным диабетом [87].

Среди работ с избирательным подходом хотелось бы упомянуть следующие результаты. На рыбке *Danio rerio* изучен синтез мембранных протеогликанов гликокаликса эндотелия и подоцитов (версикан, синдеканы). Показано, что нокаут гена версикана (но не синдеканов 3 и 4) снижает барьерные свойства стенки гломерулярных капилляров, приводит к сглаживанию ножек подоцитов, повреждению эндотелия, потере белков плазмы, развитию отеков [28]. Адриамицин снижает экспрессию гломерулярного версикана, *in vivo* это приводит к уменьшению толщины клубочкового гликокаликса и поверхностного слоя эндотелия и увеличению коэффициента фильтрации альбумина [88]. Эндотелий-специфичная делеция *has2* у взрослых мышей вызывала снижение гиалуроновой кислоты в клубочковых капиллярах и уменьшение мечения катионным ферритином, сопровождавшееся прогрессирующей протеинурией, изменениями ультраструктуры гломерулярных эндотелиальных клеток и инволюцией капилляров [89]. Показано, что мыши с подоцит-специфичным нокаутом генов *agr1* и *perlecan*, а также гена *extl3*, кодирующего фермент гликозилирования [90], имели существенные отличия (примерно на 50%) в заряде субэпителиальной части (но не субэндотелиальной) ГБМ, но при этом у них не изменялась фильтрация анионного фикола и не выявлялась протеинурия [91, 92]. Подоцит-специфичный нокаут генов *ext1* [93] и *ndst1* [94], продукты которых необходимы для полимеризации гепарансульфата на протеогликанах, продуцируемых подоцитами, привел к снижению содержания гепарансульфата и плотности анионных сайтов в ГБМ, но вызвал лишь небольшую альбуминурию у животных в возрасте 8 и 18 мес. При мутациях, приводящих к отсутствию сайтов прикрепления ГАГ цепей гепарансульфата в N-терминальном домене перлекана, у мышей нормальны ультраструктура клубочков и заряд ГБМ, а также отсутствуют признаки заболевания почек, но при перегрузке белком наблюдается протеинурия [95]. Таким образом, подоцит-специфичный нокаут ряда генов, необходимых для нормального синтеза протеогликанов и метаболизма ГАГ, у мышей в основном не приводил к выраженной протеинурии даже при проведении нагрузочных проб, и приведенные работы вызвали сомнения в справедливости классической концепции о значимости заряда для селективных свойств гломерулярного фильтра [7]. Гепарансульфат-протеогликан

синтезируются не только подоцитами, но и мезангиальными клетками и эндотелием [96, 97], и возможно, что сохранение части анионных сайтов в гломерулярном фильтре предотвращает развитие нарушений.

Учитывая химическую природу компонентов гломерулярного фильтра (высокомолекулярные гидратированные полимеры), все описанные выше подходы не позволяют говорить исключительно о влиянии заряда на проницаемость для белков. Любые модификации протеогликанов и сиалопротеинов изменяют не только заряд, но и сказываются на конформациях молекул и степени их гидратированности, а следовательно, и на эффективном размере пор в гломерулярном фильтре. Можно говорить о том, что в этом случае селективность гломерулярного фильтра в отношении заряда и размера частиц меняются одновременно. Также очевиден дефицит экспериментальных подходов к селективному влиянию на выработку протеогликанов гломерулярным эндотелием для оценки их вклада в итоговый заряд и проницаемость гломерулярного фильтра.

МОДЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛОМЕРУЛЯРНОГО ФИЛЬТРА

К настоящему моменту предложено достаточно много различных моделей работы клубочкового фильтра и их модификаций для математического описания механизма ультрафильтрации. Разные модели учитывают различные аспекты функционирования фильтра. Общепринятой модели нет, так как все они имеют ограничения, но в той или иной степени позволяют предсказывать изменения гломерулярной проницаемости для белков при различных физиологических воздействиях и патологиях.

Модель пор предполагает, что гломерулярный барьер построен как пассивный фильтр, содержащий цилиндрические поры определенного диаметра [98]. Математическое описание пор корректировалось по мере появления новых экспериментальных данных. В классической двухпоровой модели предполагаются мелкие и крупные поры фиксированного размера. Разработана модель с мелкими порами, радиус которых имеет логнормальное распределение, и шунтом, т.е. порами бесконечного размера. Наибольшее распространение имеет двухпоровая модель с логнормальным распределением радиуса у многочисленных мелких (4.5–5 нм) и редких крупных пор (7.5–11.5 нм) [99]. Модель гетеропор не включает заряд в качестве отдельного параметра, он учитывается через эффективные размеры пор и фильтрующихся молекул (например, нативный альбумин имеет больший радиус, чем нейтральный альбумин). Модель является полезной и точно описывающей эмпирические данные о фильтрации различных тестовых молекул (альбумин, декс-

траны, фикол), но не дает объяснения механике ультрафильтрации (четко определенные поры в гломерулярном фильтре никто не визуализировал) и противодействия накоплению макромолекул внутри гломерулярного барьера.

Модификацией модели пор является **модель гель-мембрана**, описывающая гломерулярный фильтр как два последовательных барьера: 1) отрицательно заряженный гель, который действует как колонка для ионообменной хроматографии, и 2) гетеропоровая мембрана, обеспечивающая селективность по размеру. Модель предполагает, что в заряженном геле не происходит дискриминации по размеру молекул, а в пористой мембране — нет дискриминации по заряду [100].

Модель гель-проницаемости предполагает, что ГБМ по структуре похожа на гель и почти исключительно определяет проницаемость гломерулярного фильтрационного барьера [101]. Согласно этой модели, диффузия является преобладающим фактором проницаемости альбумина, и она относительно постоянна (не зависит от скорости клубочковой фильтрации). Протеинурия возникает, когда скорость фильтрации воды снижается, в то время как диффузионный поток альбумина в первичный фильтрат остается постоянным. Модель гель-проницаемости не дает объяснения механизму очистки фильтра, а также не объясняет причин возникновения протеинурии при подоцитопатиях или эндотелиальных изменениях.

В рамках **гелевой модели** предполагается, что ГБМ с ее многочисленными фиксированными отрицательными зарядами притягивает значительное количество противоионов, а те в свою очередь воду (электроосмос) [102]. Вследствие этого ГБМ наполняется ионной жидкостью под относительно высоким давлением. Электростатические взаимодействия заставляют макромолекулы ГБМ набухать и перестраиваться в высокоупорядоченную структуру, подобную макромолекулярному кристаллу, с образованием регулярных пор размером около 4 нм. Если заряженные макромолекулы попадают в эту кристаллоподобную структуру, то они выталкивают подвижные противоионы и локально нарушают электронейтральность. Из-за этого фиксированные заряды ГБМ сильнее отталкиваются друг от друга в этом месте, вызывают расхождение волокон и позволяют макромолекулам пройти сквозь фильтр, а не накапливаться внутри [102]. Механизм очистки фильтра за счет проскакивания попавших белков через плотную макромолекулярную сеть ГБМ (порядка 40–60 слоев переплетенных молекул коллагена при толщине мембраны 200–300 нм) не выглядит очень убедительным. Электронно-микроскопические исследования ГБМ у разных видов животных не выявили высокоупорядоченной структуры волокон, предсказываемой гелевой гипотезой [44].

Гель-компрессионная гипотеза. Недавние экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сжатие компонентов стенки клубочковых капилляров интактными подоцитами может влиять на размер промежутков в геле ГБМ и, следовательно, на пороговый размер фильтрующихся молекул [103, 104]. В здоровых клубочках сжатие геля может помочь поддерживать примерно постоянный поток фильтрации при изменении фильтрационного давления. Эта гипотеза объясняет механизм протеинурии при подоцитопатиях. Потеря или сглаживание ножек подоцитов позволит ГБМ, которая в этой модели представляется как упругий гель с порами, расширяться по окружности и увеличивать свои поры, что вызовет утечку альбумина в мочу [105].

Электрокинетическая модель предполагает, что в процессе фильтрации в клубочковом барьере генерируется локальное электрическое поле (потенциал потока) [106]. Это происходит вследствие тангенциального движения жидкости, содержащей мелкие ионы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- и HCO_3^-), вдоль заряженной поверхности фильтра. Поточковый потенциал полярен и влияет на прохождение через гломерулярный фильтр макромолекул, несущих фиксированный электрический заряд. Катионные макромолекулы подвергаются электрофорезу в направлении первичной мочи; анионные макромолекулы (подавляющее большинство белков плазмы) будут отталкиваться от фильтра, а попавшие в него подвергаться электрофорезу обратно в кровь. Накопление в ГБМ относительно небольшой фракции нейтральных частиц может предотвращаться путем их эндоцитоза подоцитами и/или эндотелиальными клетками. Данная модель работы гломерулярного фильтрационного барьера также позволяет объяснить противоречия экспериментальных данных о заряд-селективных свойствах ГБМ, полученных *in vivo* и *in vitro*. При отсутствии условий для генерации потенциала потока не обеспечивается селективность ГБМ в отношении заряженных частиц [106].

Эффективная работа гломерулярного барьера наблюдается, если по всей фильтрующей поверхности устанавливается однородное электрическое поле, и может происходить обратное электрофоретическое движение белков плазмы из структур фильтра. Эпителий капсулы нефрона является потенциальным препятствием для фильтрации и однородной генерации потенциала потока. Покрывание клубочковых капилляров исключительно ножками подоцитов позволяет фильтрации происходить однородно по всей поверхности и способствует установлению гомогенной разности потенциалов. Таким образом, в рамках электрокинетической модели подчеркивается важность уникальной структуры подоцитов. Механизм протеинурии при подоцитопатиях объясняется тем, что тела подоцитов при патологии значительно расширя-

ются и лежат плоско на ГБМ, локально блокируя фильтрацию и нарушая генерацию потенциала потока. В результате коэффициент фильтрации альбумина поднимется до уровня, аналогичного уровню нейтрализованного альбумина (т.е. примерно 0.6% против 0.03%) [106].

DANIO RERIO КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ГЛОМЕРУЛЯРНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

В последние десятилетия наиболее популярными модельными организмами в исследованиях почек были грызуны. Несмотря на свои многочисленные преимущества, у мышей и крыс отсутствует легкий доступ к клубочкам. Благодаря высокой консервативности строения и функционирования гломерулярного фильтрационного барьера как на клеточном, так и молекулярном уровне, в настоящее время одной из самых часто используемых моделей для изучения развития [107, 108], физиологии [109], патофизиологии гломерул [110], моделирования заболеваний человека [111, 112], тестирования эффектов генетических манипуляций [113, 114], разработки тест-систем для проверки нефротоксических соединений [115] и прочего стала рыбка *Danio rerio*. Личинка рыбки *Danio rerio* является идеальной моделью для исследования почек из-за огромного количества потомков, быстрого развития простой почки (пронефроса) и поразительной гомологии с клубочками млекопитающих [114, 116–118]. Пронефрос рыбки *Danio rerio* состоит из одного клубочка, соединенного с парой канальцев. Фильтрация в пронефросе начинается уже через 2 дня после оплодотворения, фильтрационный барьер с хорошо сформированной ГБМ наблюдается к 72 ч после оплодотворения, к 96 ч быстро увеличивается количество клеток в клубочке, и морфогенез клубочка пронефроса завершается через 120 ч после оплодотворения [107, 108].

Как и у млекопитающих, у рыбок *Danio rerio* он состоит из фенестрированных эндотелиальных клеток, ГБМ и подоцитов [118, 119]. На пронефросе полупрозрачных личинок рыбок *Danio rerio*, экспрессирующих усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP) в подоцитах, продемонстрировано, что в интактном клубочке подоциты представляют собой стационарные клетки, которые не мигрируют и не изменяют структуру ветвления своих основных отростков в течение длительного периода времени [109]. Показано, что у рыбок *Danio rerio* есть истинные гомологи нефрина и подоцина: их экспрессия высокоспецифична для подоцитов и необходима для функционирования пронефроса [59, 113]. В отличие от клубочков мезонефроса взрослых рыб в клубочках пронефроса рыбок *Danio rerio* ГБМ имеет относительно стабильную ширину око-

ло 100–250 нм без расширенного субэндотелиального слоя с перикапиллярными мезангиальными клетками [111, 112], что более сопоставимо с ГБМ млекопитающих.

Благодаря наличию прозрачных линий, экспрессирующих флуоресцентные белки, личинки рыбок *Danio rerio* являются мощным инструментом для прижизненного микроскопического анализа функционирования гломерулярного фильтрационного барьера, например, с помощью длительной двухфотонной микроскопии. В настоящее время используется два основных метода оценки протеинурии у рыбок *Danio rerio* методом флуоресцентной микроскопии: 1) по интенсивности внутрисосудистой флуоресценции инъецированных декстранов, 2) по измерению канальцевого эндоцитоза флуоресцентно меченых декстранов [116]. Недавно была создана и все шире используется трансгенная флуоресцентная линия рыбок *Danio rerio* [Tg(l-fabp:DBP:eGFP)], экспрессирующая витамин D-связывающий белок, сшитый с зеленым флуоресцентным белком [114]. eGFP-DBP (78 кДа), белок семейства альбуминов, синтезируется в печени и секретируется в плазму крови. В физиологических условиях eGFP-DBP за счет своего размера удерживается гломерулярным фильтром в сосудистой сети. При нарушениях фильтрационного барьера описаны наблюдаемое с помощью прижизненной двухфотонной флуоресцентной микроскопии снижение внутрисосудистого eGFP-DBP и усиление мегалин-опосредованного эндоцитоза eGFP-DBP клетками проксимальных канальцев [117]. Также на этой линии рыбок *Danio rerio* предложен косвенный метод оценки дисфункции подоцитов по измерению флуоресценции в сосудистом сплетении сетчатки (“eye assay”) [120].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ряду позвоночных наблюдается тенденция к резкому росту скорости клубочковой фильтрации у наземных позвоночных, особенно птиц и млекопитающих. Приспособлением к усилению фильтрации и обеспечению беспрепятственного прохождения значительного объема воды и растворенных низкомолекулярных веществ являются утончение клубочкового фильтра (прежде всего за счет утончения ГБМ), центральное расположение мезангия и полное исключение клеточных элементов из ГБМ, увеличение числа и упорядоченности фенестр в эндотелии гломерулярных капилляров. При этом структура подоцитов и их специализированных межклеточных контактов практически не претерпела никаких изменений в ходе эволюции позвоночных животных. Это позволяет эффективно изучать механизмы работы подоцитов и моделировать различные патологии почек человека на низших позвоночных (например, рыбка *Danio rerio*). Принципиально, что на всех этапах становления клубоч-

кового фильтрационного барьера он должен не только обеспечивать фильтрацию жидкой части крови в мочеовое пространство, но и задерживать форменные элементы крови и белки. С последней задачей клубочковый фильтр достаточно эффективно справляется даже у низших позвоночных. Примечательно, что в отличие от всех других базальных мембран эпителиев только ГБМ содержит структуры с выраженным анионным зарядом. Отрицательный заряд ГБМ характерен для представителей всех изученных классов позвоночных и представляется принципиально важным для функционирования клубочка. Данные проведенного сравнительно-физиологического анализа гломерулярного барьера у разных групп позвоночных в наибольшей степени свидетельствуют о справедливости электрокинетической модели работы фильтра, так как именно она объясняет важность эволюционно консервативной структуры подоцитов и роль совокупности фиксированных отрицательных зарядов в стенке гломерулярного фильтра для предотвращения потери макромолекул (прежде всего белков) из крови при различной интенсивности ультрафильтрации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00640).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.В.К.), сбор данных (А.В.К., Е.В.Б.), написание и редактирование манускрипта (А.В.К., Е.В.Б.), подготовка иллюстраций (А.В.К., Е.В.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Natochin YV* (2019) Principles of evolution of the excretory organs and the system of homeostasis. *J Evol Biochem Phys* 55 (5): 398–410. <https://doi.org/10.1134/S0022093019050077>
2. *Наточин ЮВ* (2019) Почка: орган выделения или сохранения? Усп физиол наук 50 (4): 14–25. [*Natochin YV* (2019) Kidney: excretion or preservation organ? *Usp Fiziol Nauk* 50 (4): 14–25. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0301179819040064>

3. Yokota SD, Benyajati S, Dantzler WH (1985) Comparative aspects of glomerular filtration in vertebrates. *Ren Physiol* 8 (4–5): 193–221.
<https://doi.org/10.1159/000173055>
4. Kutina AV, Marina AS, Natochin YV (2016) Effects of exenatide on glycemia and renal water and ion excretion differ in frogs and rats. *J Evol Biochem Phys* 52 (3): 228–237.
<https://doi.org/10.1134/S0022093016030054>
5. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88 (2): 451–487.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2006>
6. Jarad G, Miner JH (2009) Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18 (3): 226–232.
<https://doi.org/10.1097/mnh.0b013e3283296044>
7. Riegel JA (1998) Analysis of fluid dynamics in perfused glomeruli of the hagfish *eptatretus stouti* (Lockington). *J Exp Biol* 201 (Pt 22): 3097–3104.
<https://doi.org/10.1242/jeb.201.22.3097>
8. Винниченко ЛН (1980) Сравнительная ультраструктура нефрона. Л. Наука. [Vinnichenko LN (1980) [Comparative ultrastructure of the nephron. L. Nauka. (In Russ)].
9. Arif E, Nihalani D (2013) Glomerular filtration barrier assembly: an insight. *Postdoc J* 1 (4): 33–45.
10. Gambaryan SP (1994) Microdissectional investigation of the nephrons in some fishes, amphibians, and reptiles inhabiting different environment. *J Morphol* 219 (3): 319–339.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1052190311>
11. Orosz SE, Echols MS (2020) The urinary and osmoregulatory systems of birds. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 23 (1): 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2019.09.001>
12. Kuhn K, Stolte H, Reale E (1975) The fine structure of the kidney of the hagfish (*Myxine glutinosa* L.): A thin section and freeze-fracture study. *Cell Tissue Res* 164 (2): 201–213.
<https://doi.org/10.1007/BF00218974>
13. Tsuji K, Suleiman H, Miner JH, Daley JM, Capen DE, Paunescu TG, Lu HAJ (2017) Ultrastructural characterization of the glomerulopathy in alport mice by helium ion scanning microscopy (HIM). *Sci Rep* 7 (1): 11696.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12064-5>
14. Ballermann BJ, Nystrom J, Haraldsson B (2021) The glomerular endothelium restricts albumin filtration. *Front Med (Lausanne)* 8: 766689.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.766689>
15. Schaffner A, Rodewald R (1978) Glomerular permeability in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Cell Biol* 79 (2 Pt 1): 314–328.
<https://doi.org/10.1083/jcb.79.2.314>
16. Mobjerg N, Jespersen A, Wilkinson M (2004) Morphology of the kidney in the West African caecilian, *Geotrypetes seraphini* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae). *J Morphol* 262 (2): 583–607.
<https://doi.org/10.1002/jmor.10244>
17. Tanner GA, Rippe C, Shao Y, Evan AP, Williams JC Jr (2009) Glomerular permeability to macromolecules in the *Necturus* kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 296 (6): F1269–F1278.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00371.2007>
18. Gerth VE, Zhou X, Vize PD (2005) Nephtrin expression and three-dimensional morphogenesis of the *Xenopus* pronephric glomus. *Dev Dyn* 233 (3): 1131–1139.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20415>
19. Mobjerg N, Larsen EH, Jespersen A (2000) Morphology of the kidney in larvae of *Bufo viridis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J Morphol* 245 (3): 177–195.
[https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200009\)245:3<177::AID-JMOR1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200009)245:3<177::AID-JMOR1>3.0.CO;2-F)
20. Xu CS, Yang P, Bao HJ, Bian XG, Chen QS (2013) Ultrastructure of the nephron in the soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis* (Reptilia, Chelonia, Trionychidae). *Micron* 44: 451–462.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.10.00>
21. Tsujii T, Inoue S, Takamiya H, Liszczynsky HR, Naora H, Seno S (1992) Morphology of the kidney of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*: Monotremata). *Anat Rec* 234 (3): 348–358.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092340306>
22. Satchell S (2013) The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol* 9 (12): 717–725.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.197>
23. Takahashi-Iwanaga H (2015) Three-dimensional micro-anatomy of the pericapillary mesangial tissues in the renal glomerulus: Comparative observations in four vertebrate classes. *Biomed Res* 36 (5): 331–341.
<https://doi.org/10.2220/biomedres.36.331>
24. Squire JM, Chew M, Nneji G, Neal C, Barry J, Michel C (2001) Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *J Struct Biol* 136 (3): 239–255.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4441>
25. Jeansson M, Haraldsson B (2006) Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 290 (1): F111–F116.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00173.2005>
26. Hegermann J, Lunsdorf H, Ochs M, Haller H (2016) Visualization of the glomerular endothelial glycocalyx by electron microscopy using cationic colloidal thorium dioxide. *Histochem Cell Biol* 145 (1): 41–51.
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1378-3>
27. Fan J, Sun Y, Xia Y, Tarbell JM, Fu BM (2019) Endothelial surface glycocalyx (ESG) components and ultrastructure revealed by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Biorheology* 56 (2–3): 77–88.
<https://doi.org/10.3233/BIR-180204>
28. Muller-Deile J, Gellrich F, Schenk H, Schroder P, Nystrom J, Lorenzen J, Haller H, Schiffer M (2016) Overexpression of TGF- β inducible microRNA-143 in zebrafish leads to impairment of the glomerular filtration barrier by targeting proteoglycans. *Cell Physiol Biochem* 40 (5): 819–830.
<https://doi.org/10.1159/000453142>

29. Bjornson A, Moses J, Ingemansson A, Haraldsson B, Sorensson J (2005) Primary human glomerular endothelial cells produce proteoglycans, and puromycin affects their posttranslational modification. *Am J Physiol Renal Physiol* 288 (4): F748–F756.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00202.2004>
30. Melrose J (2020) Perlecan, a modular instructive proteoglycan with diverse functional properties. *Int J Biochem Cell Biol* 128: 105849.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105849>
31. Jarial MS, Gattone VH, Wilkins JH (2014) Ultrastructural study of the kidney in the coelacanth *Latimeria chalumnae* (Rhipidistia: Coelacanthini). *Zoolog Sci* 31 (5): 283–291.
<https://doi.org/10.2108/zs130192>
32. de Ruiter AJ (1980) Changes in glomerular structure after sexual maturation and seawater adaptation in males of the euryhaline teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *Cell Tissue Res* 206 (1): 1–20.
<https://doi.org/10.1007/BF00233603>
33. Brown JA, Taylor SM, Gray CJ (1983) Glomerular ultrastructure of the trout, *Salmo gairdneri*. Glomerular capillary epithelium and the effects of environmental salinity. *Cell Tissue Res* 230 (1): 205–218.
<https://doi.org/10.1007/BF00216040>
34. Ojeda JL, Wong WP, Ip YK, Icardo JM (2008) Renal corpuscle of the african lungfish *Protopterus dolloi*: structural and histochemical modifications during aestivation. *Anat Rec (Hoboken)* 291 (9): 1156–1172.
<https://doi.org/10.1002/ar.20729>
35. Reale E, Luciano L, Kühn K, Stolte H, Brod J (1981) Glomerular basement membrane and mesangial matrix: a comparative study in different vertebrates. *Ren Physiol* 4 (2–3): 85–89.
<https://doi.org/10.1159/000172810>
36. Decker B, Reale E (1991) The glomerular filtration barrier of the kidney in seven vertebrates classes. Comparative morphological and histochemical observations. *Eur J Basic Appl Histochem* 35 (1): 15–36.
37. Pak Poy RK, Robertson JS (1957) Electron microscopy of the avian renal glomerulus. *J Biophys Biochem Cytol* 3 (2): 183–192.
<https://doi.org/10.1083/jcb.3.2.183>
38. Lacy ER, Castellucci M, Reale E (1987) The elasmobranch renal corpuscle: fine structure of Bowman's capsule and the glomerular capillary wall. *Anat Rec* 218 (3): 294–305.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092180311>
39. Boyd RB, DeVries AL (1983) The seasonal distribution of anionic binding sites in the basement membrane of the kidney glomerulus of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Cell Tissue Res* 234 (2): 271–277.
<https://doi.org/10.1007/BF00213768>
40. Ojeda JL, Icardo JM, Wong WP, Ip YK (2006) Microanatomy and ultrastructure of the kidney of the African lungfish *Protopterus dolloi*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288 (6): 609–625.
<https://doi.org/10.1002/ar.a.20333>
41. Seliverstova EV, Prutskova NP (2017) Tubular protein uptake pattern in the frog model (*Rana temporaria*): The effect of previous protein loading. *J Evol Biochem Physiol* 53 (3): 215–224.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017030061>
42. Флерова ЕА, Чуйко ГМ (2021) Сравнительная характеристика ультраструктуры клеток нефрона некоторых видов пелагических, придонных и донных рыб (бухта Карантинная, Черное море). *Морск биол журн* 6 (2)6: 95–109. [Flerova EA, Chuyko GM (2021) Comparative characteristics of the ultrastructure of nephron cells in some species of pelagic, epibenthic, and demersal fish (the Karantinnaya bay, the Black Sea). *Morsk biol zhurn* 6 (2)6: 95–109. (In Russ)].
<https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.2.07>
43. Elger M, Hentschel H (1981) The glomerulus of a stenohaline fresh-water teleost, *Carassius auratus gibelio*, adapted to saline water. A scanning and transmission electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 220 (1): 73–85.
<https://doi.org/10.1007/BF00209967>
44. Naylor RW, Morais MRPT, Lennon R (2021) Complexities of the glomerular basement membrane. *Nat Rev Nephrol* 17 (2): 112–127.
<https://doi.org/10.1038/s41581-020-0329-y>
45. Suh JH, Miner JH (2013) The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol* 9 (8): 470–477.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.109>
46. Marshall CB (2016) Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic? *Am J Physiol Renal Physiol* 311 (5): F831–F843.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00313.2016>
47. Suleiman H, Zhang L, Roth R, Heuser JE, Miner JH, Shaw AS, Dani A (2013) Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *eLife* 2: e01149.
<https://doi.org/10.7554/eLife.01149>
48. Abrahamson DR (2012) Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the GBM. *Semin Nephrol* 32 (4): 342–349.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.06.005>
49. Bersie-Larson LM, Gyoneva L, Goodman DJ, Dorfman KD, Segal Y, Barocas VH (2020) Glomerular filtration and podocyte tensional homeostasis: importance of the minor type IV collagen network. *Biomech Model Mechanobiol* 19 (6): 2433–2442.
<https://doi.org/10.1007/s10237-020-01347-y>
50. Harvey SJ, Miner JH (2008) Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17 (4): 393–398.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32830464de>
51. Takahashi-Iwanaga H (2002) Comparative anatomy of the podocyte: A scanning electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 57 (4): 196–202.
<https://doi.org/10.1002/jemt.10073>
52. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura K, Ohta K, Sakai T (2015) Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-

- face scanning electron microscopy. *Sci Rep* 5: 8993. <https://doi.org/10.1038/srep08993>
53. Burghardt T, Hochapfel F, Salecker B, Meese C, Gröne HJ, Rachel R, Wanner G, Krahn MP, Witzgall R (2015) Advanced electron microscopic techniques provide a deeper insight into the peculiar features of podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 309 (12): F1082–F1089. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00338.2015>
 54. Garg P (2018) A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol* 47 (Suppl 1): 3–13. <https://doi.org/10.1159/000481633>
 55. Qu C, Roth R, Puapatanakul P, Loitman C, Hammad D, Genin GM, Miner JH, Suleiman HY (2022) Three-dimensional visualization of the podocyte actin network using integrated membrane extraction, electron microscopy, and machine learning. *J Am Soc Nephrol* 33 (1): 155–173. <https://doi.org/10.1681/ASN.2021020182>
 56. Bjornson Granqvist A, Ebefors K, Saleem MA, Mathieson PW, Haraldsson B, Nystrom JS (2006) Podocyte proteoglycan synthesis is involved in the development of nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 291 (4): F722–F730. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00433.2005>
 57. Salmon AH, Neal CR, Harper SJ (2009) New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: five layers (at least) not three. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18 (3): 197–205. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328329f837>
 58. Janes DN, Braun EJ (1997) Urinary protein excretion in red jungle fowl (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol* 118: 1273–1275.
 59. Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, Drummond IA (2005) Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephhrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol* 285 (2): 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.038>
 60. Miner JH (2012) Life without nephrin: it's for the birds. *J Am Soc Nephrol* 23 (3): 369–371. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012010016>
 61. Yaoita E, Nishimura H, Nameta M, Yoshida Y, Takimoto H, Fujinaka H, Kawachi H, Magdeldin S, Zhang Y, Xu B, Oyama T, Nakamura F, Yamamoto T (2016) Avian podocytes, which lack nephrin, use adherens junction proteins at intercellular junctions. *J Histochem Cytochem* 64 (1): 67–76. <https://doi.org/10.1369/0022155415611708>
 62. Lovell PV, Wirthlin M, Wilhelm L, Minx P, Lazar NH, Carbone L, Warren WC, Mello CV (2014) Conserved syntenic clusters of protein coding genes are missing in birds. *Genome Biol* 15 (12): 565. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0565-1>
 63. Becherucci F, Mazzinghi B, Provenzano A, Murer L, Giglio S, Romagnani P (2016) Lessons from genetics: is it time to revise the therapeutic approach to children with steroid-resistant nephrotic syndrome? *J Nephrol* 29 (4): 543–550. <https://doi.org/10.1007/s40620-016-0315-4>
 64. Wunderlich LCS, Strohl F, Strohl S, Vanderpoorten O, Mascheroni L, Kaminski CF (2021) Superresolving the kidney – a practical comparison of fluorescence nanoscopy of the glomerular filtration barrier. *Anal Bioanal Chem* 413 (4): 1203–1214. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03084-8>
 65. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, Gubler MC, Antignac C (2002) Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 160 (1): 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64357-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64357-X)
 66. Haraldsson B, Sorensson J (2004) Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. *News Physiol Sci* 19: 7–10. <https://doi.org/10.1152/nips.01461.2003>
 67. Tsujii T, Naito I, Ukita S, Ono T, Seno S (1984) The anionic barrier system in the mesonephric renal glomerulus of the arctic lamprey, *Entosphenus japonicus* (Martens) (Cyclostomata). *Cell Tissue Res* 235 (3): 491–496. <https://doi.org/10.1007/BF00226944>
 68. Tsujii T, Naito I, Ukita S, Ono T, Seno S (1984) The anionic barrier system on the mesonephric renal glomerulus of the brown hagfish, *Paramyxine atami* Dean (Cyclostomi). *Anat Rec* 208 (3): 337–347. <https://doi.org/10.1002/ar.1092080304>
 69. Ellis LC, Youson JH (1991) The anionic charge barrier in the renal corpuscle of the pronephros in the lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Anat Rec* 231 (2): 178–184. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310205>
 70. Khalil R, Lalai RA, Wiweger MI, Avramut CM, Koster AJ, Spaink HP, Bruijn JA, Hogendoorn PCW, Baelde HJ (2019) Glomerular permeability is not affected by heparan sulfate glycosaminoglycan deficiency in zebrafish embryos. *Am J Physiol Renal Physiol* 317 (5): F1211–F1216. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00126.2019>
 71. More NK (1977) Mucopolysaccharide heterogeneity of the reptilian kidney basement membranes. *Acta Histochem* 60 (2): 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(77\)80002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(77)80002-0)
 72. van den Hoven MJ, Wijnhoven TJ, Li JP, Zcharia E, Dijkman HB, Wismans RG, Rops AL, Lensen JF, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH, Vlodavsky I, Berden JH, van der Vlag J (2008) Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 73 (3): 278–287. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002706>
 73. Friden V, Oveland E, Tenstad O, Ebefors K, Nystrom J, Nilsson UA, Haraldsson B (2011) The glomerular endothelial cell coat is essential for glomerular filtration. *Kidney Int* 79 (12): 1322–1330. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.58>
 74. van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Berden JH (1992) A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. *Kidney Int* 41 (1): 115–123. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.15>
 75. Gil N, Goldberg R, Neuman T, Garsen M, Zcharia E, Rubinstein AM, van Kuppevelt T, Meirovitz A, Pisano C, Li JP, van der Vlag J, Vlodavsky I, Elkin M (2012) Heparan

- ranase is essential for the development of diabetic nephropathy in mice. *Diabetes* 61 (1): 208–216.
https://doi.org/10.2337/db11-1024
76. Schenk H, Masseli A, Schroder P, Bolanos-Palmieri P, Beese M, Hegermann J, Brasen JH, Haller H (2019) Sulfatases, in particular Sulf1, are important for the integrity of the glomerular filtration barrier in zebrafish. *Biomed Res Int* 2019: 4508048.
https://doi.org/10.1155/2019/4508048
 77. Betteridge KB, Arkill KP, Neal CR, Harper SJ, Foster RR, Satchell SC, Bates DO, Salmon AHJ (2017) Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. *J Physiol* 595 (15): 5015–5035.
https://doi.org/10.1113/JP274167
 78. Song K, Fu J, Song J, Herzog BH, Bergstrom K, Kondo Y, McDaniel JM, McGee S, Silasi-Mansat R, Lupu F, Chen H, Bagavant H, Xia L (2017) Loss of mucin-type O-glycans impairs the integrity of the glomerular filtration barrier in the mouse kidney. *J Biol Chem* 292 (40): 16491–16497.
https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798512
 79. Weinhold B, Sellmeier M, Schaper W, Blume L, Philippens B, Kats E, Bernard U, Galuska SP, Geyer H, Geyer R, Worthmann K, Schiffer M, Groos S, Gerardy-Schahn R, Munster-Kuhnel AK (2012) Deficits in sialylation impair podocyte maturation. *J Am Soc Nephrol* 23 (8): 1319–1328.
https://doi.org/10.1681/ASN.2011090947
 80. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H (2006) Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 55 (4): 1127–1132.
https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1619
 81. Vehaskari VM, Root ER, Germuth FG Jr, Robson AM (1982) Glomerular charge and urinary protein excretion: effects of systemic and intrarenal polycation infusion in the rat. *Kidney Int* 22 (2): 127–135.
https://doi.org/10.1038/ki.1982.144
 82. Kutina AV, Zakharov VV, Shahmatova EI, Natochin YV (2010) L-NAME-induced heavy proteinuria in healthy rats. *Dokl Biol Sci* 430 (1): 26–28.
https://doi.org/10.1134/s0012496610010096
 83. Kutina AV, Shakhmatova EI, Natochin YV (2011) Effect of a blocker of nitric oxide production on albumin excretion by rat kidney. *Bull Exp Biol Med* 150 (6): 693–695.
https://doi.org/10.1007/s10517-011-1225-z
 84. Bolton GR, Deen WM, Daniels BS (1998) Assessment of the charge selectivity of glomerular basement membrane using Ficoll sulfate. *Am J Physiol* 274(5): F889–F896.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.274.5.F889
 85. Salmon AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, Bates DO, Peti-Peterdi J (2012) Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 23 (8): 1339–1350.
https://doi.org/10.1681/ASN.2012010017
 86. Kuwabara A, Satoh M, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N (2010) Deterioration of glomerular endothelial surface layer induced by oxidative stress is implicated in altered permeability of macromolecules in Zucker fatty rats. *Diabetologia* 53 (9): 2056–2065.
https://doi.org/10.1007/s00125-010-1810-0
 87. Jeansson M, Granqvist AB, Nystrom JS, Haraldsson B (2006) Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice. *Diabetologia* 49 (9): 2200–2209.
https://doi.org/10.1007/s00125-006-0319-z
 88. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B (2009) Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 20 (1): 114–122.
https://doi.org/10.1681/ASN.2007111205
 89. van den Berg BM, Wang G, Boels MGS, Avramut MC, Jansen E, Sol WMPJ, Lebrin F, van Zonneveld AJ, de Koning EJP, Vink H, Grone HJ, Carmeliet P, van der Vlag J, Rabelink TJ (2019) Glomerular Function and Structural Integrity Depend on Hyaluronan Synthesis by Glomerular Endothelium. *J Am Soc Nephrol* 30 (10): 1886–1897.
https://doi.org/10.1681/ASN.2019020192
 90. Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, Shimizu K, Kisu K, Suzuki S, Takagi K, Mizumoto S, Yamada S, van Kuppevelt TH, Yokoyama A, Matsusaka T, Sato H, Ito S, Sugawara A (2018) The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion. *Nephrol Dial Transplant* 33 (1): 26–33.
https://doi.org/10.1093/ndt/gfx218
 91. Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K, Miner JH (2009) Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant* 24 (7): 2044–2051.
https://doi.org/10.1093/ndt/gfn758
 92. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Rops AL, van der Vlag J, Berden JH, Moeller MJ, Holzman LB, Burgess RW, Miner JH (2007) Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am J Pathol* 171 (1): 139–152.
https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061116
 93. Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Wijnhoven TJ, Woods AC, McCarthy KJ (2008) Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 74 (3): 289–299.
https://doi.org/10.1038/ki.2008.159
 94. Sugar T, Wassenhove-McCarthy DJ, Esko JD, van Kuppevelt TH, Holzman L, McCarthy KJ (2014) Podocyte-specific deletion of NDST1, a key enzyme in the sulfation of heparan sulfate glycosaminoglycans, leads to abnormalities in podocyte organization *in vivo*. *Kidney Int* 85 (2): 307–318.
https://doi.org/10.1038/ki.2013.281
 95. Rossi M, Morita H, Sormunen R, Airene S, Kreivi M, Wang L, Fukai N, Olsen BR, Tryggvason K, Soininen R (2003) Heparan sulfate chains of perlecan are indispensable in the lens capsule but not in the kidney. *EMBO J* 22 (2): 236–245.
https://doi.org/10.1093/emboj/cdg019
 96. van Det NF, van den Born J, Tamsma JT, Verhagen NA, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude FJ (1996) Effects of high glucose on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial and epithelial cells. *Kidney Int* 49 (4): 1079–1089.
https://doi.org/10.1038/ki.1996.157

97. Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW (2007) Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* 18 (11): 2885–2893.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2007010119>
98. Moeller MJ, Tenten V (2013) Renal albumin filtration: alternative models to the standard physical barriers. *Nat Rev Nephrol* 9 (5): 266–277.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.58>
99. Oberg CM, Groszek JJ, Roy S, Fissell WH, Rippe B (2018) A distributed solute model: an extended two-pore model with application to the glomerular sieving of Ficoll. *Am J Physiol Renal Physiol* 314(6): F1108–F1116.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00066.2017>
100. Ohlson M, Sorensson J, Haraldsson B (2001) A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (3): F396–F405.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.3.F396>
101. Smithies O (2003) Why the kidney glomerulus does not clog: a gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (7): 4108–4113.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0730776100>
102. Wolgast M, Persson AE (2011) The gel hypothesis applied to the rat renal capillary membranes: a review. *Acta Physiol (Oxf)* 202 (4): 617–628.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02277.x>
103. Fissell WH, Miner JH (2018) What Is the Glomerular Ultrafiltration Barrier? *J Am Soc Nephrol* 29 (9): 2262–2264.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2018050490>
104. Xu Z, Yue P, Feng JJ (2023) Poroelastic modelling reveals the cooperation between two mechanisms for albuminuria. *J R Soc Interface* 20 (198): 20220634.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2022.0634>
105. Butt L, Unnersjö-Jess D, Hohne M, Edwards A, Binz-Lotter J, Reilly D, Hahnfeldt R, Ziegler V, Fremter K, Rinschen MM, Helmstadter M, Ebert LK, Castrop H, Hackl MJ, Walz G, Brinkkoetter PT, Liebau MC, Töry K, Hoyer PF, Beck BB, Brismar H, Blom H, Schermer B, Benzinger T (2020) A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab* 2 (5): 461–474.
<https://doi.org/10.1038/s42255-020-0204-y>
106. Hausmann R, Grepl M, Knecht V, Moeller MJ (2012) The glomerular filtration barrier function: new concepts. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21 (4): 441–449.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328354a28e>
107. Drummond IA, Davidson AJ (2010) Zebrafish kidney development. *Methods Cell Biol* 100: 233–260.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384892-5.00009-8>
108. Zhu X, Chen Z, Zeng C, Wang L, Xu F, Hou Q, Liu Z (2016) Ultrastructural characterization of the pronephric glomerulus development in zebrafish. *J Morphol* 277 (8): 1104–1112.
<https://doi.org/10.1002/jmor.20560>
109. Endlich N, Simon O, Gopferich A, Wegner H, Moeller MJ, Rumpel E, Kotb AM, Endlich K (2014) Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae. *J Am Soc Nephrol* 25 (4): 681–686.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2013020178>
110. Kourpa A, Schulz A, Mangelsen E, Kaiser-Graf D, Koppers N, Stoll M, Rothe M, Bader M, Purfürst B, Kunz S, Gladysz T, Niendorf T, Bachmann S, Mutig K, Bolbrinker J, Panakova D, Kreutz R (2023) Studies in zebrafish and rat models support dual blockade of EP2 and EP4 (prostaglandin E₂ receptors type 2 and 4) for renoprotection in glomerular hyperfiltration and albuminuria. *Hypertension* 80 (4): 771–782.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONA-HA.122.20392>
111. Wiggenhauser LM, Metzger L, Bennewitz K, Soleymani S, Boger M, Tabler CT, Hausser I, Sticht C, Wohlfart P, Volk N, Heidenreich E, Buettner M, Hammes HP, Kroll J (2022) Pdx1 knockout leads to a diabetic nephropathy-like phenotype in zebrafish and identifies phosphatidylethanolamine as metabolite promoting early diabetic kidney damage. *Diabetes* 71 (5): 1073–1080.
<https://doi.org/10.2337/db21-0645>
112. Zeitler EM, Jennette JC, Flythe JE, Falk RJ, Poulton JS (2022) High-calorie diet results in reversible obesity-related glomerulopathy in adult zebrafish regardless of dietary fat. *Am J Physiol Renal Physiol* 322 (5): F527–F539.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00018.2022>
113. Fukuyo Y, Nakamura T, Bubenshchikova E, Powell R, Tsuji T, Janknecht R, Obara T (2014) Nephrin and Podocin functions are highly conserved between the zebrafish pronephros and mammalian metanephros. *Mol Med Rep* 9 (2): 457–465.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1844>
114. Hanke N, King BL, Vaske B, Haller H, Schiffer M (2015) A Fluorescence-based assay for proteinuria screening in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 12 (5): 372–376.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1093>
115. Rider SA, Bruton FA, Collins RG, Conway BR, Mullins JJ (2018) The Efficacy of puromycin and adriamycin for induction of glomerular failure in larval zebrafish validated by an assay of glomerular permeability dynamics. *Zebrafish* 15 (3): 234–242.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1527>
116. Kotb AM, Muller T, Xie J, Anand-Apte B, Endlich K, Endlich N (2014) Simultaneous assessment of glomerular filtration and barrier function in live zebrafish. *Am J Physiol Renal Physiol* 307 (12): F1427–F1434.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00029.2014>
117. Siegerist F, Zhou W, Endlich K, Endlich N (2017) 4D in vivo imaging of glomerular barrier function in a zebrafish podocyte injury model. *Acta Physiol (Oxf)* 220 (1): 167–173.
<https://doi.org/10.1111/apha.12754>
118. Schindler M, Blumenthal A, Moeller MJ, Endlich K, Endlich N (2020) Adriamycin does not damage podocytes of zebrafish larvae. *PLoS One* 15 (11): e0242436.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242436>
119. Kolatsi-Joannou M, Osborn D (2020) A Technique for studying glomerular filtration integrity in the zebrafish pronephros. *Methods Mol Biol* 2067: 25–39.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9841-8_3
120. Sopel N, Muller-Deile J (2023) Zebrafish model to study podocyte function within the glomerular filtration barrier. *Methods Mol Biol* 2664: 145–157.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3179-9_11

STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE GLOMERULAR FILTRATION BARRIER OF VERTEBRATES: ROLE OF CHARGE FOR FILTERING PROTEINS

E. V. Balbotkina^a and A. V. Kutina^{a, #}

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

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

The renal glomerulus is a unique structure that distinguishes the nephrons of vertebrates from the nephridia of invertebrate animals, providing a direct connection between the circulatory and excretory systems and the most effective control of the composition of the internal environment due to the significant intensification of filtration. The modern ideas about the structure of the glomerular filtration barrier in representatives of all major groups of vertebrates (cyclostomes, fishes, amphibians, reptiles and birds, mammals) were reviewed. Emphasis is placed on the role of the charge of the glomerular barrier structures for its selective properties; approaches to studying the contribution of the anionic components of the renal filter to preventing the loss of plasma proteins are described. The main models of the glomerular filter functioning presented in the literature are considered. Negative charge has been demonstrated to be a distinctive feature of the glomerular filter in all vertebrates. It was shown that a multiple increase of the glomerular filtration rate (from lower vertebrates to birds and mammals) was accompanied by a number of structural changes that ensured the passage of a significant volume of water and dissolved low-molecular substances through the glomerular filter: an increase in the number and ordering of fenestrae in the endothelium of glomerular capillaries, thinning of the glomerular basement membrane and complete exclusion of cellular elements from it. It has been shown that comparative physiological data on the glomerular filter in different groups of vertebrates most strongly confirm the electrokinetic model of the glomerular filtration, since it explains the importance of the evolutionarily conservative structure of podocytes and the role of a set of fixed anionic charges in the filter wall to prevent the loss of macromolecules (primarily proteins) from blood at different intensities of the ultrafiltration.

Keywords: glomerular filtration barrier, charge-selectivity, glomerular basement membrane, podocyte, glycosaminoglycans, glycocalyx, vertebrates

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ НЕЙРОАТОМИЯ НИСХОДЯЩИХ НЕЙРОНОВ
В НАДГЛОТОЧНЫХ ГАНГЛИЯХ ТАРАКАНОВ
ИЗ СЕМЕЙСТВА BLABERIDAE (BLATTODEA)

© 2023 г. И. Ю. Северина^{1,*}, И. Л. Исавнина¹

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

*e-mail: severinaira@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 08.08.2023 г.

Принята к публикации 07.10.2023 г.

Проведено сравнительное исследование морфологии нисходящих нейронов, связывающих надглоточный ганглий и торакальные ганглии у тараканов, представителей семейства Blaberidae, которые различаются защитным поведением и способностью к полету. Строение нейронов у тараканов этих семейств сравнивали с нисходящими нейронами таракана *Periplaneta americana*. Выявлено сходство в количестве, пространственном распределении, расположении аксонов и дендритов нисходящих нейронов у тараканов *Leucophaea maderae*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae). Обнаружены нейроны, гомологичные оцеллярным, механочувствительным, зрительным нисходящим нейронам, описанным у таракана *Periplaneta americana*. Сделано предположение, что в процессе эволюции отряда таракановых изменение адаптивного поведения при опасности произошло за счет трансформации сенсорных входов и двигательных ответов, при этом система нисходящих нейронов осталась неизменной.

Ключевые слова: насекомые, тараканы, надглоточный ганглий, нисходящие нейроны, поведение

DOI: 10.31857/S0044452923060086, **EDN:** HUTIYO

ВВЕДЕНИЕ

Межвидовое сравнение организации двигательных систем способствует фундаментальному пониманию их функции и происхождения. Сравнение родственных видов позволяет исследовать в эволюционном плане, как нейронные структуры, их функции и поведение в целом изменяются в соответствии с условиями среды обитания. Насекомые в целом, и тараканы в особенности, являются удобной моделью для сравнительного анализа эволюционно приобретенных поведенческих и анатомических особенностей. За миллионы лет своего существования тараканы приспособились ко множеству ниш обитания от субтропических лесов до жилищ человека и встречаются в разных климатических поясах [1].

Поведение насекомых определяется активностью нейронов, относящихся к разным уровням сенсомоторной интеграции. Нейронные цепи, отвечающие за двигательные реакции, находятся в грудных ганглиях [2–4]. Сигналы различных сенсорных модальностей обрабатываются в надглоточном и подглоточном ганглиях и передаются в грудные отделы через популяцию нисходящих нейронов (НН) [5]. Поскольку количество НН относительно небольшое (около 200–300 пар) по сравнению с нейронами головного мозга и грудных

ганглиев, они интегрируют значительный поток сенсорной информации, обработанной в мозге при передаче к моторным сетям в грудных ганглиях [5], т.е. их суммарная активность может в значительной степени контролировать поведение животного. При этом одни и те же НН демонстрируют различную активность и выполняют разные функции при разных поведенческих условиях [6].

Реакция избегания представляется хорошей моделью для понимания поведенческой и нейрональной эволюции, поскольку она важна для выживания вида и обычно осуществляется выделенными нейронными цепями, что дает возможность оценить их вклад в поведение. Чтобы обнаружить хищника и уклониться от него, насекомое должно обладать нервными структурами, которые трансформируют сенсорную информацию о хищнике в соответствующую двигательную реакцию, используя относительно небольшое количество синапсов [7]. Нейронные цепи, обеспечивающие убежание, часто являются самыми крупными, надежными и наиболее стереотипными нервными системами [8].

Различные виды таракановых (отряд Blattodea) сформировали разные стратегии защиты от хищников. У американского таракана это реакция избегания, которая заключается в повороте от источ-

ника опасности и побежке, и вызывается обдуванием церок, прикосновением к антеннам или другим областям тела и конечностей [9, 10]. Некоторые виды тараканов реагируют на прикосновения шипением [11] или стридуляцией [12], некоторые выделяют химические вещества [13]. Таракан *Blaberus craniifer* демонстрирует несколько защитных реакций, в том числе шипение низкой амплитуды, химические выделения и специализированное поведение, такое как прижимание тела к земле или закапывание [14].

В этой работе мы даем морфологическую характеристику НН в надглоточных ганглиях нескольких видов тараканов, принадлежащих семейству Blaberidae, но отличающихся поведением, и сравниваем их с НН американского таракана *Periplaneta americana*, чтобы выяснить существуют ли гомологичные единицы. Для исследования взяты виды, характеризующиеся разным поведением и реакциями уклонения от опасности.

Мадерский таракан *Leucophaea maderae* (*Rhyparobia maderae*) обитает в лесной подстилке на плантациях сахарного тростника, на кокосовых пальмах, бананах, гуаве. Средних размеров (40–50 мм), очень подвижен. По локомоторной активности похож на американского таракана: может летать, способен к быстрой маневренной ходьбе. *L. maderae* часто издает стрекочущий звук, когда до него догаживаются.

Кубинский таракан *Blaberus craniifer* — один из видов южноамериканских тараканов также известный под названием “мертвая голова”. Длина взрослой особи составляет 60–75 мм (у крупных самок иногда до 80 мм). Активные подвижные животные, способные к короткому планирующему полету. Обитают в основном в укрытиях, пещерах, дуплах, питаются опавшими листьями. *B. craniifer* демонстрируют несколько защитных реакций, в том числе шипение низкой амплитуды, химические выделения и специализированное поведение, такое как прижимание тела к земле или закапывание при опасности [14]. Эти насекомые могут зарыться в рыхлый мягкий субстрат всего за несколько секунд, используя быстрое движение ног в сочетании со стереотипным дорсо-вентральным сгибанием головы и переднеспинки. Этот метод рытья не требует изменений тела, характерных для тараканов, специализирующихся на рытье в твердых субстратах, и поэтому совместим со способностью быстро бегать [15].

Мадагаскарский таракан *Gromphadorhina portentosa* — крупный (55–60 мм) тропический таракан. Эндемик Мадагаскара обитает на стволах и ветвях деревьев и кустов, питается травянистыми частями растений и фруктами. Особи этого вида передвигаются медленно, у них отсутствуют крылья. При опасности таракан замирает и вытягивает антенны вдоль тела. В случаях касания тела может

издавать громкое шипение. Звуковые сигналы служат для отпугивания хищников и для внутренних отношений (например, борьба самцов за самку) [11]. Извлечение звука осуществляется посредством резкого сокращения мышц брюшка, благодаря чему воздух с силой проходит через видоизмененные дыхальца [16].

Пепельный таракан *Nauphoeta cinerea* в этой группе самый мелкий (30 мм в длину), у взрослых особей есть крылья, но они не летают, передвигаются быстрыми перебежками. При малейшей опасности стараются спрятаться в ближайшей щели. И самцы, и самки могут издавать стрекотание как сигнал бедствия. *N. cinerea* социальные животные, агонистические реакции между самцами основаны на контактах антеннами и продукции феромонов [17].

В настоящее время нейронные различия, лежащие в основе поведенческого разнообразия, изучены недостаточно. Сравнение гомологичных нейронов у близких видов может обеспечить новое понимание функции нисходящих нейронов и их значение в эволюции поведения. Учитывая модульную структуру нейронных сетей, лежащую в основе конкретного поведения, можно предположить, что эволюционные изменения накапливаются в определенных частях нейронных цепей [18] и возможно проследить, как структуры нейронных сетей ограничивают или облегчают эволюцию поведения.

Некоторые данные, представленные в этой статье, были опубликованы в кратком сообщении [19].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе изучены морфологические особенности НН в надглоточных ганглиях четырех различных видов тараканов (Blattaria): *Leucophaea maderae* (*Rhyparobia maderae*) (Fabricius, 1781) (Blaberidae:Oxyhaloinae), *Gromphadorhina portentosa* (Schaum, 1853) (Blaberidae:Oxyhaloinae), *Blaberus craniifer* (Burmeister, 1838) (Blaberidae:Blaberinae), *Nauphoeta cinerea* (Olivier 1789) (Blaberidae:Oxyhaloinae).

Тараканы выращивались в лабораторных условиях при температуре от 20 до 24°C, влажности 30–60% и фоторежиме 14:10 (день: ночь). Насекомых кормили яблоками, бананами, морковью, овсяными хлопьями, доступ к воде был свободным. Эксперименты были проведены на взрослых самцах.

Для выделения НН в надглоточных ганглиях использовали методику ретроградного окрашивания хлористым никелем через одну из коннектив между проторакальным ганглием и подглоточным ганглием. В некоторых случаях введение красителя было осуществлено между мезоторакальным и проторакальным ганглиями, в этом случае окра-

шивалось меньшее количество нейронов и легче выделялись их особенности. Для анестезии тараканов помещали в среду, содержащую CO_2 , на 10 мин. Кутикулу вскрывали в шейной области и одну из шейных коннектив помещали в кювету с 2.5%-ным раствором NiCl_2 . Препарат выдерживали в холодильнике в течение 2–3 сут. Окраску проявляли раствором рубановой кислоты в 70%-ном этаноле. Надглоточный ганглий фиксировали в 2%-ном растворе глутарового альдегида. Дегидратацию проводили в спиртовых растворах восходящей концентрации, просветление в метилбензоате, после чего выполняли стандартную заливку даммар-ксилолом. Было использовано по 15 особей каждого вида. На тотальных препаратах мозга отдельные нейроны, их аксоны и дендриты изучали с помощью светового микроскопа НИБ ЛОМО (Россия). Послойные изображения получали на микроскопе Leica AF7000 (Германия). Серии состояли из 10–12 оптических срезов (шаг 8–10 μm). Изображения обрабатывали с помощью графического редактора Helicon Focus 8. Морфологический анализ включал подсчет тел нейронов, определение их размеров, расположение тел и ветвление отростков. НН подсчитывали на препаратах целого мозга у 5 особей каждого вида. Данные представлены в виде медианы ($Q1$ – $Q3$).

Терминология

Существует несколько вариантов применения термина мозг у насекомых [20]. Мы обозначаем термином мозг надглоточный ганглий.

Группы НН анатомически классифицируются по положению тел клеток. Эти группы обозначались согласно номенклатуре, представленной Okada [21].

Нейрон обозначали ипсилатеральным, если его сома лежит на той же стороне ганглия что и нисходящий аксон, по которому проводилось окрашивание; и контралатеральным, если сома лежит на противоположной стороне ганглия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По одинаковой методике были окрашены НН американского таракана и тараканов, представителей семейства *Blaberidae*, и произведено сравнение расположения тел и дендритов в надглоточных ганглиях тараканов (рис. 1).

У тараканов семейства *Blaberidae* окрашивание выявило сходный паттерн расположения тел нисходящих нейронов и траектории отхождения основных отростков (рис. 2).

Большая часть тел НН, располагающихся на дорсальной и вентральной поверхностях протоцеребрума, собраны в группы. Эти группы подобны тем, что описаны у американского таракана [21]. Значительно меньше НН в дейто- и тритоцеребру-

ме (табл. 1). В области латерального дорсального дейтоцеребрума на границе с протоцеребрумом обнаружена группа в составе 4–6 клеток размером 20–35 μm . По классификации Окада [21] эта группа обозначается как i9, в других публикациях эта группа обозначена как G5 [22].

На вентральной поверхности мозга нисходящих нейронов меньше, чем на дорсальной. У всех исследованных видов среди вентральных нейронов протоцеребрума выделяются две группы, одна насчитывает 6–9 клеток (включая 2–3 крупных нейрона размером около 55 μm , другая 12–15 клеток (также 2–3 крупные клетки) (рис. 3). Отростки этих клеток объединяются в общие тяжи и нисходят в ипсилатеральную коннективу. Крупные нейроны имеют дендриты в области латеральной придаточной доли (lateral assessor lobe, LAL). Эти группы соответствуют группам i5 и i5n у американского таракана.

В дорсальном протоцеребруме находятся тела ипсилатеральных и контралатеральных нейронов, которые локализованы в группах, аналогично группам i1–i4 и c1–c4 у американского таракана. Размеры клеточных тел в протоцеребруме у всех тараканов колеблются в пределах 30–55 μm . Тела крупных контралатеральных нейронов лежат в протоцеребруме, а дендриты образуют разветвления в дорсальной доле дейтоцеребрума. Мы сравнили такие нейроны с контралатеральными нейронами американского таракана (рис. 4), морфология которых

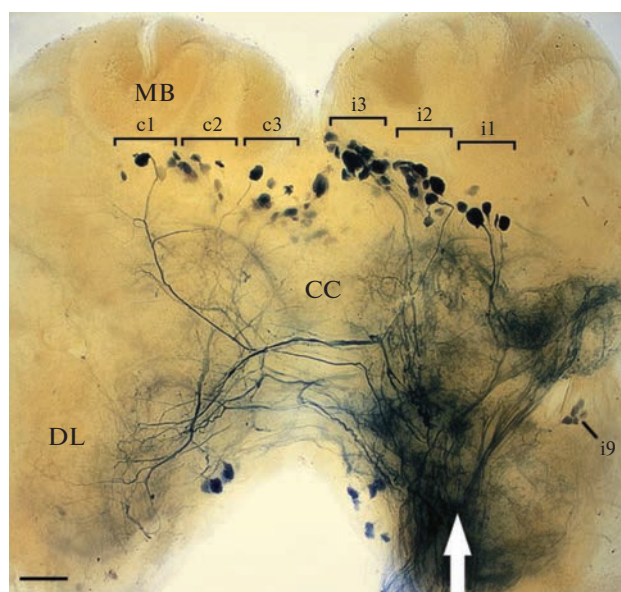


Рис. 1. Нисходящие нейроны в надглоточном ганглии таракана *Periplaneta americana*. MB – грибовидные тела (mushroom body); CC – центральный комплекс (central complex); DL – дорсальная доля дейтоцеребрума (dorsal lobe); c1, c2, c3 – контралатеральные группы НН; i1, i2, i3, i9 – ипсилатеральные группы НН. Белая стрелка – направление окрашивания по коннективе. Масштаб 100 μm .

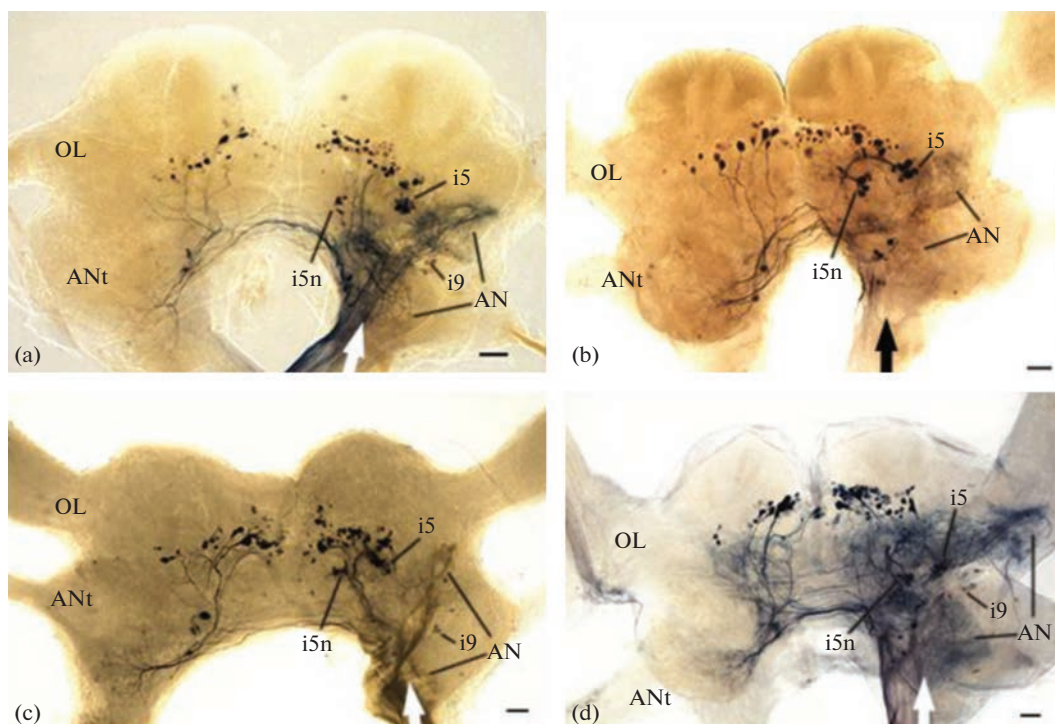


Рис. 2. Нисходящие нейроны в надглоточных ганглиях тараканов семейства Blaberidae. (a) — *Nauphoeta cinerea*; (b) — *Leucophaea maderae*; (c) — *Gromphadorhina portentosa*; (d) — *Blaberus craniifer*. OL — оптические доли (optic lobe); ANt — антеннальный нерв (antennal nerve); AN — отростки восходящих нейронов (ascending neuron); i5, i5n — вентральные группы НН; i9 — ипсилатеральная группа НН. Стрелки — направление окрашивания по коннективам. Масштаб 100 μ m.

описана, и электрофизиологические данные свидетельствуют, что они получают сенсорные входы от нескольких типов рецепторов. Эти интернейроны можно условно классифицировать как: оцеллярный нейрон (1) [23, 24], зрительный нейрон (2) [25, 26] и механочувствительный нейрон (3) [27, 28].

У тараканов семейства Blaberidae в группах i3 и c3 наблюдаются крупные соммы нейронов, у которых отростки имеют характерную форму и распо-

ложение около оцеллярного нерва в протоцеребруме. На рис. 5 представлен контралатеральный нейрон кубинского таракана *B. craniifer*.

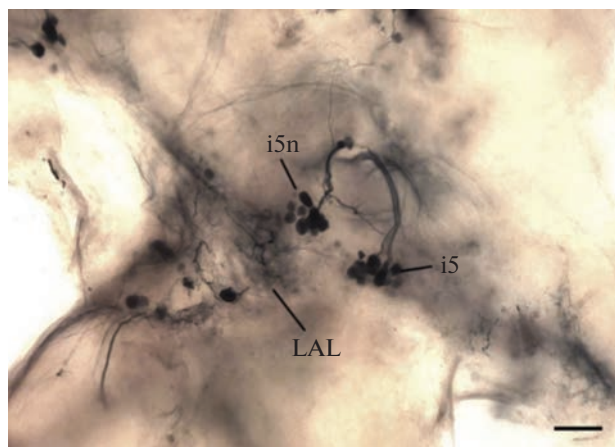


Рис. 3. Группы нейронов на вентральной поверхности надглоточного ганглия. LAL — латеральные придаточные доли; i5, i5n — вентральные группы НН. Масштаб 100 μ m.



Рис. 4. Контралатеральные НН таракана *Periplaneta americana*. О — оцеллярный отросток, DL — дорсальные доли, Cb1, Cb2, Cb3 — тела клеток, 1 — оцеллярный нейрон, 2 — зрительный нейрон, 3 — механочувствительный нейрон. Масштаб 100 μ m.

На рис. 6 и 7 этот нейрон обозначен цифрой (1). Его крупное тело (50 μm) лежит в дорсальном протоцеребруме. На этой же стороне ганглия в вентральную область отходит отросток, который дает ответвление в нейропил оцеллярного тракта в протоцеребруме. Еще один отросток делает петлю и по дорсальной поверхности ганглия идет в область ипсилатерального дейтоцеребрума. Основной аксон имеет разветвления в ипсилатеральном дейтоцеребруме и переходит через середину ганглия, а далее нисходит по контралатеральной коннективе. Такие нейроны с очень схожей морфологией есть у всех исследованных тараканов. У тараканов, способных к полету (американского таракана, кубинского таракана), оцеллярный отросток довольно крупный хорошо выраженный, а у мадагаскарского и пепельного таракана этот отросток совсем тонкий (рис. 7).

Среди контралатеральных нейронов у всех тараканов был обнаружен нейрон, который имеет характерный отросток, имеющий разветвления в латеральном протоцеребруме в районе ветвления входов из зрительных долей, а также имеет веточку в области антеннального двигательного центра, на рис. 6 и 7 он обозначен цифрой (2). По морфологии этот нейрон гомологичен нисходящему зрительно-му нейрону (DVI), обнаруженному у американского таракана [26].

Еще один крупный контралатеральных нейрон у всех видов тараканов имеет клеточное тело размером 45–60 μm , которое располагается в середине протоцеребрума около дорсальной поверхности ганглия. Основной отросток имеет небольшие ответвления в дорсомедиальном протоцеребруме и затем идет в дорсальную антеннальную долю дейтоцеребрума, где образует большое веерообразное дендритное дерево, этот нейрон обозначен цифрой (3) (рис. 6, 7). Аксон переходит на противоположную сторону ганглия, где дает небольшие отростки в области дейтоцеребрума и спускается по контралатеральной коннективе в торакальные ганглии. Этот нейрон гомологичен механочувствительному нейрону, обнаруженному у американского таракана.

Кроме описанных выше нейронов, среди ипсилатеральных и контралатеральных нейронов есть клетки, имеющие сходную анатомию у всех видов тараканов.

Дендриты НН распределены во многих отделах мозга, включая боковые и средние области протоцеребрума, но их нет в оптических и антеннальных долях, грибовидном теле, центральном комплексе.

При использовании методики окрашивания НН через коннективу, в надглоточном ганглии также прокрашиваются отростки восходящих нейронов. Восходящие аксоны заканчиваются варикозными нейритами в протоцеребральном нейропиле, в нейропиле дейтоцеребрума и тритоцеребрума у всех тараканов. Мы обнаружили варикозные отростки восхо-

Таблица 1. Сравнение количества НН у тараканов из семейства Blaberidae и у таракана *Periplaneta americana*

Вид	Размер тела, см	Общее кол-во НН						Кол-во НН в протоцеребруме				Размер крупных клеток, μm
		Области надглоточного ганглия										
		Прото		Дейто		Трито		ипси		контра		
		Median (Q1–Q3)	min–max	Median (Q1–Q3)	min–max	Median (Q1–Q3)	min–max	Median (Q1–Q3)	min–max	Median (Q1–Q3)	min–max	
<i>P. americana</i>	2.9–4.4	82.50 (78.25–86.75)	76–89	23.50 (19.25–27.25)	17–28	2–3	56.00 (54.10–57.50)	53–59	26.50 (23.75–29.25)	23–30	35–50	
<i>B. craniifer</i>	5.5–6.0	83.00 (79.5–87.25)	79–90	18.50 (18.00–19.00)	18–24	2–3	57.00 (55.00–61.00)	55–62	26.00 (24.00–28.00)	24–28	45–60	
<i>G. portentosa</i>	6.0–6.5	103.50 (99.75–104.50)	85–106	19.00 (18.75–20.25)	18–24	2–3	70.00 (67.75–70.50)	61–72	33.50 (32.00–34.00)	24–34	45–55	
<i>L. maderae</i>	4.5–5.0	84.00 (79.75–88.25)	76–93	18.50 (16.50–21.00)	12–27	2–3	57.50 (56.75–59.75)	56–65	25.50 (23.00–27.25)	20–28	40–55	
<i>N. cineria</i>	2.8–3.2	79.00 (77.25–79.75)	67–86	15.50 (14.00–19.25)	12–26	2–3	51.00 (49.25–54.50)	47–62	26.00 (23.75–27.50)	20–29	30–40	

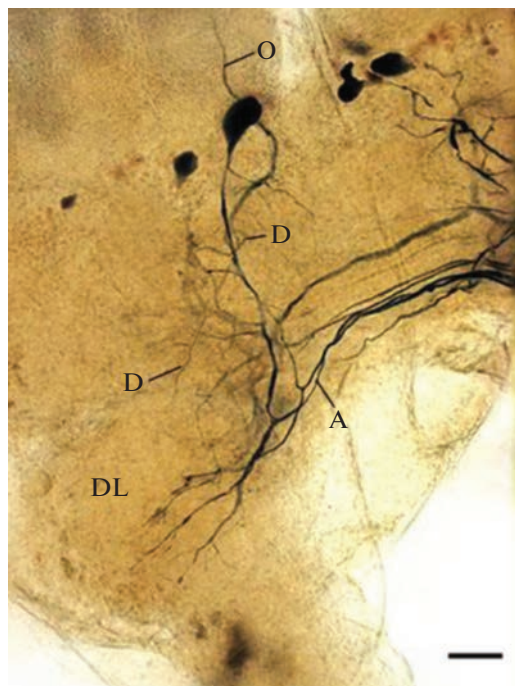


Рис. 5. Контралатеральный нейрон таракана *Blaberus craniifer*. О — оцеллярный отросток, D — дорсальный отросток, А — аксон, DL — дорсальные доли. Масштаб 100 μm .

дящих нейронов в ипсилатеральной лобуле (рис. 2). Восходящие аксоны, однако, не обнаруживаются ни в нейропиле грибовидных тел, ни в нейропиле центрального комплекса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнивая надглоточные ганглии четырех исследованных видов тараканов с надглоточным ганглием американского таракана, можно заметить сходство в количестве и пространственном распределении НН. Многие нейроны имеют идентичные рисунки ветвления дендритов и аксонов.

Некоторые из окрашенных нами НН совпадают с описанными ранее у американского таракана. У всех тараканов на вентральной поверхности протоцеребрума обнаружены группы i5 и i5n. Нейроны этих групп были идентифицированы у американского таракана [21], сверчка [29] и стрекозы [30]. У сверчка нейроны групп i5 и i5n получают входы от зрительной и слуховой систем и участвуют в контроле угла поворота при ориентации к источнику пения [29]. Интернейроны из группы i5 могут возбуждаться резкими изменениями освещения и обдуванием церков [6]. Также было обнаружено, что по крайней мере один нейрон из группы i5 чувствителен к антеннальному контакту [6]. У стрекозы некоторые нейроны из этих групп относятся к зрительным нейронам — детекторам движения, по морфологическим особенностям они аналогичны зрительным нейронам MDT4, MDT2, DIT2 [31, 30]. Для тараканов нет данных, что нейроны группы i5 и i5n получают зрительную или механочувствительную информацию, и их функция неизвестна.

Еще одна группа нейронов, которые идентифицированы у американского таракана, также обнаруживается и у исследованных тараканов. Это группа G5 в латеральном дорсальном дейтоцеребруме. У амери-

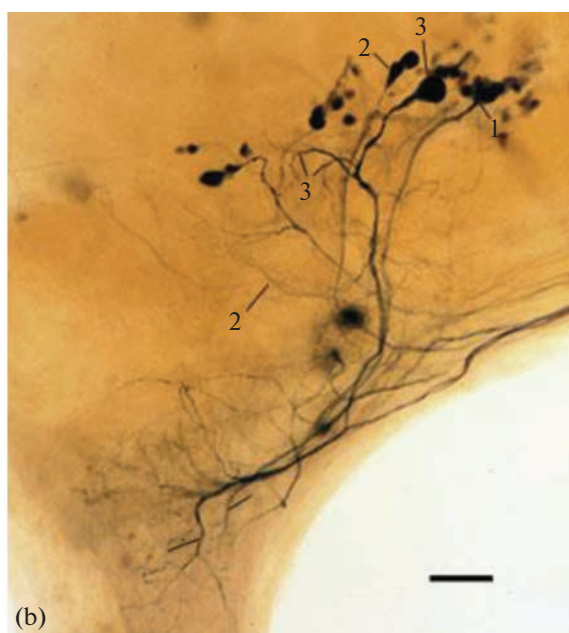
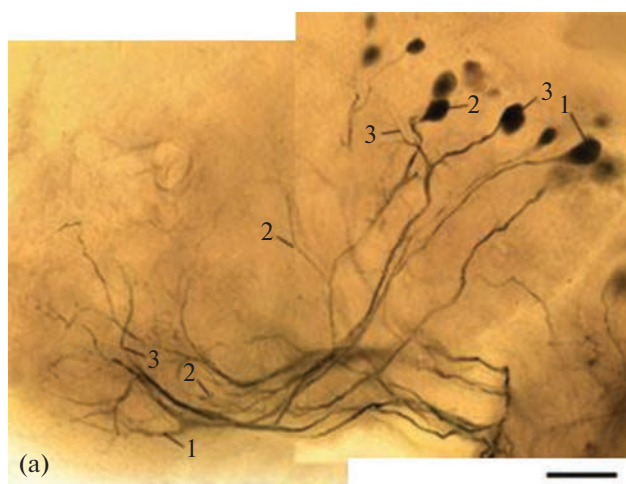


Рис. 6. Контралатеральные нейроны в надглоточном ганглии тараканов (a) *Leucophaea maderae*, (b) *Gromphadorhina portentosa*. 1 — нейрон, гомологичный оцеллярному, 2 — нейрон, гомологичный зрительному, 3 — нейрон, гомологичный механочувствительному. Масштаб 100 μm .

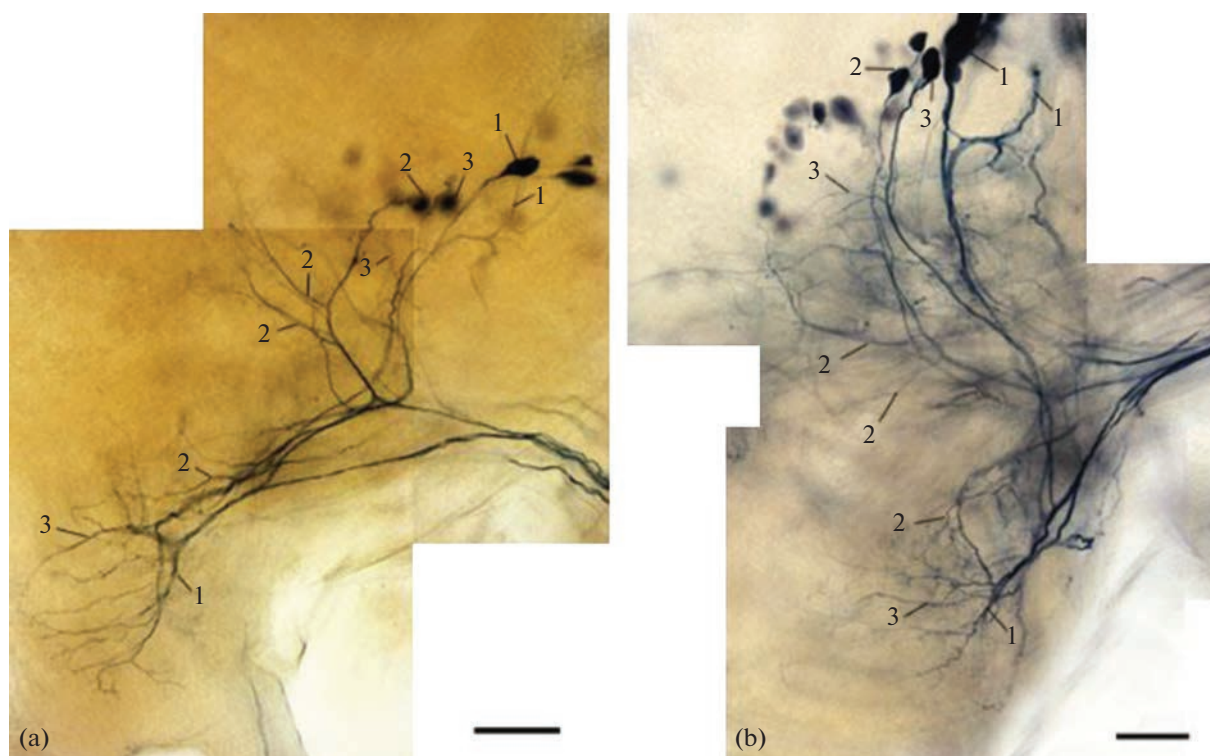


Рис. 7. Контралатеральные нейроны в надглоточном ганглии тараканов (a) *Nauphoeta cineria*, (b) *Blaberus craniifer*. 1 — нейрон, гомологичный оцеллярному, 2 — нейрон, гомологичный зрительному, 3 — нейрон, гомологичный механочувствительному. Масштаб 100 μm .

канского таракана и саранчи эти нейроны являются тирамин- и октопамин-эргическими нейронами [22]. Эти НН реагируют на сложный паттерн механочувствительных стимулов и могут быть важным компонентом реакции стресса у насекомых.

У американского таракана кластеры i3 и c3 содержат крупные сомы нисходящих ипсилатерально и контралатерально оцеллярных интернейронов OT-D1 и OT-D2 [24]. У исследованных нами тараканов обнаружены нейроны, по морфологии аналогичные этим нейронам, расположение и форма их отростков указывает на то, что они получают вход от глазков (оцеллей). И у американского таракана, и у представителей семейства *Blaberidae* эти нейроны одни из самых крупных среди нисходящих. Оцеллярный отросток лучше развит у летающих тараканов — американского, кубинского, у них и более крупные глазки. Нисходящие нейроны американского таракана с входом от глазков являются мультимодальными, кроме изменения освещенности они также отвечают на стимуляцию ветрочувствительных рецепторов на церках и на тактильные стимулы [23]. Можно предположить, что эти нейроны включены в модулирование ответов механочувствительной и других сенсорных систем с помощью глазков [32]. У сверчка подобный нисходящий контралатеральный нейрон с отростком в

оцеллярный тракт был идентифицирован как зрительный нейрон DBNc2-1 [29].

Ранее у американского таракана выявили контралатеральный интернейрон, который реагирует на движущиеся в поле зрения мелкие объекты и показывает схожие морфологические особенности с нисходящими нейронами — датчиками движения (DCMD) саранчи [25]. У этого НН таракана есть несколько общих черт с DCMD нейроном: он реагирует на движущиеся мелкие объекты в поле зрения, контралатерально к его аксону в брюшной нервной цепочке. Этот нейрон предпочтительно отвечает на уменьшение освещенности. Тело клетки расположено в среднем протоцеребруме, аксон переходит на контралатеральную сторону мозга и проецируется до метаторакального ганглия (Т3). Мы обнаружили нейроны, морфологически сходные со зрительным нейроном американского таракана у всех исследованных представителей семейства *Blaberidae*.

У всех видов тараканов мы обнаружили нейроны, морфологически гомологичные механочувствительному нейрону американского таракана. Эти нейроны обладают довольно крупным клеточным телом и основным отростком и имеют следующие сходные черты: клеточное тело находится в середине протоцеребрума ближе к его дорсальной поверхности, короткие ветви в дорсомедиальном

протоцеребруме большое веерообразное дендритное древо в дорсальной антеннальной доле дейтоцеребрума. У американского таракана описаны два нисходящих механочувствительных нейрона, один из которых — DIMa находится в надглоточном ганглии, другой DIMb — в подглоточном ганглии, и показано, что эти нейроны участвуют в поведении уклонения от опасности [27, 28]. Активность нейрона DIMa коррелирует с угловой амплитудой поворота во время движения побега, вызванного смещением антенны [27, 28]. Поведение избегания опасности американского таракана хорошо изучено, оно представляет собой поворот в сторону, противоположную нападению и побегу [33, 34]. Эта реакция вызывается обдуванием церок, прикосновением к антеннам или другим областям тела и конечностей [9, 10, 33, 34]. Идентифицированы рецепторы на церках, которые отвечают на обдувание [35], и восходящие гигантские интернейроны, передающие информацию в торакальные ганглии [10, 36].

Сверчки, которые также, как и тараканы относятся к группе ортоптероидных насекомых, демонстрируют реакцию избегания, сходную с реакцией американского таракана [37]. У сверчков выявлены несколько нисходящих нейронов, которые получают механочувствительный вход [38]. Нейрон американского таракана DIMa-1 и нейрон сверчка DBNc1-2 сходны морфологически и имеют механочувствительные входы исключительно от контралатеральной (по отношению к их аксону, проходящему в дорсомедиальной части шейной коннективы) антенны и показывают быстрый ответ (аксоны проводят потенциалы действия в грудные ганглии со скоростью 3–5 м/с). Учитывая совпадение анатомических и физиологических свойств, можно считать эти нейроны гомологичными [38]. Таким образом, у американского таракана и домового сверчка гомологичные нисходящие нейроны выполняют одну и ту же функцию — реагируют на отклонение антенны и участвуют в реакции избегания.

Основное предположение при изучении родственных видов, что гомологичные нейроны играют аналогичную роль. Учитывая то, что описанные нами нейроны имеют развитые дендриты в области дорсального антеннального механочувствительного центра в дейтоцеребруме, можно предположить, что эти нейроны участвуют в обработке механосенсорной информации от антенн. Исследовательское поведение и поведение избегания в ответ на механосенсорную антеннальную стимуляцию опосредованы нисходящими нейронами.

Все представители семейства Blaberidae используют тактильные входы от антенн для ориентации в пространстве. В настоящее время нет данных о том, что осязательное возбуждение антенн у мадагаскарских тараканов может вызвать реакцию избегания, хотя показано, что электрическая стимуляция антенн у этих тараканов вызывает поворот и

движение [39]. Наши наблюдения за поведением мадагаскарского таракана показали, что при касании антенн таракан делает несколько шагов в сторону, противоположную стимулу. Тараканы *N. cinerea* обычно живут большими группами, в которых формируется социальная иерархия. Отклонение антенны участвует не в поведении убегающего, а в большей мере во взаимодействии с сородичами. Доминирующие самцы чаще поворачиваются к стимулу, а подчиненные особи отступают [40]. Таракан *B. craniifer* при опасности замирает и пытается зарыться в почву. Такое поведение запускается тактильной стимуляцией крыльев [14]. При подаче направленного светового сигнала личинки таракана *B. craniifer* выполняют поворот и побег [41].

При наличии у исследованных видов тараканов нейронных цепей, которые у американского таракана отвечают за быстрое и эффективное убежание от хищника, поведение при касании антенн значительно различается. Подобную картину можно наблюдать при исследовании реакции избегания, вызванной обдуванием церок у двух видов летающих тараканов *P. americana* и *B. craniifer* и двух видов, не способных к полету *B. germanica* и *G. portentosa* [42]. Все эти виды имеют развитую ветрочувствительную церкальную систему, состоящую из нитевидных сенсилл на церках, сенсорных нейронов и гигантских восходящих нейронов, которые у представленных видов имеют разный диаметр аксонов [43]. При морфологическом и физиологическом сходстве церкальной системы поведенческие реакции на обдувание церок у этих видов сильно различаются. Обдувание вызывает реакцию убегающего у тараканов *P. americana* и *B. germanica*. У таракана *B. craniifer* поток воздуха вызывает только слабую реакцию, а у *G. portentosa* не вызывает такую реакцию [42]. Olsen и Tribblehorn делают вывод, что церкальная система у *G. portentosa* в ответ на обдувание запускает другие поведенческие реакции.

Тараканы *B. craniifer* в условиях повышенной температуры (28–30°C) демонстрируют реакцию избегания, вызванную обдуванием церок [14]. Церкальные ветрочувствительные нейроны участвуют также в поддержании полета, реагируя на создаваемые крыльями потоки воздуха [44]. Электрофизиологические исследования ответов гигантских нейронов на потоки воздуха разной скорости показали, что как у летающих *P. americana* и *B. craniifer*, так и нелетающих *G. portentosa* и *B. germanica*, частота спайков в ответе прямо пропорциональна скорости ветра, хотя небольшие различия между видами были обнаружены [43].

В эволюционном процессе анатомически гомологичные нейроны могут сохранять свою функцию, например, как в случае сверчка и американского таракана, у которых нисходящие механорецепторные морфологически сходные нейроны выполняют одинаковую роль в поведении убега-

ния. Стратегией выживания для американского и некоторых других видов тараканов и сверчков стала повышенная подвижность и быстрая реакция на механические стимулы. Видоспецифическое поведение может возникнуть в том случае, когда анатомически определенные схемы вовлекаются в другого вида деятельность с помощью нейромодуляции, переключения синапсов или принимая на себя дополнительные функции.

При изучении гомологичных нейронов у близких видов *Drosophila* было показано, что нейрон rPIIO, морфологически сходный у видов *D. melanogaster* и *D. yakuba*, определяет разный тип брачной песни у самцов [45]. Равнокрылые и разнокрылые стрекозы имеют анатомические различия в конфигурации глаз, кинематике полета, тактике охоты [46]. Было проведено сравнение нисходящих нейронов отслеживания цели (TSDNs) у представителя равнокрылых стрекоз *Calopteryx splendens* и представителя разнокрылых стрекоз *Erythemis simplicicollis* и выявлено, что по морфологическим и физиологическим характеристикам эти нейроны гомологичны, но есть существенные различия в организации отслеживания цели [46].

Многофункциональность нисходящих нейронов позволяет им участвовать в разных типах поведения. Поведение избегания хищника может быть сложным и разнообразным даже у филогенетически близких видов. В процессе эволюции гомологичные нисходящие нейроны в мозге тараканов вовлекаются в реализацию разных поведенческих реакций. У крупных тараканов *G. portentosa* и *B. craniifer* антенны утрачивают роль в поведении убегающего, но сохраняют функции ориентации в пространстве, выборе пищи и половом поведении. Потеря адаптивного поведения, заключающегося в реакции убегающего на обдувание и касание антенны, может замещаться использованием других способов защиты от хищников: утолщение экзоскелета, замирание, закапывание, химическая атака, использование звуков при обороне. При этом гомологичные нисходящие нейроны, сохраняя анатомическое сходство и, по-видимому, физиологические характеристики, легко перестраиваются на участие в других типах поведения.

Антенны играют важную роль в ориентации на местности, избегании врагов, взаимодействии с особями своего вида, выборе пищи, половом поведении, особенно с учетом того, что тараканы в основном активны в ночные часы [47, 48]. Однако отсутствие прямых связей НН с антеннальными долями — первой ступени обработки обонятельной информации, приходящей от ольфакторных сенсилл, а также с грибовидными телами — высшими ассоциативными центрами мозга насекомых, по-видимому, свидетельствует о необходимости глубокой многоступенчатой обработки обонятельных сигналов. Сходная ситуация наблюдается и со

сложной зрительной информацией, приходящей от глаз, которая нуждается в вычленении таких параметров, как спектральный состав, поляризация, а также движение объектов по отношению к насекомому и движение самого насекомого, и должна быть предварительно обработана оптическими долями и структурами центрального комплекса. НН получают переработанную и интегрированную информацию, которая затем поступает в моторные центры в ганглиях.

Наши данные подтверждают мнение, что большинство адаптаций мозга к изменению образа жизни связаны с первичными этапами обработки сенсорной информации, а нейронные цепи, которые связывают мозг с локомоторными центрами в торакальных ганглиях, менее подвержены изменениям в эволюционном процессе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н., в.н.с. М.И. Жуковской за помощь в подготовке рукописи.

Исследования выполнены с использованием микроскопа Leica AF 7000 на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.Ю.С.), сбор и обработка данных (И.Ю.С., И.Л.И.), написание статьи (И.Ю.С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного бюджета РФ по госзаданию № 075-00967-23-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Анисюткин ЛН* (2006) Отряд таракановые (Dictyoptera) — эволюция и систематика. РЭТ-инфо 2 (58): 6–8. [*Anisyutkin LN* (2006) Order Blattodea (Dictyoptera) — evolution and phylogeny. RET-info 2 (58): 6–8. (In Russ)].
2. *Kien J* (1990) Neuronal activity during spontaneous walking: I. Starting and stopping. Comp Biochem Physiol A 95: 607–621. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90747-g](https://doi.org/10.1016/0300-9629(90)90747-g)

3. Holmes P, Full RJ, Koditschek D, Guckenheimer J (2006) The dynamics of legged locomotion: models, analyses and challenges. *SIAM Rev* 48 (2): 207–304. <https://doi.org/10.1137/S0036144504445133>
4. Ritzmann RE, Büschges A (2007) Adaptive motor behavior in insects. *Curr Opin Neurobiol* 17: 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.001>
5. Heinrich R (2002) Impact of descending brain neurons on the control of stridulation, walking, and flight in orthoptera. *Microsc Res Tech* 56 (4): 292–301. <https://doi.org/10.1002/jemt.10033>
6. Staudacher EM (2001) Sensory responses of descending brain neurons in the walking cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Comp Physiol A* 187: 1–17. <https://doi.org/10.1007/s003590000171>
7. Card GM (2012) Escape behaviors in insects. *Curr Opin Neurobiol* 22 (2): 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.12.009>
8. Herberholz J, Marquart GD (2012) Decision making and behavioral choice during predator avoidance. *Front Neurosci* 6:125. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00125>
9. Camhi JM, Tom W (1978) The escape behavior of the cockroach *Periplaneta americana*. I. Turning response to wind puffs. *J Comp Physiol* 128: 193–201. <https://doi.org/10.1007/BF00656852>
10. Ritzmann RE (1984) The cockroach escape response. In: Eaton R (ed) *Neural mechanisms of startle behavior*. Plenum Press, New York 93–131. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2286-1_4
11. Nelson MC, Fraser J (1980) Sound production in the cockroach, *Gromphadorhina portentosa*: evidence for communication by hissing. *Behav Ecol Sociobiol* 305–314.
12. Roth LM, Hartman HB (1967) Sound production and its evolutionary significance in the Blattaria. *Ann Entomol Soc Am* 609 (4): 740–752. <https://doi.org/10.1093/aesa/60.4.740>
13. Schal C, Fraser J, Bell WJ (1982) Disturbance stridulation and chemical defence in nymphs of the tropical cockroach *Megaloblatta blaberoides*. *J Insect Physiol* 28 (6): 541–552. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90035-X)
14. Simpson BS, Ritzmann RE, Pollack AJ (1986) A comparison of the escape behaviors of the cockroaches *Blaberus craniifer* and *Periplaneta americana*. *J Neurobiol* 17 (5): 405–419. <https://doi.org/10.1002/neu.480170505>
15. Bell WJ, Roth LM, Nalepa CA (2007) Cockroaches: ecology, behavior, and natural history. Johns Hopkins Univ Press.
16. Nelson MC (1979) Sound production in the cockroach, *Gromphadorhina portentosa*: the sound-producing apparatus. *J Comp Physiol* 132: 27–38. <https://doi.org/10.1007/BF00617729>
17. Chou SY, Huang ZY, Chen ShCh, Yang RL, Kou R (2007) Antenna contact and agonism in the male lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Horm Behav* 52 (2): 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.04.013>
18. Bouchebti S, Arganda S. (2020) Insect lifestyle and evolution of brain morphology. *Curr Opin Insect Sci* 42: 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.012>
19. Северина ИЮ, Князев АН (2019) Нисходящие интернейроны в надглоточном ганглии мадагаскарского таракана *Gromphadorhina portentosa*. *Ж эвол биохим физиол* 55 (5): 377–380. [Severina IYu, Knyazev AN (2019) Descending Interneurons in the Supraesophageal Ganglion of the Madagascar Cockroach *Gromphadorhina portentosa*. *J Evol Biochem Phys* 55 (5): 429–432. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093019050132>
20. Чайка СЮ (2017) Гистология насекомых: Учебное пособие М. Изд-во Моск. ун-та. [Chaika SYu (2017) *Gistologiya nasekomykh: Uchebnoe posobie* M. Izdat Moskovsk univer. (In Russ)].
21. Okada R, Sakura M, Mizunami M (2003) Distribution of dendrites of descending neurons and its implications for the basic organization of the cockroach brain. *J Comp Neurol* 458: 158–174. <https://doi.org/10.1002/cne.10580>
22. Kononenko NL, Hartfil S, Willer J, Ferch J, Wolfenberg H, Pflüger HJ (2019) A population of descending tyraminer-gic/octopaminergic projection neurons of the insect deutocerebrum. *J Comp Neurol* 527 (6): 1027–1038. <https://doi.org/10.1002/cne.24583>
23. Ohyama T, Toh Y (1990) Morphological and physiological characterization of descending ocellar interneurons in the American cockroach. *J Comp Neurol* 301: 511–519. <https://doi.org/10.1002/cne.903010403>
24. Mizunami M (1995) Morphology of higher order ocellar interneurons in the cockroach brain. *J Comp Neurol* 362 (2): 293–304. <https://doi.org/10.1002/cne.903620211>
25. Leung V, Comer CM (2001) Identification and characterization of a visual interneuron in the cockroach, *Periplaneta americana*, equivalent to DCMD. *Soc Neurosci Abstr* 27.
26. Comer C, Baba Y (2011) Active touch in orthopteroid insects: behaviours, multisensory substrates and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 (1581): 3006–3015. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0149>
27. Burdohan JA, Comer CM (1996) Cellular organization of an antennal mechanosensory pathway in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Neurosci* 16: 5830–5843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-18-05830>
28. Ye S, Comer CM (1996) Correspondence of escape-turning behavior with activity of descending mechanosensory interneurons in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Neurosci* 16 (18): 5844–5853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-18-05844>
29. Staudacher E, Schildberger K (1998) Gating of sensory responses of descending brain neurons during walking in crickets. *J Exp Biol* 201 (4): 559–572. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.4.559>

30. Северина ИЮ, Исавнина ИЛ, Князев АН (2016) Топография восходящих и нисходящих нейронов надглоточного, мезо- и метаторакальных ганглиев у древне- и новокрылых насекомых. Ж эвол биохим и физиол 52 (5): 362–369. [Severina IYu, Isavnina IL, Knyazev AN (2016) Topographic anatomy of ascending and descending neurons of the supraesophageal, meso- and metathoracic ganglia in paleo- and neopterous insects. J Evol Biochem Phys 52 (5): 397–406. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093016050082>
31. Gonzalez-Bellido PT, Peng H, Yang J, Georgopoulos AP, Olberg RM (2013) Eight pairs of descending visual neurons in the dragonfly give wing motor centers accurate population vector of prey direction. Proc Natl Acad Sci USA 110 (2): 696–701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210489109>
32. Mizunami M (1995) Information processing in the insect ocellar system: comparative approaches to the evolution of visual processing and neural circuits. Adv Insect Physiol 25: 151–265. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60065-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60065-X)
33. Camhi JM (1988) Escape behavior in the cockroach: distributed neural processing. Experientia 44: 401–408. <https://doi.org/10.1007/BF01940534>
34. Ritzmann RE (1993) The neural organization of cockroach escape and its role in context-dependent orientation. Biological neural networks in invertebrate neuroethology and robotics (Eds.) Beer RD, Ritzmann RE, McKenna T. Acad Press Professional. United States 113–137.
35. Dagan D, Camhi JM (1979) Responses to wind recorded from the cercal nerve of the cockroach *Periplaneta americana*: II. Directional selectivity of the sensory neurons innervating single columns of filiform hairs. J Comp Physiol 133: 103–110. <https://doi.org/10.1007/BF00657524>
36. Comer CM (1985) Analyzing cockroaches escape behavior with lesions of individual giant interneurons. Brain Res 335 (2): 342–346. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90490-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90490-1)
37. Tauber E, Camhi JM (1995) The wind-evoked escape behavior of the cricket *Gryllus bimaculatus*: integration of behavioral elements. J Exp Biol 198 (9): 1895–1907. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.9.1895>
38. Schöneich S, Schildberger K, Stevenson PA (2011) Neuronal organization of a fast-mediating cephalothoracic pathway for antennal tactile information in the cricket (*Gryllus bimaculatus* DeGeer). J Comp Neurol 519 (9): 1677–1690. <https://doi.org/10.1002/cne.22594>
39. Erickson JC, Herrera M, Bustamante M, Shingiro A, Bowen T (2015) Effective stimulus parameters for directed locomotion in Madagascar hissing cockroach biobot. PLoS One 10: e0134348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134348>
40. Bell WJ (1978) Directional cues in tactile stimuli involved in agonistic encounters in cockroaches. Physiol Entomol 3 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1978.tb00125.x>
41. Bell WJ, Tobin TR, Vogel G, Surber JL (1983) Visual course control of escape responses in the cockroach *Blaberus craniifer*: role of internal and external orientation information. Physiol Entomol 8 (2): 121–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1983.tb00341.x>
42. Olsen AC, Triplehorn JD (2014) Neural responses from the filiform receptor neuron afferents of the wind-sensitive cercal system in three cockroach species. J Insect Physiol 68: 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.07.002>
43. McGorry CA, Newman CN, Triplehorn JD (2014) Neural responses from the wind-sensitive interneuron population in four cockroach species. J Insect Physiol 66: 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.017>
44. Ganihar D, Libersat F, Wendle G, Camhi JM (1994) Wind-evoked evasive responses in flying cockroaches. J Comp Physiol A 175: 49–65. <https://doi.org/10.1007/BF00217436>
45. Ding Y, Lillvis JL, Cande J, Berman GJ, Arthur BJ, Long X, Stern DL (2019) Neural evolution of context-dependent fly song. Current Biol 29 (7): 1089–1099. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.019>
46. Supple JA, Pinto-Benito D, Khoo C, Wardill TJ, Fabian ST, Liu M, Gonzalez-Bellido PT (2020) Binocular encoding in the damselfly pre-motor target tracking system. Current Biol 30 (4): 645–656. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.031>
47. Baba Y, Tsukada A, Comer CM (2010). Collision avoidance by running insects: antennal guidance in cockroaches. J Exp Biol 213 (13): 2294–2302. <https://doi.org/10.1242/jeb.036996>
48. Okada J, Toh Y (2006) Active tactile sensing for localization of objects by the cockroach antenna. J Comp Physiol A 192: 715–726. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0106-9>

COMPARATIVE NEUROANATOMY OF DESCENDING NEURONS OF THE SUPRAESOPHAGEAL GANGLION OF COCKROACHES OF THE FAMILY BLABERIDAE (BLATTODEA)

I. Yu. Severina^{a, #} and I. L. Isavnina^a

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

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

A comparative study of the morphology of descending neurons connecting the supraesophageal ganglion and thoracic ganglia in cockroaches of the family Blaberidae, which differ in protective behavior and flight ability, was carried out. The neuronal structure of these families was compared with the descending neurons of the cock-

roach *Periplaneta americana*. The number, spatial distribution, and arrangement of axons and dendrites of descending neurons of cockroach *Leucophaea maderae*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea* (Blaberidae) were found to be similar. Neurons homologous to the ocellar, mechanosensory, and visual descending neurons described in the cockroach *Periplaneta americana* were found. It is suggested that during the evolution of the cockroach species, the adaptive behavior at danger was changed by transforming sensory inputs and motor responses, while the system of descending neurons remains stable.

Keywords: insects, cockroaches, supraesophageal ganglion, descending neurons, behavior

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА АСТРОГЛИИ ГИППОКАМПА У КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ

© 2023 г. Ю. С. Григорьева¹, А. А. Наумова¹, С. Д. Николаева¹, М. В. Глазова^{1,*}

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

*e-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023 г.

После доработки 19.09.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Известно, что нарушения функций астроцитов могут приводить к изменению возбудимости нейронов и, как следствие, к развитию эпилепсии, однако данный вопрос требует дальнейшего изучения. Целью настоящей работы являлась оценка функционального состояния астроцитов гиппокампа у крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) с наследственной предрасположенностью к рефлекторным аудиогенным судорогам. В экспериментах были использованы “наивные” взрослые животные с полностью сформированной судорожной готовностью. В качестве контроля использовали крыс материнской популяции Вистар. Полученные результаты не выявили различий в экспрессии астроцитарных белков GFAP, ALDH1L1 и NFIA, что свидетельствует об отсутствии в гиппокампе крыс КМ реактивного астроглиоза. Экспрессия SPARC и аквапорина 4 также не отличалась от контрольного уровня, указывая на отсутствие нарушений в астроцитарной регуляции синаптогенеза и водного транспорта. Анализ глиальных белков, отвечающих за обратный захват и метаболизм нейромедиаторов, выявил нормальный уровень экспрессии транспортера ГАМК GAT-3 и глутаминсинтетазы, однако содержание транспортеров глутамата EAAT1 и 2 было достоверно повышено, что свидетельствует о более активной утилизации синаптического глутамата. Кроме того, сниженная экспрессия гликолитического фермента альдолазы С в гиппокампе крыс КМ, вероятно, указывает на недостаточную активность метаболизма глюкозы. Таким образом, полученные данные выявили генетически детерминированные изменения функционального статуса астроцитов в гиппокампе крыс с наследственной рефлекторной эпилепсией.

Ключевые слова: астроциты, аудиогенные судороги, гиппокамп, крысы Крушинского–Молодкиной, эпилепсия

DOI: 10.31857/S0044452923060049, **EDN:** HUVEVO

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты – это наиболее многочисленные глиальные клетки, которые представлены повсеместно в головном мозге и играют огромную роль в поддержании нормального функционирования нервной ткани [1]. Отростки астроцитов участвуют в образовании гематоэнцефалического барьера, контролирующего обмен веществ между кровью и нервной тканью [2, 3]. Эти клетки выполняют трофическую функцию, снабжая нейроны лактатом, метаболитом глюкозы и другими питательными веществами, а также поддерживают водно-солевой баланс внеклеточной жидкости [2, 4]. Более того, в настоящее время активно развивается концепция трипартитного синапса, который включает в себя не только пресинаптические и постсинаптические окончания нейронов, но и отростки астроцитов, поскольку эти глиальные клетки принимают активное участие в модуляции синаптической передачи [5]. В частности, в мембранах астроцитов экс-

прессируются транспортные системы, которые осуществляют обратный захват нейромедиаторов (глутамата, ГАМК, глицина) из синаптической щели [4, 5]. Далее молекулы медиаторов подвергаются в астроцитах метаболическим превращениям и могут служить источником для синтеза собственных сигнальных молекул (глиотрансмиттеров), в том числе АТФ, D-серина, глутамата, ГАМК [4]. В то же время нарушения астроцитарных функций могут сопровождать развитие многих заболеваний нервной системы, в том числе различных форм эпилепсии [2, 6, 7].

Одной из наиболее распространенных форм эпилептических расстройств является височная эпилепсия [8]. Установлено, что ключевой структурой, вовлеченной в генерализацию судорожной активности при височной эпилепсии, является гиппокамп [9]. У пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией в гиппокампе обычно наблюдается комплекс патологических измене-

ний, определяемый как склероз гиппокампа (мезиальный темпоральный склероз). В очагах склероза выявляются такие признаки, как гибель нейронов, разрастание кровеносных сосудов, реорганизация синапсов, а также реактивный астроглиоз [8, 10]. В свою очередь, для реактивных астроцитов характерны увеличение размера, усиленное ветвление отростков, повышение экспрессии глияльного фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP) и продукции провоспалительных цитокинов, что приводит к гибели нейронов [8, 10–12]. Сходные изменения были выявлены также при моделировании височной эпилепсии у животных [7, 10].

С другой стороны, в настоящее время активно исследуются генетические аномалии, связанные с развитием эпилепсии. Интересно, что целый ряд выявленных мутаций и генетических полиморфизмов затрагивает гены, кодирующие ключевые белки астроцитов [10]. Например, показано, что мутации в гене *KCNJ10*, приводящие к снижению активности каналов Kir4.1, вызывают наследственный синдром EAST (Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy) [10]. Нуклеотидные вариации в генах *KCNJ10* и *AQP4* были выявлены у пациентов с височной эпилепсией и склерозом гиппокампа [10, 13]. У пациентов, имеющих мутации в гене, кодирующем глутаминсинтазу, также наблюдались высокоинтенсивные судороги [14]. Хотя эти данные немногочисленны, они свидетельствуют о том, что нарушения глияльных функций могут являться не только следствием эпилептиформной активности, но и причиной эпилепсии наследственной этиологии.

Для изучения генетических нарушений, лежащих в основе развития эпилепсии, широко используются различные линии грызунов, как генетически модифицированные, так и с наследственной предрасположенностью к рефлекторным аудиогенным судорогам, в том числе крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ). Крысы КМ, выведенные путем селекции крыс Вистар, характеризуются стабильными клонико-тоническими припадками в ответ на звуковую стимуляцию [15]. При этом чувствительность к звуковой стимуляции у этих животных развивается в процессе постнатального онтогенеза и полностью формируется к 3-му месяцу жизни [15]. Таким образом, крысы КМ являются адекватной моделью наследственной рефлекторной эпилепсии у человека. В то же время повторные стимуляции судорог приводят к генерализации судорожной активности в мозге этих животных и к развитию у них височной эпилепсии [16, 17].

Наши предыдущие исследования выявили ряд генетически детерминированных изменений в гиппокампе крыс КМ, в том числе aberrантный нейрогенез [18] и аномалии глутаматергической трансмиссии [19], которые могут вносить вклад в

формирование гипервозбудимых нейронных сетей и развитие эпилепсии при аудиогенных стимуляциях. Целью данной работы являлся анализ наследственных нарушений функционального состояния астроглии гиппокампа взрослых крыс линии КМ по сравнению с крысами Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовали взрослых (в возрасте 4–5 мес) “наивных” крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) (Московский государственный университет, Россия), которые не подвергались стимуляциям аудиогенных судорог, но имели полностью сформированную судорожную готовность. Крысы Вистар (аутбредный сток ЭБК ИЭФБ РАН) соответствующего возраста были использованы в качестве контрольной группы. Крыс содержали по 4–5 животных в клетке в условиях 12-часового светового дня и свободного доступа к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведению экспериментов на животных и были одобрены комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (Протокол № 1-20/2023 от 26.01.2023 г. комиссии по биоэтике, утвержденной Приказом Директора ИЭФБ РАН № 8 от 24.01.2023 г.). Каждая экспериментальная группа включала 9 животных.

Крыс обеих экспериментальных групп быстро декапитировали, мозг извлекали и иссекали дорзальную часть гиппокампа. Гиппокампы пяти животных из каждой группы собирали для Вестерн-блот анализа, а гиппокампы остальных четырех — для анализа ПЦР в режиме реального времени.

Вестерн-блот анализ

Гиппокампы гомогенизировали в лизисном буфере (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА) при 4°C с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз (Roche, #04 906 837 001). Общее содержание белка в образцах определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта. Белки разделяли в 10- или 12%-ном полиакриламидном геле (10 мкг белка на каждую лунку) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, #1620112). Мембраны инкубировали в буферном растворе TBST (Tris buffer saline, 20% Tween-20), содержащем 5% обезжиренного молока, в течение 1 ч, а затем — в течение ночи при 4°C в растворе первичных антител (табл. 1). После этого мембраны инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (табл. 1), в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации специ-

Таблица 1. Антитела для Вестерн-блот анализа

Название реактива	Производитель	Артикул	Разведение
<i>Первичные антитела</i>			
Rabbit anti-GFAP concentrate	Invitrogen	180063	1:1000
Anti-Aldh1L1 Antibody, clone N103/39	Sigma-Aldrich	MABN495	1:1000
GABA T-3 Antibody (G-6)	SantaCruz Biotechnology	sc-376001	1:1000
NFIA Antibody	Novus Biologicals	NBP1-81407	1:1000
Aldolase C Antibody	Novus Biologicals	NBP1-90954	1:1000
EAAT1 (A-3) mouse monoclonal antibody	SantaCruz Biotechnology	sc-515839	1:1000
EAAT2/GLT1 rabbit polyclonal antibody	Novus Biologicals	NBP1-20136	1:1000
Glutamine Synthetase Antibody (CL3004)	Novus Biologicals	NBP2-46644	1:1000
SPARC Antibody	Novus Biologicals	NBP1-80972	1:1000
AQP4 mouse monoclonal antibody	Elabscience	E-AB-22025	1:1000
Actin mouse antibody	Abcam	ab3280	1:1000
<i>Вторичные антитела</i>			
Anti-rabbit IgG (whole molecule), peroxidase antibody produced in goat	Sigma-Aldrich	A0545	1:10000
Anti-Mouse IgG (whole molecule), peroxidase antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich	A9044	1:40000

фических белковых полос использовали хемилюминесцентную реакцию пероксидазы с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075), которую выявляли при помощи ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad). Оптическую плотность каждой белковой полосы оценивали количественно с помощью программного обеспечения ImageLab (версия 6.0; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Уровень специфического сигнала для каждого белка нормировали на сигнал актина.

Синтез кДНК и ПЦР в режиме реального времени

РНК выделяли из образцов гиппокампа с помощью реагента PureZOL™ (BioRad, #732-6890). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра CLARIOstar Plus (BMG LABTECH) в соответствии со стандартной процедурой. Чистота образцов РНК проверялась путем подтверждения соотношения оптической плотности A260/A280 > 1.8.

Два мкг общей РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1622). Количественный анализ ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора реактивов 5x qPCR mix-HS SYBR (Evrogen, #PK147L) и амплификатора LightCycler 96 (Roche). Праймеры (табл. 2) были разработаны с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, США). Параметры

ПЦР были следующими: начальная денатурация — один цикл при 95°C в течение 15 мин; 40 циклов денатурации, амплификации и количественной оценки (95°C в течение 15 с, 60°C в течение 30 с и 72°C в течение 5 с); кривая плавления — начало при 65°C и постепенное повышение до 95°C. Пороговые значения циклов были нормализованы относительно референсных генов *GAPDH* и *S18*.

Экспрессию в контрольных гиппокампах крыс Вистар оценивали как “1”. Относительную кратность экспрессии генов рассчитывали в Microsoft Excel методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты представлены в виде гистограмм. Каждое значение определяли на основе 3 независимых ПЦР-повторов для каждого образца кДНК.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи непараметрического U-теста Манна-Уитни с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., Сан-Диего, Калифорния). Все результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD). Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе был проведен комплексный анализ экспрессии белков, регулирующих функци-

Таблица 2. Праймеры для анализа ПЦР в режиме реального времени

Ген (Target gene)	Номер сиквенса (Accession number)	Прямой праймер (Left primer)	Обратный праймер (Right primer)
<i>Gfap</i> (GFAP)	NM_017009.2	gag-gct-aat-gac-tat-cgc-cg	cac-cgt-ctt-tac-cac-gat-gt
<i>Aldh1l1</i> (ALDH1L1)	NM_022547.2	att-tgc-tga-ctg-cga-cct-ca	cat-gat-ggg-ccc-aaa-gga-ct
<i>Nfia</i> (NFIA)	NM_012988.2	gca-gtt-atg-tat-tct-ccg-ct	gcg-gaa-tac-ctt-tga-aca-ag
<i>Aldoc</i> (AldoC)	NM_012497	atc-aac-cga-tgc-tca-ct-tcc	ctc-tgt-tca-gca-cgg-cta-tt
<i>Slc1a3</i> (GLAST/EAAT1)	NM_019225.2	acc-tgt-ttc-gga-atg-cct-tt	aga-ctg-gag-atg-atc-agg-gg
<i>Slc1a2</i> (GLT1/EAAT2)	NM_017215.3	aga-ggc-tgc-ccg-tta-aat-ac	ctc-gtc-gtt-ctt-ctt-ccc-ag
<i>Sparc</i> (SPARC)	NM_012656.2	tgg-tag-ttt-gga-ggt-agg-ca	ctg-ctg-gga-gtc-tgt-ttt-gt
<i>Aqp4</i> (AQP4)	NM_001317749.1	cca-cat-ctca-gag-aca-ctg-c	gtc-ctc-cta-gaa-gtg-ttg-cg
<i>Gapdh</i> (GAPDH)	NM_017008.4	tcc-ctc-aag-att-gtc-agc-aa	aga-tcc-aca-acg-gat-aca-tt
<i>Rps18</i> (S18)	NM_213557.1	cct-gcg-agt-act-caa-cac-ca	ctg-ctt-tcc-tca-aca-cca-ca

ональное состояние астроцитов гиппокампа. В первую очередь, мы оценили экспрессию GFAP и альдегиддегидрогеназы 1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1, ALDH1L1), которые являются ключевыми маркерами астроцитов различных популяций [20]. Полученные результаты показали повышенное содержание мРНК GFAP в гиппокампе крыс КМ (рис. 1a), однако экспрессия соответствующего белка не отличалась от контроля (рис. 2a, k). Содержание мРНК (рис. 1b) и белковая экспрессия (рис. 2b, k) ALDH1L1 в гиппокампе крыс КМ и Вистар также достоверно не различались.

Анализ экспрессии ядерного фактора I-A (nuclear factor I-A, NFIA), содержание которого повышается в реактивных астроцитах [21], также не выявил различий между крысами КМ и Вистар (рис. 1c; рис. 2c, k), что может свидетельствовать об отсутствии реактивного астроглиоза у “наивных” крыс КМ.

Далее мы проанализировали экспрессию альдолазы С, фермента аэробного гликолиза, который специфически экспрессируется в астроцитах [1]. Результаты показали, что при неизменном уровне экспрессии мРНК (рис. 1d) уровень белка в гиппокампе крыс КМ был значительно ниже, чем у крыс Вистар (рис. 2d, k), что указывает на наличие нарушений в регуляции метаболизма глюкозы.

Оценка экспрессии астроцитарных транспортеров показала, что уровень мРНК транспортеров возбуждающих аминокислот (excitatory amino acid transporters, EAAT) 1 и 2 не отличался между группами крыс (рис. 1e, f), однако содержание соответствующих белков было значительно выше в гиппокампе крыс КМ (рис. 2e, f, k). Поскольку основной молекулой, которую транспортируют EAAT, является глутамат [1], полученные данные свидетельствуют о более активном захвате глутамата астроцитами из синаптической щели. В то же время экспрессия астроцитарного транспортера ГАМК типа 3 (GABA transporter 3, GAT3) в гиппокампе крыс КМ не отличалась от контрольного уровня

(рис. 2g, k). Анализ экспрессии глутаминсинтетазы, астроцитарного фермента, превращающего глутамат в глутамин, также не выявил межлинейных различий (рис. 2h, k).

Еще одним специфическим маркером астроцитов является секреторный кислый белок, богатый цистеином (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC), который ингибирует образование глутаматергических синапсов [22]. Наши результаты показали, что экспрессия SPARC в гиппокампе крыс КМ не отличалась от контроля (рис. 1g, рис. 2i, k), что указывает на отсутствие изменений в данной астроцитарной функции.

Ключевую роль в регуляции астроцитами водного баланса играет аквапорин 4 (aquaporin 4, AQP4), экспрессия которого значительно изменяется при развитии эпилепсии [23]. В то же время, мы не обнаружили изменений в уровне мРНК (рис. 1h) и белка (рис. 2g, k) AQP4 в гиппокампе аудиогенных крыс КМ по сравнению с контрольными крысами Вистар.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из основных маркеров функционального состояния астроцитов является GFAP, белок промежуточных филаментов, изменения экспрессии которого показаны при различных патологических состояниях ЦНС. В частности, при эпилепсии повышенное содержание GFAP характерно для реактивных астроцитов. Полученные нами данные показали, что у наивных крыс КМ по сравнению с крысами Вистар экспрессия мРНК GFAP была значительно выше, однако уровень белка не отличался. Вероятно, это противоречие может быть обусловлено нарушениями процессинга мРНК GFAP или ее деградации. Анализ другого широко используемого маркера астроцитов ALDH1L1 [24] также не выявил изменений его экспрессии у крыс КМ. Поскольку GFAP и ALDH1L1

являются маркерами различных популяций астроцитов [20], полученные данные свидетельствуют о схожести популяционного состава астроцитов в гиппокампе крыс Вистар и КМ.

Наряду с повышенным GFAP, реактивные астроциты экспрессируют также специфический фактор NFIA [21]. Наши данные не выявили различий в экспрессии NFIA в гиппокампе “наивных” крыс КМ по сравнению с крысами Вистар, что в комплексе с нормальной экспрессией GFAP говорит об отсутствии реактивного астроглиоза у крыс КМ, не подвергавшихся стимуляциям аудиогенных судорог. В то же время повышенное содержание мРНК GFAP в гиппокампе у “наивных” крыс КМ может вносить вклад в развитие реактивного астроглиоза при формировании височной эпилепсии в результате аудиогенного киндинга.

Кроме того, в гиппокампе крыс КМ мы выявили аномально низкий уровень экспрессии альдолазы С, одного из ключевых ферментов аэробного гликолиза. Известно, что основная роль в метаболизме глюкозы в нервной ткани принадлежит именно астроцитам, в то время как нейроны в качестве основного энергетического субстрата используют производимый астроцитами лактат [25]. Следовательно, недостаток альдолазы С в гиппокампе крыс КМ свидетельствует о снижении активности гликолиза в астроцитах, и, как следствие, выработки необходимого для нейронов лактата. С другой стороны, в различных патологических ситуациях активация гликолиза в нервной ткани может играть как позитивную, так и негативную роль. В частности, при эпилепсии активация гликолиза усугубляет тяжесть припадков, а ингибирование гликолиза рассматривается как один из перспективных подходов к лечению эпилептических расстройств [26, 27]. Таким образом, можно предположить, что низкий уровень гликолиза у “наивных” крыс КМ является одним из факторов, препятствующих проявлению спонтанных судорожных припадков.

Последние исследования также показали, что ферменты аэробного гликолиза могут выполнять функции транскрипционных факторов и протеинкиназ, а также регулировать стабильность мРНК [28, 29]. Более того, Staugaitis и соавт. показали, что на начальной стадии астроцитарной дифференцировки экспрессия альдолазы С начинается раньше, чем экспрессия GFAP [30]. Эти данные позволяют предположить, что снижение уровня гликолитических ферментов напрямую или косвенно влияет на процессинг или стабильность мРНК GFAP.

Астроциты играют важнейшую роль в регуляции синаптической передачи, участвуя в обратном захвате и метаболизме молекул нейротрансмиттеров. В частности, они являются главными клетками, которые осуществляют обратный захват возбуждающего медиатора глутамата из синаптической щели,

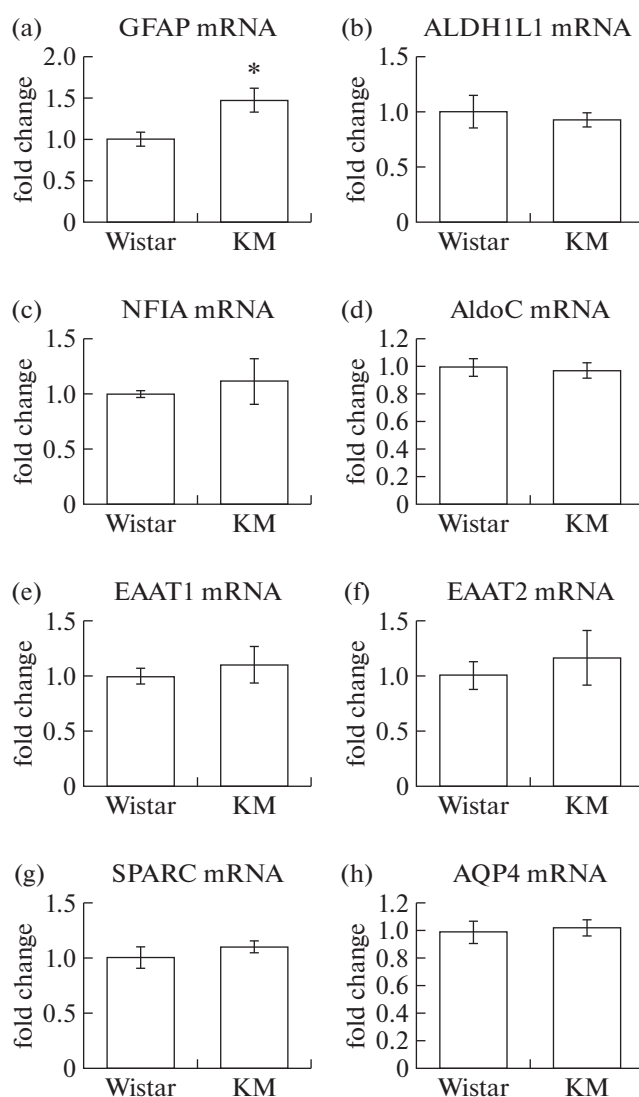


Рис. 1. ПЦР анализ в режиме реального времени экспрессии генов-маркеров астроцитов в гиппокампе “наивных” крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) и крыс Вистар. (a) – GFAP mRNA; (b) – ALDH1L1 mRNA; (c) – NFIA mRNA; (d) – AldoC mRNA; (e) – EAAT1 mRNA; (f) – EAAT2 mRNA; (g) – SPARC mRNA; (h) – AQP4 mRNA. Данные представлены в виде кратности изменений $\pm$ стандартное отклонение. За “1” приняты значения уровня экспрессии исследованных генов в гиппокампе контрольных крыс Вистар. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ограничивая передачу возбуждающего сигнала на постсинаптическую мембрану и предохраняя нейроны от эксайтотоксичности [31]. В мембранах астроцитов экспрессируются два основных транспортера глутамата, EAAT1 (GLAST) и EAAT2 (GLT-1), которые переносят глутамат внутрь клетки вместе с ионами Na^+ и H^+ в обмен на ионы K^+ , причем около 90% обратного захвата глутамата в центральной нервной системе обеспечивает EAAT2 [31]. Известно, что для очагов эпилептической активности ха-

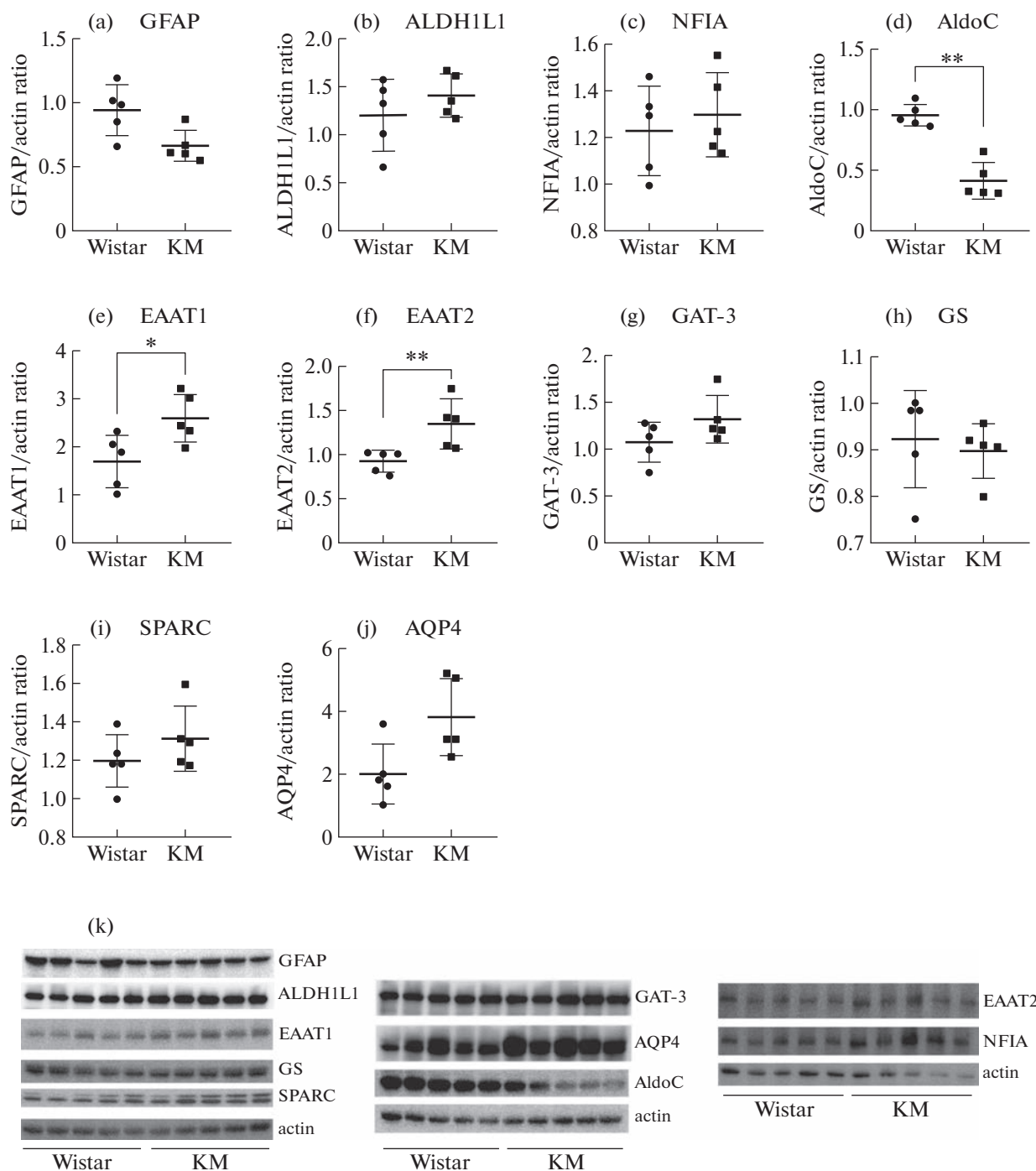


Рис. 2. Вестерн-блот анализ уровня экспрессии астроцитарных белков в гиппокампе “наивных” крыс KM и крыс Вистар. (a) – GFAP; (b) – ALDH1L1; (c) – NFIA; (d) – AldoC; (e) – EAAT1; (f) – EAAT2; (g) – GAT-3; (h) – GS; (i) – SPARC; (j) – AQP4. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем. $n = 5$ для каждой группы. (k) – репрезентативные изображения иммуноблотов белков интереса GFAP, ALDH1L1, NFIA, AldoC, EAAT1, EAAT2, GAT-3, GS, SPARC, AQP4 и actin в гиппокампе крыс KM и Вистар.

рактерна повышенная концентрация глутамата в межклеточном пространстве, которая может быть связана с дисфункцией EAAT1/2 и снижением их экспрессии [8, 32]. Действительно, было показано, что нокаутирование гена, кодирующе-

го EAAT2/GLT-1, у мышей вызывало спонтанные судороги и патологические изменения в гиппокампе, напоминающие гиппокампальный склероз [33]. Однако имеющиеся данные об экспрессии этих переносчиков у пациентов с височной эпи-

лепсией и склерозом гиппокампа противоречивы. Согласно некоторым данным, в гиппокампе наблюдается сниженная экспрессия EAAT2, в то время как экспрессия EAAT1, напротив, повышается [34]. Tessler и соавт. не выявили никаких изменений в экспрессии EAAT [35]. Другие исследователи сообщают о сниженной экспрессии обоих транспортеров [36, 37]. Таким образом, вопрос о регуляции работы транспортеров глутамата при височной эпилепсии до сих пор остается открытым. Полученные нами данные показали, что у “наивных” крыс КМ с полностью сформированной готовностью к аудиогенным припадкам наблюдается повышенный уровень EAAT1 и 2 в гиппокампе, что свидетельствует об активном удалении глутамата астроцитами из синаптической щели. При этом ранее мы также выявили сниженную экспрессию везикулярного транспортера глутамата 2 (VGLUT2) и ионотропных глутаматных рецепторов в гиппокампе этих животных [19]. Вероятно, в комплексе эти изменения препятствуют гипервозбуждению гиппокампа и возникновению у крыс КМ спонтанных судорог.

Помимо транспортеров глутамата, астроциты экспрессируют несколько белков-транспортеров ГАМК, обеспечивающих рециркуляцию ГАМК в пресинапсе, включая GAT-1, GAT-3 и бетаин-ГАМК-транспортер (BGT-1) [38, 39]. В отличие от GAT-1 и BGT-1, GAT-3 экспрессируется исключительно астроцитами и располагается преимущественно в астроглиальных отростках, модулируя тонические тормозные токи в постсинаптических клетках [38]. Наши данные не выявили различий в уровне экспрессии GAT-3 между “наивными” крысами КМ и крысами Вистар, что свидетельствует об отсутствии изменений транспорта ГАМК в астроцитах гиппокампа.

Глутамат, захваченный астроцитами из синаптической щели, далее метаболизируется при помощи специфического астроцитарного фермента глутаминсинтетазы с образованием глутамина [40]. Далее глутамин возвращается в нейроны, где используется для синтеза глутамата и ГАМК [41]. Таким образом, глутаминсинтетаза играет центральную роль в метаболизме возбуждающих и тормозных нейромедиаторов [42]. Наши данные не выявили изменений экспрессии глутаминсинтетазы в гиппокампе крыс КМ, что свидетельствует о нормальном уровне метаболизма глутамата и ГАМК.

Помимо регуляции процессов нейротрансмиссии, астроциты также контролируют образование, созревание и дегенерацию синапсов. В частности, такие секреторные белки астроцитов, как SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) и SPARCL1 (SPARC-like 1), регулируют формирование возбуждающих синапсов как в развивающемся, так и во взрослом мозге млекопитающих [22]. Так, SPARCL1 непосредственно стимулирует образова-

ние возбуждающих синапсов, в то время как SPARC специфически тормозит синаптогенную активность SPARCL1 [22]. Наши данные показали, что экспрессия SPARC в гиппокампе крыс КМ не изменяется по сравнению с крысами Вистар. Поскольку наши предыдущие данные указывают на снижение глутаматергической трансмиссии в гиппокампе крыс КМ [19], можно предположить наличие сопутствующих изменений в экспрессии SPARCL1, однако данный вопрос требует дальнейших исследований.

Одним из факторов, вызывающих гипервозбудимость нейронов, является нарушение водного баланса нервной ткани, в регуляции которого принимают участие водные каналы в мембранах глиальных клеток, образованные белками аквапоринов [23]. В частности, AQP4 экспрессируется в отростках астроцитов, контактирующих с кровеносными капиллярами или глутаматергическими синапсами. Показано, что у пациентов с височной эпилепсией и склерозом гиппокампа наблюдается снижение AQP4 в периваскулярном пространстве гиппокампа [43], а у мышей, нокаутных по гену *AQP4*, наблюдается нарушение буферизации K⁺ и, как следствие, повышенная продолжительность судорог, вызванных электрической стимуляцией [44]. В то же время в гиппокампе “наивных” крыс КМ мы не выявили отличий в экспрессии AQP4, что свидетельствует об отсутствии нарушений данной астроцитарной функции на фоне полностью сформированной судорожной готовности.

Таким образом, проведенное исследование выявило повышенную экспрессию транспортеров глутамата EAAT1 и 2 и сниженную экспрессию альдозазы С в астроцитах гиппокампа у “наивных” взрослых крыс КМ. С одной стороны, эти изменения указывают на активное удаление глутамата из синаптической щели и сниженную активность гликолиза, что может препятствовать развитию у крыс КМ спонтанных судорожных припадков. С другой стороны, сниженный уровень регулируемой альдозазы С метаболизма глюкозы может свидетельствовать о недостаточном снабжении нейронов гиппокампа необходимыми энергетическими субстратами.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00342 <https://rscf.ru/project/23-24-00342/>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работы была выполнена на оборудовании ЦКП ИЭФБ РАН (441590).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС по проведе-

нию экспериментов на животных и были одобрены комитетом по уходу и использованию животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (Протокол № 1-20/2023 от 26.01.2023 г. комиссии по биоэтике, утвержденной Приказом Директора ИЭФБ РАН № 8 от 24.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.С.Г. — проведение экспериментов, сбор материала, проведение анализа Вестерн-блот; А.А.Н. — планирование экспериментов, обсуждение результатов, интерпретация данных; С.Д.Н. — проведение экспериментов, сбор материала, проведение анализа ПЦР; М.В.Г. — постановка задачи, планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verkhatsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of astroglia. *Physiol Rev* 98: 239–389.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
2. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee J-M, Parpura V, Hol EM, Sofroniew M V, Verkhatsky A (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131: 323–345.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
3. Kovács R, Heinemann U, Steinhäuser C (2012) Mechanisms underlying blood–brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: Role of astroglia. *Epilepsia* 53: 53–59.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03703.x>
4. Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior. *Annu Rev Physiol* 72: 335–355.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135843>
5. Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32: 421–431.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
6. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7: 194–206.
<https://doi.org/10.1038/nrn1870>
7. Jabs R, Seifert G, Steinhäuser C (2008) Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* 49: 3–12.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01488.x>
8. Binder DK, Steinhäuser C (2006) Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 54: 358–368.
<https://doi.org/10.1002/glia.20394>
9. Sparks FT, Liao Z, Li W, Grosmark A, Soltesz I, Losonczy A (2020) Hippocampal adult-born granule cells drive network activity in a mouse model of chronic temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 2020 111 (11): 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19969-2>
10. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36: 174–184.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>
11. Wetherington J, Serrano G, Dingledine R (2008) Astrocytes in the Epileptic Brain. *Neuron* 58: 168–178.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.002>
12. Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E1896–E1905.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1800165115>
13. Heuser K, Eid T, Lauritzen F, Thoren AE, Vindedal GF, Tauböll E, Gjerstad L, Spencer DD, Ottersen OP, Nagelhus EA, De Lanerolle NC (2012) Loss of perivascular kir4.1 potassium channels in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 71: 814–825.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318267b5af>
14. Sandhu MRS, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Dhaher R, Deshpande K, Funaro MC, Lee T-SW, Zaveri HP, Eid T (2021) Astroglial Glutamine Synthetase and the Pathogenesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol* 12: 665334.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.665334>
15. Poletaeva II, Surina NM, Kostina ZA, Perepelkina OV, Fedotova IB (2017) The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav* 71: 130–141.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.072>
16. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108445>
17. Kulikov AA, Naumova AA, Dorofeeva NA, Ivlev AP, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2022) Dynamics of neurodegeneration in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats correlates with the progression of limbic seizures. *Epilepsy Behav* 134.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2022.108846>
18. Kulikov AA, Dorofeeva NA, Naumova AA, Harbachova EL, Glazova MV, Chernigovskaya EV (2020) Impaired postnatal development of the hippocampus of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy Behav* 113.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107526>
19. Chernigovskaya EV, Korotkov AA, Dorofeeva NA, Gorbacheva EL, Kulikov AA, Glazova MV (2019) Delayed audiogenic seizure development in a genetic rat model is associated with overactivation of ERK1/2 and disturbances in glutamatergic signaling. *Epilepsy Behav* 99.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106494>

20. *Matias I, Morgado J, Gomes FCA* (2019) Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci* 11: 59. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00059>
21. *Laug D, Huang TW, Bosquez Huerta NA, Huang AYS, Sardar D, Ortiz-Guzman J, Carlson JC, Arenkiel BR, Kuo CT, Mohila CA, Glasgow SM, Lee HK, Deneen B* (2019) Nuclear factor I-A regulates diverse reactive astrocyte responses after CNS injury. *J Clin Invest* 129: 4408–4418. <https://doi.org/10.1172/JCI127492>
22. *Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, Chakraborty C, Workman G, Weaver M, Sage EH, Barres BA, Eroglu C* (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E440–E449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104977108>
23. *Binder DK, Nagelhus EA, Ottersen OP* (2012) Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia* 60: 1203–1214. <https://doi.org/10.1002/glia.22317>
24. *Michalovicz LT, Kelly KA, Vashishtha S, Ben-Hamo R, Efroni S, Miller JV, Locker AR, Sullivan K, Broderick G, Miller DB, O'Callaghan JP* (2019) Astrocyte-specific transcriptome analysis using the ALDH1L1 bacTRAP mouse reveals novel biomarkers of astrogliosis in response to neurotoxicity. *J Neurochem* 150: 420–440. <https://doi.org/10.1111/jnc.14800>
25. *Beard E, Lengacher S, Dias S, Magistretti PJ, Finsterwald C* (2022) Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. *Front Physiol* 12: 2503. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.825816>
26. *Fei Y, Shi R, Song Z, Wu J* (2020) Metabolic Control of Epilepsy: A Promising Therapeutic Target for Epilepsy. *Front Neurol* 11: 592514. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.592514>
27. *Khatibi VA, Salimi M, Rahdar M, Rezaei M, Nazari M, Dehghan S, Davoudi S, Raoufy MR, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Hosseinmardi N, Behzadi G, Janahmadi M* (2023) Glycolysis inhibition partially resets epilepsy-induced alterations in the dorsal hippocampus-basolateral amygdala circuit involved in anxiety-like behavior. *Sci Rep* 13: 6520. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33710-1>
28. *Cañete-Soler R, Reddy KS, Tolan DR, Zhai J* (2005) Aldolases A and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J Neurosci* 25: 4353–4364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0885-05.2005>
29. *Slemmer JE, Haasdijk ED, Engel DC, Plesnila N, Weber JT* (2007) Aldolase C-positive cerebellar Purkinje cells are resistant to delayed death after cerebral trauma and AMPA-mediated excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 26: 649–656. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05708.x>
30. *Staugaitis SM, Zerlin M, Hawkes R, Levine JM, Goldman JE* (2001) Aldolase C/zebrin II expression in the neonatal rat forebrain reveals cellular heterogeneity with in the subventricular zone and early astrocyte differentiation. *J Neurosci* 21: 6195–6205. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06195.2001>
31. *Magi S, Piccirillo S, Amoroso S, Lariccia V* (2019) Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. *Int J Mol Sci* 20: 5674. <https://doi.org/10.3390/ijms20225674>
32. *Todd AC, Hardingham GE* (2020) The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 21: 9607. <https://doi.org/10.3390/ijms21249607>
33. *Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K* (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* (80) 276: 1699–1702. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1699>
34. *Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Pretorius JK, Dehnes Y, Danbolt NC, Nelson N, Leite JP, Chimelli L, Born DE, Sakamoto AC, Assirati JA, Fried I, Peacock WJ, Ojemann GA, Adelson PD* (1999) Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 52: 453–472. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.3.453>
35. *Tessler S, Danbolt NC, Faull RLM, Storm-Mathisen J, Emson PC* (1999) Expression of the glutamate transporters in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 88: 1083–1091. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00301-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00301-7)
36. *Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Rundén-Pran E, Lai JCK, Malthankar G V., Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, De Lanerolle NC* (2004) Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363: 28–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15166-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15166-5)
37. *Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MGA, Schrama LH, Van Veelen CWM, Van Rijen PC, Van Nieuwenhuizen O, Gispén WH, De Graan PNE* (2002) Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125: 32–43. <https://doi.org/10.1093/brain/awf001>
38. *Liu J, Feng X, Wang Y, Xia X, Zheng JC* (2022) Astrocytes: GABAceptive and GABAergic Cells in the Brain. *Front Cell Neurosci* 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.892497>
39. *Ishibashi M, Egawa K, Fukuda A* (2019) Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int J Mol Sci* 20: 2964. <https://doi.org/10.3390/ijms20122964>
40. *Anlauf E, Derouiche A* (2013) Glutamine Synthetase as an Astrocytic Marker: Its Cell Type and Vesicle Localization. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>
41. *Eid T, Behar K, Dhaher R, Bumanglag A V., Lee T-SW* (2012) Roles of Glutamine Synthetase Inhibition in Epilepsy. *Neurochem Res* 37: 2339–2350. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0766-5>
42. *Bernstein H-G, Tausch A, Wagner R, Steiner J, Seeleke P, Walter M, Dobrowolny H, Bogerts B* (2013) Disruption of

Glutamate-Glutamine-GABA Cycle Significantly Impacts on Suicidal Behaviour: Survey of the Literature and Own Findings on Glutamine Synthetase. *CNS Neurol Disord – Drug Targets* 12: 900–913.
<https://doi.org/10.2174/18715273113129990091>

43. Lee TS, Eid T, Mane S, Kim JH, Spencer DD, Ottersen OP, de Lanerolle NC (2004) Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy.

Acta Neuropathol 108: 493–502.
<https://doi.org/10.1007/s00401-004-0910-7>

44. Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT (2006) Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia* 53: 631–636.
<https://doi.org/10.1002/glia.20318>

ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL STATE OF ASTROGLIA IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS GENETICALLY PRONE TO AUDIOGENIC SEIZURES

Y. S. Grigorieva^a, A. A. Naumova^a, S. D. Nikolaeva^a, and M. V. Glazova^{a, #}

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

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

It was shown that abnormalities in astrocyte functions can cause alterations in neuronal excitability and promote the development of epilepsy, however, this question claims further investigation. The aim of the present work was to analyze the functional state of astrocytes in the hippocampus of Krushinsky-Molodkina (KM) rats genetically predisposed to the reflex audiogenic seizures. Adult naïve animals with fully-established audiogenic sensitivity were recruited in our experiments. Rats of parental Wistar strain were used as a control. Obtained results revealed unchanged protein expression of such astocytic markers as GFAP, ALDH1L1, and NFIA suggesting the absence of the reactive astrogliosis in the hippocampus of KM rats. SPARC and aquaporin 4 expression also did not differ from the control indicating no violations in astroglia regulation of synaptogenesis and water balance. Analysis of glial proteins responsible for reuptake and metabolism of neurotransmitters revealed normal expression of GABA transporter GAT-3 and glutamine synthetase, while glutamate transporters EAAT1 and 2 were significantly elevated pointing on enhanced activity of glutamate removal from synapses. In addition, decreased expression of the key glycolytic enzyme aldolase C, probably, indicated insufficient activity of glucose metabolism in astrocytes. Thus, obtained data pointed on genetically determined alterations of astroglia functions in the hippocampus of rats with inherited reflex epilepsy.

Keywords: astrocytes, audiogenic seizures, hippocampus, Krushinsky-Molodkina rats, epilepsy

КОРРЕКЦИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ И СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ГИППОКАМПЕ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА С ПОМОЩЬЮ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ ИНСУЛИНА И ГАНГЛИОЗИДОВ

© 2023 г. И. О. Захарова^{1,*}, Л. В. Баюнова¹, К. В. Деркач¹, А. О. Шпаков¹, Н. Ф. Аврова¹

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

*e-mail: zakhar@iephb.ru

Поступила в редакцию 28.07.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Инсулин контролирует не только системный гомеостаз глюкозы, но и функциональную активность мозга. При сахарном диабете 2-го типа (СД2) в мозге снижаются содержание инсулина и активность инсулиновой сигнальной системы. Это приводит к нарушению энергетического обмена, включая гипометаболизм глюкозы в мозге, и к когнитивным дисфункциям. Для компенсации недостатка гормона в мозге может быть использован интраназально вводимый инсулин (ИВИ). В целях повышения эффективности ИВИ для коррекции функций мозга целесообразно его комбинированное применение с веществами, наделенными свойствами нейропротекторов, в том числе со сложными гликофинголипидами ганглиозидами. Для доставки ганглиозидов в мозг также может быть использовано их интраназальное введение (ИБГ). Целью работы было оценить эффективность отдельных и совместных интраназальных введений инсулина и ганглиозидов для коррекции когнитивных нарушений у крыс Wistar с СД2, для чего использовали водный лабиринт Морриса (ВЛМ) и анализ в гиппокампе экспрессии белков (BDNF, GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4, GFAP, PSD95) и активности протеинкиназ (Akt, GSK3 β , ERK1/2), вовлеченных в процессы обучения и формирования долговременной памяти. ИВИ и ИБГ при введении крысам с СД2 улучшали пространственную ориентацию в ВЛМ, причем эффект совместного использования ИВИ и ИБГ был сходным с таковым при их раздельном применении. При совместном введении ИВИ и ИБГ отмечали сохранение активности эффекторных протеинкиназ (Akt и ERK1/2), в то время как при монотерапии ИВИ уровень их фосфорилирования был снижен. При комбинированной терапии также увеличивалось фосфорилирование GSK3 β по Ser⁹, защищающее нейроны от тауропатии. Таким образом, совместное применение ИВИ и ИБГ улучшает функциональное состояние компонентов инсулиновой системы в мозге крыс с СД2, хотя значительно не усиливает эффекты ИВИ на показатели долговременной памяти.

Ключевые слова: инсулин, ганглиозиды, интраназальное введение, гиппокамп, когнитивные функции, сигнальные пути, сахарный диабет 2-го типа

DOI: 10.31857/S0044452923060104, **EDN:** GKANFO

ВВЕДЕНИЕ

Инсулин контролирует не только системный гомеостаз глюкозы, но и функциональную активность мозга, а следовательно, и функции ЦНС, осуществляя регуляторные влияния на молекулярном, клеточном и поведенческом уровнях [1–3]. В настоящее время мозг стали причислять к инсулин-чувствительным органам, так как инсулиновые рецепторы и другие компоненты инсулиновой сигнальной системы экспрессируются и функционально активны во многих структурах мозга, включая обонятельные луковицы, гипоталамус, гиппокамп, мозжечок, амигдалу, кору [4, 5]. Если контроль метаболизма глюкозы, пищевого поведения

и энергетического обмена в основном обусловлен взаимодействием инсулина с нейронами гипоталамуса, то нейротрофические и нейромодуляторные эффекты инсулина связывают с его взаимодействием с экстра-гипоталамическими структурами, включая гиппокамп [6–10].

Состояние устойчивой постпрандиальной гиперинсулинемии является предвестником инсулиновой резистентности (ИР), невосприимчивости клеток к действию гормона, что характерно для ожирения, сахарного диабета 2-го типа (СД2), а также для сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, являющихся осложнениями метаболического синдрома [11]. Развитие ИР наблюдается не только на периферии, но и в ЦНС. При мета-

болических расстройствах отмечается также усиленная деградация инсулина, в которую вовлечен инсулин-деградирующий фермент (IDE), который, наряду с инсулином, расщепляет β -амилоидный пептид (A β). По мнению ряда авторов, нарушения в утилизации A β , возникающие из-за насыщения IDE инсулином в условиях гиперинсулинемии и ИР, приводят к накоплению A β и его последующей агрегации с образованием амилоидных бляшек [12, 13]. В этой связи становится понятным, почему при метаболическом синдроме и СД2 значительно чаще наблюдаются когнитивные расстройства, которые после прогрессирования диагностируются как деменция или болезнь Альцгеймера [4, 14, 15].

Если метаболический синдром и СД2 характеризуются повышенным содержанием инсулина в крови, то в мозге наблюдается его недостаток, вызванный ослаблением рецептор-опосредованного транспорта инсулина через гематоэнцефалический барьер [16–18]. Учитывая важность инсулинового сигналинга для таких основополагающих процессов, как рост и дифференцировка нейронов и синаптическая трансмиссия, имеются все основания полагать, что функциональные нарушения, вызванные снижением содержания инсулина в мозге или ослаблением активности инсулиновой системы в нейронах, будут приводить к нейродегенеративным расстройствам [4, 5]. Влияние инсулина на транспорт глюкозы в клетках мозга имеет существенные отличия от такового на периферии, поскольку инсулин-зависимый транспортер глюкозы 4-го типа (GLUT-4) экспрессируется в нейронах мозга в незначительных количествах [19, 20]. Нейрональный транспортер глюкозы GLUT-3 и астроцитарный транспортер GLUT-1, напротив, доминируют в мозге по сравнению с периферическими тканями. При этом показано, что инсулин и структурно родственному ему инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) способны вызывать транслокацию переносчика глюкозы GLUT-1 в астроцитах в результате стимуляции ими митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) и протеинкиназы D, что может иметь большое значение для регуляции метаболизма глюкозы в мозге [21–23]. На фоне ИР снижается скорость утилизации глюкозы клетками мозга, что приводит к состоянию гипометаболизма, наблюдаемому при СД2 и нейродегенеративных заболеваниях [24]. Когнитивные расстройства также рассматриваются как одно из проявлений нарушений метаболизма глюкозы.

Взаимосвязь между содержанием инсулина в мозге и формированием памяти наиболее наглядно проявляется при СД 1-го типа, когда дефицит гормона обусловлен нарушением синтеза в клетках поджелудочной железы. Так, в условиях пролонгированного, шестимесячного СД1, вызываемого инъекциями средних доз стрептозотоцина взрослым самцам крыс, у них развиваются отчетливо выраженные нарушения когнитивных функций

[25]. Компенсировать недостаток инсулина в мозге с благоприятным влиянием на процессы обучения и без риска развития гипогликемических состояний удастся путем интраназальных введений гормона, что широко используется не только в экспериментальной практике на животных, но и в клинике при лечении болезни Альцгеймера, мягкого когнитивного дефицита и некоторых форм диабетической энцефалопатии [25–28]. Поскольку СД2 имеет достаточно сложную этиологию, включающую воспалительные процессы, окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию, амилоидогенез, представляет интерес использование комбинаций препаратов, наделенных нейропротекторными, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, для коррекции нарушений функций ЦНС, в том числе когнитивных, а также нормализации церебрального сигналинга [29]. Среди соединений природного происхождения, обладающих как нейропротекторными, так и противовоспалительными свойствами, следует выделить ганглиозиды [30–34]. Они хорошо растворяются и в водных растворах, и в полярных органических растворителях, поскольку обладают амфифильной природой. Для быстрой адресной доставки ганглиозидов в мозг, как и в случае инсулина, может быть использован интраназальный способ введения. Можно ожидать, что многофункциональные по своему фармакологическому профилю ганглиозиды усилят действие инсулина в ЦНС при СД2.

Основная цель работы состояла в оценке эффективности отдельных и совместных интраназальных введений инсулина и ганглиозидов для коррекции когнитивных нарушений у крыс линии Wistar с СД2, для чего использовали водный лабиринт Морриса с последующим анализом в гиппокампе уровня экспрессии белков и активности протеинкиназ, вовлеченных в процессы обучения и формирования долговременной памяти.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка препаратов для интраназальных инъекций. Ганглиозиды экстрагировали из мозга теленка по методу, разработанному Фолчем, как описано нами ранее [35]. Выделенные суммарные глико-сфинголипиды дополнительно очищали на колонках Sephadex G-25 “Fine” (“Pharmacia”, Швеция) [36]. Для количественной оценки содержания глико-сфинголипидов использовали специфическую реакцию сиаловых кислот с резорциновым реагентом. Полученный препарат ганглиозидов после упаривания растворяли в физиологическом растворе до концентрации 1 мг/10 мкл. Инсулин (#I5500, “Sigma”, США), используемый для интраназального введения, растворяли в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.5, до концентрации 0.5 МЕ/20 мкл. Совместное интраназальное введение инсулина и ганглиозидов проводилось с разницей в 10 мин.

Экспериментальная модель диабета. Самцы линии Wistar в возрасте двух месяцев использовались для моделирования СД2, индуцируемого высокожировой диетой (ВЖД), описанной нами ранее [37], и однократной инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (20 мг/кг), вводимого в/б через 11 нед после перевода животных на ВЖД (рис. 1). Результаты глюкозотолерантного теста, проведенного через 4 нед после введения стрептозотоцина, показали, что у животных развилась среднетяжелая форма СД2 с выраженными нарушениями толерантности к глюкозе. Животные четырех контрольных групп получали стандартный корм и однократную инъекцию 0.1 М натрий-цитратного буфера (рН 4.5) вместо стрептозотоцина. Из крыс с подтвержденным СД2 были сформированы 4 группы. В течение последующих 4 нед, как представлено на схеме рис. 1, проводились однократные ежедневные интраназальные введения следующих препаратов: Группа 1 (Контроль, **К**) — физиологический раствор, Группа 2 (Контроль, Инсулин, **КИ**) — инсулин (0.5 МЕ/крысу), Группа 3 (Контроль, Ганглиозиды, **КГ**) — ганглиозиды (6 мг/кг), Группа 4 (Контроль, Ганглиозиды + Инсулин, **КГИ**) — ганглиозиды (6 мг/кг) + инсулин (0.5 МЕ/крысу), Группа 5 (Диабет, **Д**) — физиологический раствор, Группа 6 (Диабет + Инсулин, **ДИ**) — инсулин (0.5 МЕ/крысу), Группа 7 (Диабет + Ганглиозиды, **ДГ**) — ганглиозиды (6 мг/кг), Группа 8 (Диабет + Ганглиозиды + Инсулин, **ДГИ**) — ганглиозиды (6 мг/кг) + инсулин (0.5 МЕ/крысу). Все процедуры по работе с животными проводили в соответствии с утвержденным Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных протоколом-заявкой ИЭФБ РАН (Протокол № 1-11/2022 от 27.01.2022 г.) и требованиями, предусмотренными European Communities Council Directive 1986 и изложенными в Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010. По окончании эксперимента животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг массы тела, “Sigma”, США), осуществляли декапитацию, извлекали мозг для дальнейшего выделения необходимых структур. Образцы гиппокампа замораживали на сухом льду сразу после извлечения и хранили в холодильнике при -80°C для последующей оценки содержания интересующих белков и их фосфорилированных форм методом Вестерн блоттинга и изучения экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.

Глюкозотолерантный тест. За два дня до окончания лечения эффективность проводимой терапии оценивалась с помощью орального глюкозотолерантного теста (оГТТ), для чего крысам перорально через зонд вводили глюкозу (2 г/кг), уровень которой в крови измеряли затем в течение 120 мин с помощью глюкометра и тест-полосок “One Touch Ultra” (США).

Иммуноферментный анализ. Уровень инсулина в плазме крови оценивали, используя набор “Rat In-

sulin ELISA kit” (“Mercodia”, Швеция) в соответствии с инструкцией производителя.

Поведенческий тест “Водный лабиринт Морриса”. Изучение пространственной памяти у крыс контрольных и диабетических групп проводили в водном лабиринте Морриса (ВЛМ). Подопытные животные во время заплывов должны были найти платформу диаметром 15 см, скрытую под водой и находящуюся на 1–2 см ниже ее уровня. Для этого использовался бассейн диаметром 150 см и высотой 70 см, заполненный водой с температурой $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Чтобы скрыть положение платформы, воду подкрашивали молоком. Первую тренировку проводили через 2 нед после начала интраназальных введений препаратов и повторяли в течение пяти последующих дней по 4 попытки в день для каждой особи. Для пространственной ориентации на внутренней стенке бассейна каждое направление (север, юг, запад, восток) маркировалось картинками с изображением различных знаков (круг, квадрат, треугольник или крест). В каждой попытке, длившейся 60 с, животное запускалось с различных стартовых точек. В том случае, если платформа не была обнаружена за 60 с, крысу рукой направляли к цели. После нахождения платформы животным предоставлялось 15 с для запоминания ее местоположения. На 2-й неделе испытаний положение платформы менялось, чтобы оценить способность особей к переобучению. Ежедневные интраназальные введения в периоды обучения и переобучения, длившиеся в совокупности 2 нед, проводились по окончании заплывов. Трассировка перемещения испытуемых животных регистрировались на веб-камеру для последующего анализа в программе “AnyMaze”. Для каждого показателя (латентный период нахождения платформы, длина пути или дистанция, скорость плавания) суммировались значения четырех попыток, на основании которых строились графики изменения данного параметра от времени обучения для каждой особи. Для обобщения данных рассчитывались площади под кривыми (AUC), которые использовались для представления полученных результатов.

Вестерн блоттинг. Кусочки гиппокампа гомогенизировали в соотношении 1:20 в лизисном буфере 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% дезоксихолат натрия, 15 mM NaF, 10 mM глицерофосфат натрия, 10 mM пироглицилат натрия, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM фенолметилсульфонил фторид (PMSF), 0.02% NaN_3 и протеазный ингибиторный коктейль (“Roche”, Швейцария). Клеточные фрагменты и неразрушенные клетки осаждали центрифугированием $500 \text{ g} \times 10 \text{ мин}$ ($+4^{\circ}\text{C}$). Концентрацию белка в пробах измеряли по модифицированному методу Лоури. Для вертикального электрофореза в камерах Mini-Protean (“Bio-Rad”, США) на 8–14% акриламидные гели загружали пробы, содержащие

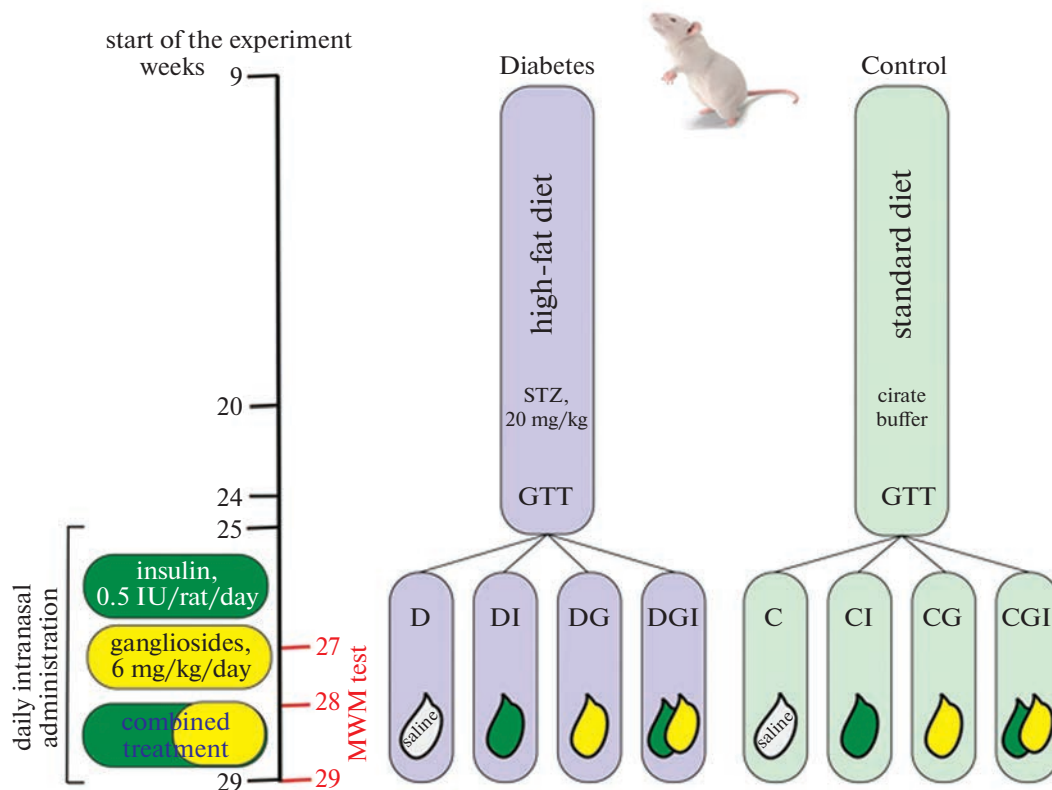


Рис. 1. Схема эксперимента по изучению эффективности отдельных и совместных интраназальных введений инсулина (ИВИ, 0.5 МЕ/крысу/сутки) и ганглиозидов (ИВГ, 6 мг/кг/сутки) для коррекции когнитивных нарушений у крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Обозначения групп на схеме: группа 1 (C) – контроль (К), группа 2 (CI) – контроль + инсулин (КИ), группа 3 (CG) – контроль + ганглиозиды (КГ), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). MWM – водный лабиринт Морриса.

25–30 мкг белка. В качестве стандарта молекулярного веса использовали окрашенные маркеры “Spectra Multicolour Broad Range Protein Ladder (10–260 кДа)” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 μ M, “Amersham”, Великобритания) методом мокрого переноса осуществлялся в минитранс-блоттере (“Bio-Rad”, США) в буфере 25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 20% этанола (v/v) при постоянном напряжении 100 V. Для блокировки сайтов неспецифического связывания мембраны инкубировались 30 мин при комнатной температуре в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 5% обезжиренного молока (“Европек”, Россия), 0.1% Tween 20. Для взаимодействия с растворами первичных антител мембраны оставляли на ночь при +4°C на шейкере MR-1 (“Biosan”, Латвия). Первичные антитела разводились в большинстве случаев в 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 5% БСА-V фракция (“Amresco”, США), 0.1% Tween 20 в соотношении (1:1000). Антитела для pAkt(Ser⁴⁷³) (#4058), Akt (#9272), pGSK3 β (Ser⁹) (#9322), GSK3 β (#9315), total ERK1/2 (#9102), PSD95 (#3450) были приобретены у компании “Cell Signaling Technolo-

gy” (США), anti-phospho-ERK1 (pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴) & ERK2 (pThr¹⁸⁶/pTyr¹⁸⁷) (#E7028) – у компании “Sigma” (США), GLUT1 (#M00163) – у компании “Boster” (США), GFAP (#NBP1-05197), IL-6 (#DF6087) – у компании “Affinity Biosciences” (Китай), GAPDH (#NB600-502) – у компании “Novus Biologicals” (США). После 3-х кратной промывки буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl (pH 7.6), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, мембраны покрывали растворами вторичных антител, приготовленными на 5%-ном обезжиренном молоке в том же буфере, для 1 ч инкубации при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи (#7074) или анти-мышинные (#7076) IgG (“Cell Signaling Technology”, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), либо биотинилированные IgG(H+L) (#14708) и (#14709). Сигнал HRP усиливали коммерческим ECL (“Novex”, США) или аналогом ECL, приготовленным в лабораторных условиях (люминол – *para*-кумаровая кислота – H₂O₂). Хемилюминесцентное свечение фиксировали на голубой фотопленке (“Phenix”, “Research Products”, США). Для нормализации данных мембраны после стриппинга проводили реакцию

на GAPDH. Проявленные фотопленки визуализировали на сканере “Canon” (“CanoScan 8800F”, США). Денситометрическая обработка данных проводилась с помощью программы Bio7.

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимических исследований фиксация мозга проводилась в течение 6 дней в 4%-ном растворе *para*-формальдегида, разбавленном 0.02 М Na^+ -фосфатным буфером (+4°C). Для промывки использовали 0.02 М фосфатный буфер (PBS, pH 7.4) с 0.9%-ным NaCl. В целях криопротекции мозг выдерживал 7 дней в 30%-ном растворе сахарозы в PBS, после чего замораживали. Из области гиппокампа получали чередующиеся серии фронтальных срезов (16 мкм) с помощью криостата (“Leika”, Германия). Каждый десятый срез монтировали на стекла “Super-Frost/plus” (“Menzel”, Германия). Стекла кипятили в цитратном буфере (pH 6.0) 5 мин для демаскировки антигена, промывали в PBS. Чтобы блокировать эндогенную пероксидазу, препараты 30 мин обрабатывали 0.3%-ным раствором перекиси водорода, разведенной в PBS. После промывки в PBS, содержащем 0.1% Triton X-100 (PBST), срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в блокирующем растворе (2% сыворотки быка и 2% сыворотки козы в PBST) для предотвращения неспецифического связывания, затем еще 12 ч при комнатной температуре с первичными антителами анти-BDNF (#DF6387, “Affinity Biosciences”, Китай) в разведении 1:100. После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами козы против кролика, конъюгированными с биотином (“VectorLabs”, Великобритания) и разведенными (1:600) на PBST. После промывки на стекла наносили комплекс стрептавидин-пероксидаза (“Sigma”, США) в разведении (1:700) в PBS. Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина (“Sigma”, США) и 0.015%-ного раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали. Изображения получали с помощью микроскопа “Carl Zeiss Axio A1” (“Zeiss”, Германия) со встроенной телевизионной камерой “AxioCam 712 color” (“Zeiss”, Германия) и программы ZEN 3.4 (Zen pro). Оптическую плотность иммунопозитивных структур измеряли с помощью программы Bio7 (США) и представляли в условных единицах.

Статистическая обработка. Анализ полученных данных проводили с помощью программы “Prism”. Результаты представляли как среднее значение $\pm$ SEM. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты оГТТ по AUC_{0–120} (глюкоза) и чувствительности тканей к инсулину по AUC_{0–120} (инсу-

лин) проверялись также методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости $p < 0.05$. Достоверность различий по сравнению с контрольными крысами (К) обозначалась на графиках как: a – $p < 0.05$, b – $p < 0.02$; c – $p < 0.001$. Достоверность различий по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) обозначалась на графиках как: d – $p < 0.05$, e – $p < 0.02$; f – $p < 0.001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание животных на ВЖД в течение 5 мес в совокупности с однократным введением низкой дозы стрептозотоцина (20 мг/кг, в/б) приводило к развитию СД2, для которого характерны нарушения толерантности к глюкозе и снижение чувствительности тканей к действию инсулина, что подтверждают результаты глюкозотолерантного теста (ГТТ) и уровни инсулина в плазме крови при нагрузке глюкозой (рис. 2). У крыс диабетической группы (Д) на 34% ($F_{(5, 48)} = 19.265$, $p < 0.0001$) увеличилось значение интегрированной площади AUC_{0–120} для глюкозных кривых (рис. 2a) и на 73% ($F_{(5, 23)} = 3.9716$, $p = 0.01$) значение интегрированной площади AUC_{0–120} для инсулиновых кривых в ГТТ (рис. 2b) по сравнению с таковыми в контрольной группе (К). Это означает, что, начиная с уровней глюкозы и инсулина в крови натощак, до их концентрации после нагрузки глюкозой через 15, 30, 60 и 120 мин, показания для крыс из диабетической группы были значимо выше, чем у животных из группы контроля.

Для коррекции метаболических и биохимических нарушений использовалась монотерапия в виде интраназальных введений инсулина (0.5 МЕ/крысу, ИВИ) или суммарных ганглиозидов мозга теленка (6 мг/кг, ИВГ), а также совместные введения ИВИ и ИВГ в указанных дозах в течение 4 нед. Поскольку у крыс контрольных групп с введениями только инсулина (КИ) или одних ганглиозидов (КГ) уровень глюкозы натощак достоверно не отличался от показателей контрольной группы (К), ГТТ проводился только для группы, получавшей совместно ИВИ и ИВГ (группа КГИ). Через 4 нед у диабетических животных после ИВИ и ИВГ, как отдельных, так и совместных, полностью восстанавливалась чувствительность тканей к инсулину, о чем свидетельствует отсутствие значимых различий между группой контроля (К) и группами ДИ, ДГ и ДГИ (рис. 2b) соответственно. В то же время толерантность к глюкозе полностью восстанавливалась только у крыс в группе ДГИ после обработки совместно ИВИ и ИВГ, что подтверждает нивелирование различий AUC_{0–120} для глюкозных кривых между группами К и ДГИ. Более того, между группами ДГИ и Д различия становились значимыми ($p < 0.001$). Следует отметить, что после раз-

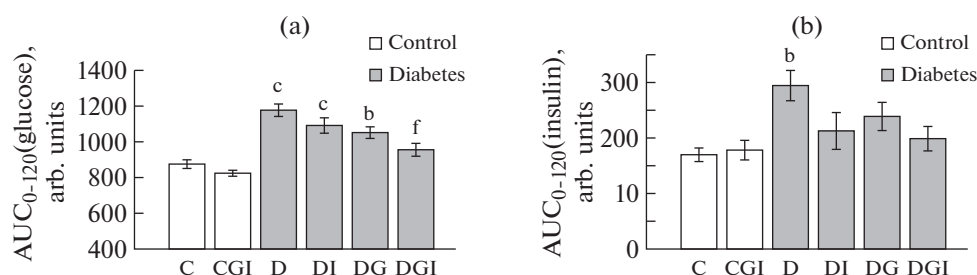


Рис. 2. Оценка влияния интраназально вводимого инсулина (ИВИ, 0.5 МЕ/крысу/сутки) и ганглиозидов (ИВГ, 6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на уровни глюкозы и инсулина в крови крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, при проведении орального глюкозотолерантного теста. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). (a) – AUC₀₋₁₂₀, интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы (мМ) – время (мин)” для глюкозных кривых в течение 120 мин после нагрузки глюкозой. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 9$). (b) – AUC₀₋₁₂₀, интегрированная площадь под кривой “концентрация инсулина (нг/мл) – время (мин)” для инсулиновых концентрационных кривых в течение 120 мин после нагрузки глюкозой. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 5$). Достоверность различий проверялась методом дисперсионного анализа ANOVA. Различия значимы по сравнению с контрольными крысами (К) при: b – $p < 0.02$; c – $p < 0.001$. Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) при: f – $p < 0.001$.

дельных ИВИ и ИВГ наблюдались изменения в скорости поглощения глюкозы тканями, но они не достигали показателей контрольной группы (рис. 2а).

Для изучения влияния метаболических нарушений на когнитивные функции у экспериментальных животных исследовали способность к пространственному обучению (1-я сессия) и переобучению (2-я сессия) в водном лабиринте Морриса. Различия между группами в большей мере проявились в таком показателе, как длина пути от места старта до платформы (рис. 3а,б). Поскольку в первый день обучения всем животным требовалась помощь в нахождении платформы, различия между контрольной группой (К) и группой с СД2 без лечения (Д) не были выявлены. Однако, начиная со 2-го дня и до конца обучения в первой сессии, крысы из группы Д без лечения двигались по более длинной траектории в поисках платформы в целевом квадранте по сравнению с контролем (рис. 3б), причем все различия были значимыми. Тестирование животных контрольных групп показало улучшение когнитивных функций у крыс после введения одного инсулина в группе КИ, но эффект проявился только на 2-й, 4-й и 5-й дни. У животных с СД2 после раздельных и совместных ИВИ и ИВГ наблюдалось улучшение пространственной ориентации, благодаря которой они совершали перемещение по оптимальной траектории. При этом лишь на 5-й и 6-й дни эффект в группе ДГИ при комбинированном применении препаратов был более выраженным ($p < 0.02$ по отношению к группе Д) по сравнению с введением одного инсулина в группе ДИ ($p < 0.05$ по отношению к группе Д). Несмотря на то что ганглиозиды модулируют активность тирозинкиназных рецепторов ростовых факторов, достоверные изменения при СД2 в группе

ДГ не были постоянными, а проявились лишь в отдельные дни (1-й и 4-й).

Итоги пространственного обучения по нахождению платформы в целевом квадранте, суммирующие результаты заплывов всех дней, представлены также в виде интегрированной площади под кривой (AUC) “латентное время – дни (1–6)” и “длина пути – дни (1–6)” (табл. 1). При метаболических нарушениях животным требуется больше времени для решения задач по навигации (130.4 ± 7.9 усл. ед. для СД2 без лечения против 101.7 ± 6.7 усл. ед. для контроля, $p < 0.05$), поскольку увеличивается траектория движения (24.1 ± 1.5 усл. ед. для СД2 против 18.9 ± 1.5 усл. ед. для контроля, $p < 0.05$). Измерение средней скорости перемещения показало, что животные всех групп двигались с одинаковой скоростью (табл. 1). По совокупности полученных данных можно сделать вывод, что пространственная ориентация улучшалась благодаря ИВИ и ИВГ. Однако при совместных ИВИ и ИВГ она оставалась на том же уровне, что и при раздельном введении препаратов.

Для переобучения (2-я сессия) платформа перемещалась в противоположный целевой квадрант. В ходе переобучения значимых стабильных различий, проявляющихся в течение нескольких дней, между контрольной и диабетическими группами выявить не удалось (рис. 3с, d и табл. 1), что, как мы полагаем, может быть обусловлено благотворным влиянием физических нагрузок в ходе выполнения ВЛМ на когнитивные функции у животных всех групп, в том числе с СД2. Следует отметить, что в ходе переобучения животные контрольной группы после ИВИ по итогам 6 дней показали способность к перемещению по более короткой траектории, что подтверждает более низкое значение инте-

Таблица 1. Влияние отдельных и совместных интраназальных введений инсулина (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ганглиозидов (6 мг/кг/сутки) животным контрольных групп и с СД2 на латентное время (AUC), длину пути (AUC) и скорость плавания в водном лабиринте Морриса

Группа	AUC (Латентное время-дни), усл. ед.	AUC (Дистанция до платформы-дни), усл. ед.	Скорость плавания, м/с
<i>Обучение с 1-го по 6-й день</i>			
К	101.7 ± 6.7	18.9 ± 1.5	0.168 ± 0.003
КИ	76.1 ± 5.4*	13.2 ± 1.3*	0.157 ± 0.007
КГ	110.6 ± 6.3	20.7 ± 1.8	0.163 ± 0.004
КГИ	89.0 ± 6.9	16.6 ± 2.2	0.159 ± 0.004
Д	130.4 ± 7.9**	24.1 ± 1.5*	0.164 ± 0.005
ДИ	108.0 ± 6.6 ^{x##}	18.2 ± 1.3 ^{xx#}	0.164 ± 0.004
ДГ	124.6 ± 10.2	19.9 ± 1.5	0.155 ± 0.004
ДГИ	110.5 ± 8.3	19.8 ± 1.3 ^x	0.156 ± 0.003
<i>Переобучение с 7-го по 12-й день</i>			
К	66.3 ± 4.3	11.8 ± 0.9	0.162 ± 0.003
КИ	53.2 ± 4.2	8.9 ± 0.9*	0.158 ± 0.005
КГ	56.0 ± 4.3	9.7 ± 0.9	0.162 ± 0.004
КГИ	73.0 ± 8.3	13.2 ± 2.3	0.157 ± 0.006
Д	76.9 ± 11.4	14.0 ± 2.1	0.168 ± 0.005
ДИ	82.2 ± 11.5	14.2 ± 1.7 [#]	0.168 ± 0.007
ДГ	84.3 ± 12.5	13.0 ± 2.0	0.153 ± 0.006
ДГИ	72.4 ± 5.6	12.7 ± 1.1	0.165 ± 0.005

Примечание. Данные представлены как среднее ± SEM ($n = 9$). Различия статистически значимы по t -тесту по сравнению с группой К при: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.02$. Различия статистически значимы по сравнению с группой Д при: ^x — $p < 0.05$, ^{xx} — $p < 0.02$. Различия статистически значимы по сравнению с группой КИ при: [#] — $p < 0.05$, ^{##} — $p < 0.02$.

гированной площади под кривой AUC “длина пути — дни (7–12)” по сравнению с контрольной группой без введений, хотя AUC “латентное время — дни (7–12)” между этими группами достоверно не отличаются.

Способность животных к обучению и формированию памяти определяется изменениями на уровне сигнальных и эффекторных систем мозга, которые инициируются в том числе различными ростовыми факторами, прежде всего нейротрофическим фактором мозга (BDNF). Положительное влияние ИВИ на когнитивные функции у крыс контрольной группы КИ может быть обусловлено увеличением содержания BDNF в иммунопозитивных клетках CA1 области гиппокампа с 0.42 ± 0.06 усл. ед. в контроле (К) до 0.64 ± 0.10 усл. ед. в группе КИ ($p < 0.001$) (рис. 4). Однако сравнение экспрессии BDNF в клетках гиппокампа крыс из диабетических групп (Д, ДИ, ДГ и ДГК) не выявило достоверных различий по сравнению с группой контроля (К). Несмотря на то что обработка совместно ИВГ и ИВИ также повышала уровень BDNF на срезах мозга группы КГИ, в ВЛМ-тесте более эффективную пространственную

ориентацию крысы из этой группы показали только в 1-й день обучения. По совокупности 4 попыток они двигались по более короткой траектории, чем группа контроля (К).

Для изучения причин когнитивных нарушений при СД2 представляло интерес сравнить экспрессию белков и активность ключевых протеинкиназ, участвующих в регуляции синаптической пластичности, в гиппокампе крыс контрольной группы (К) и крыс с СД2. Обучение представляет собой весьма энергозатратный процесс, в ходе которого нейроны активно поглощают глюкозу, которая поступает в клетки через глюкозный транспортер GLUT-3. В то же время большую часть глюкозы в мозге через GLUT-1 поглощают астроциты, где она метаболизируется и далее в виде лактата поступает в нейроны через астроцитарно-нейрональный лактатный челнок. Анализ экспрессии GLUT-1 в лизатах гиппокампа методом Вестерн блоттинга не выявил достоверных различий между изучаемыми группами (рис. 5а). Эти данные не согласуются с уровнем маркерного белка астроцитов GFAP, экспрессия которого снижается во всех группах с СД2, хотя

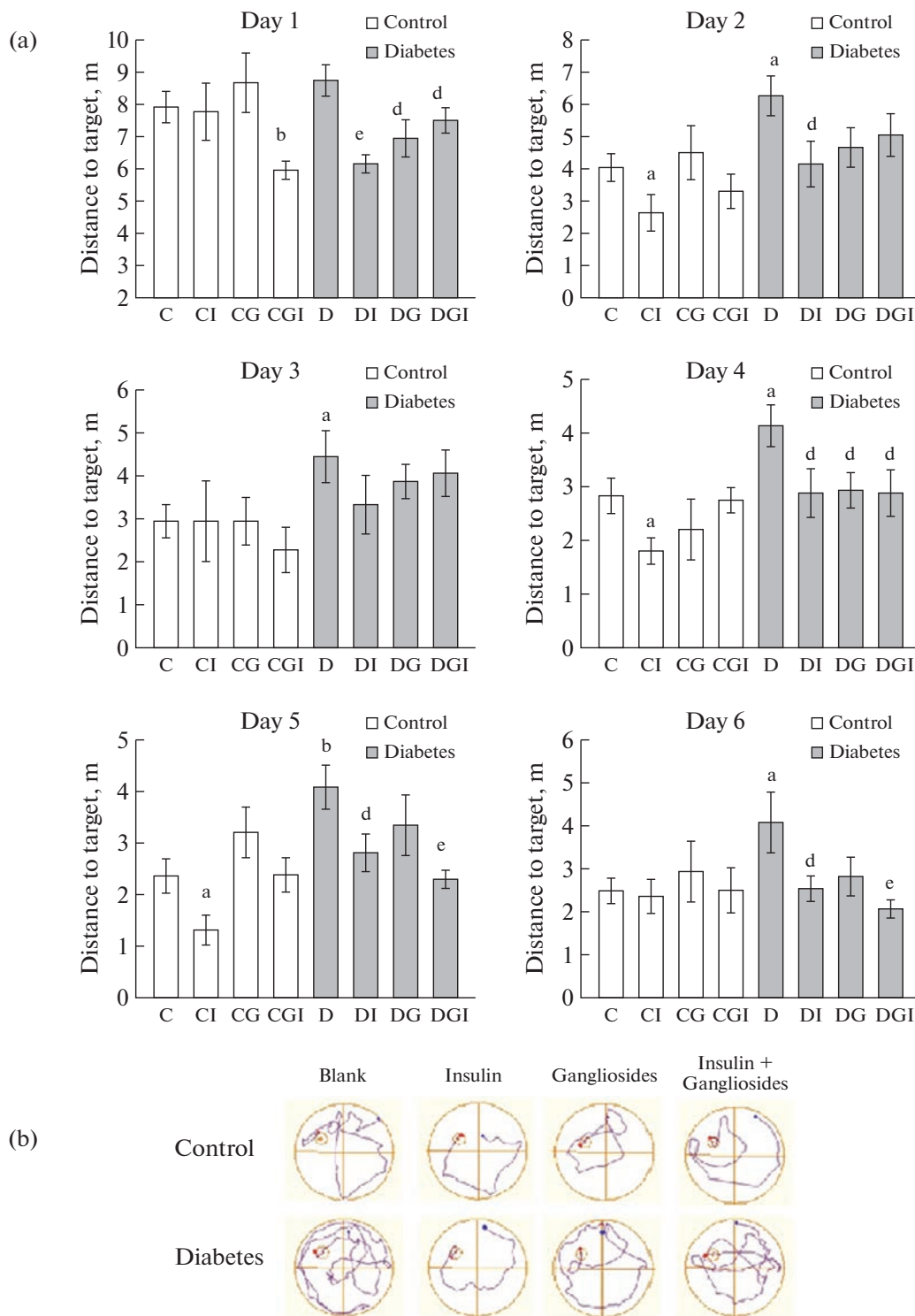


Рис. 3. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении контрольным крысам и крысам с СД2 на длину пути к платформе в ВЛМ при обучении и переобучении. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 2 (CI) – контроль + инсулин (КИ), группа 3 (CG) – контроль + ганглиозиды (КГ), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). (a) – Изменение длины пути от старта до платформы при обучении с 1-го по 6-й день. (b) – Пример траектории движения в период обучения (день 3). (c) – Изменение длины пути от старта до платформы при переобучении с 7-го по 12-й день. (d) – Пример траектории движения в период переобучения (день 9). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 9$). Различия статистически значимы по t -тесту по сравнению с группой К при: а – $p < 0.05$; б – $p < 0.02$. Различия статистически значимы по сравнению с группой Д при: d – $p < 0.05$; e – $p < 0.02$.

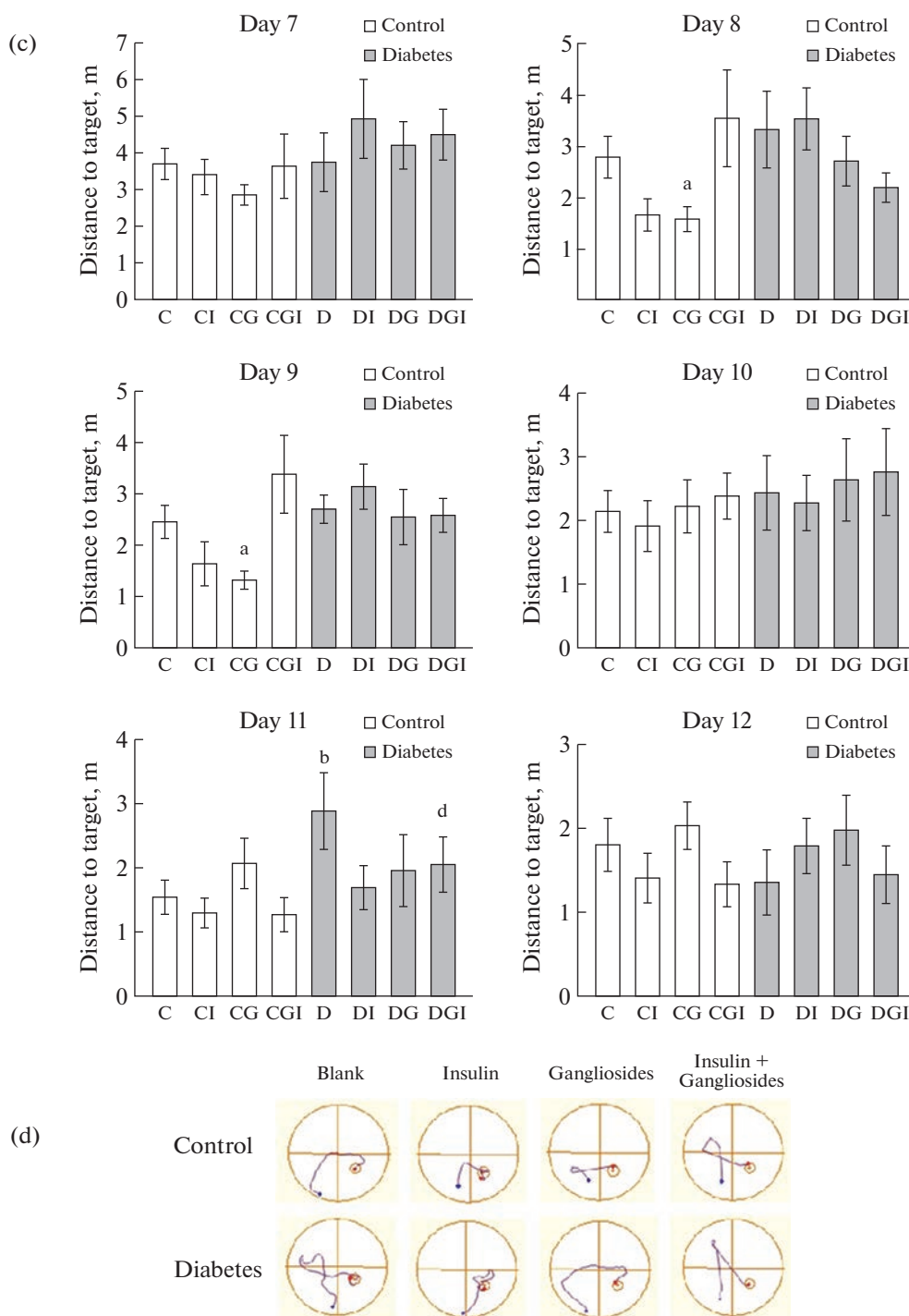


Рис. 3. Окончание.

значимыми по сравнению с контролем эти изменения были только у крыс с СД2 без лечения и после обработки ИВИ (рис. 5b). Анализ экспрессии белка постсинаптического уплотнения PSD-95, который выполняет важную роль в связывании рецепторов и закреплении их в синаптическом уплотнении, а также в связывании ферментов, регулирующих фосфо-

рилирование, нитрозилирование и другие модификации рецепторов, показал, что его содержание в гиппокампе не претерпевает изменений (рис. 5с).

На межнейронном уровне в основе таких феноменов, как обучение и память, лежит взаимодействие двух форм синаптической пластичности, а именно долговременной потенциации (LTP) и дол-

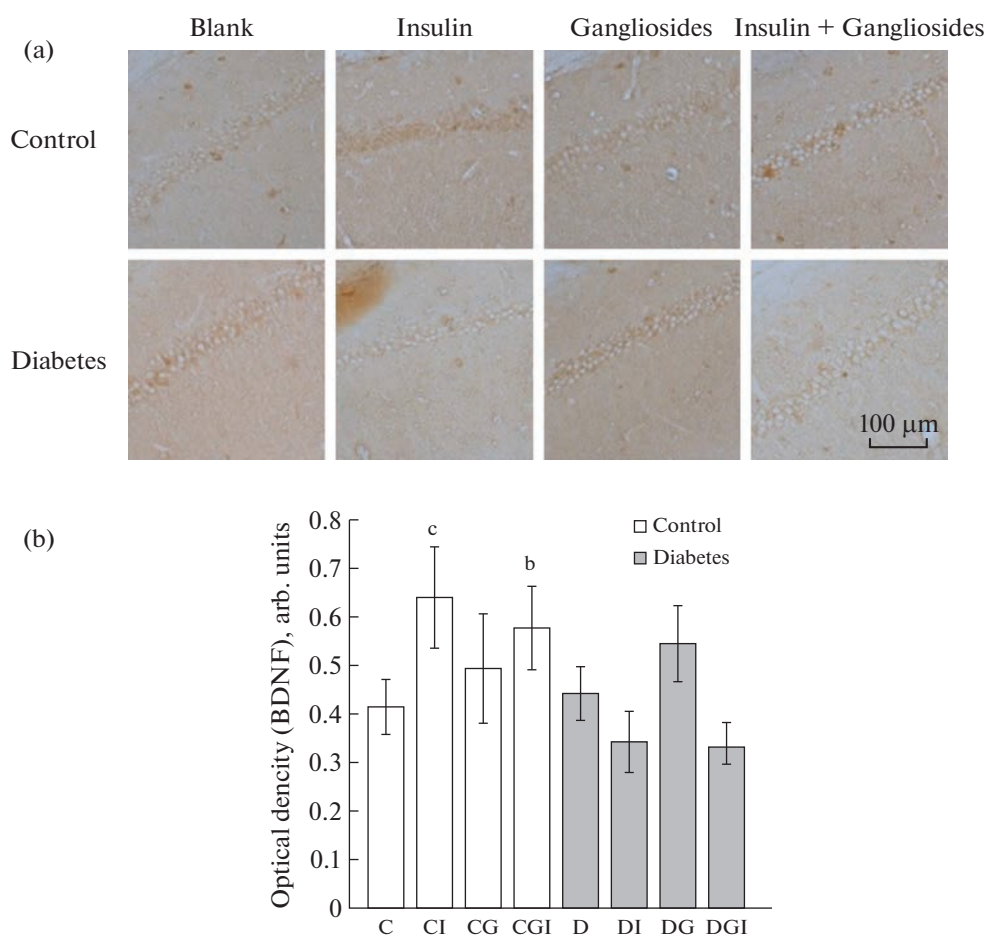


Рис. 4. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на экспрессию нейротрофического фактора мозга (BDNF) в CA1 области гиппокампа контрольных крыс и крыс с СД2. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 2 (CI) – контроль + инсулин (КИ), группа 3 (CG) – контроль + ганглиозиды (КГ), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). (a) – Экспрессия нейротрофического фактора BDNF, выявляемая по иммуногистохимической реакции со специфическим антителом. Масштаб – 100 мкм. (b) – Количественная оценка экспрессии BDNF. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Различия статистически значимы по *t*-тесту по сравнению с группой К при: b – $p < 0.02$, c – $p < 0.001$.

говременной депрессии (LTD), баланс между которыми модулируется серин/треониновыми протеинкиназами – Akt-киназой (протеинкиназой B) и киназой гликогенсинтетазы 3β (GSK3 β), нижележащей мишенью Akt-киназы. Поскольку одним из регуляторов функциональной активности этих протеинкиназ в мозге является инсулин, то представляло интерес провести оценку их активности при СД2 и в группах с лечением ИВИ с помощью специфических антител. Об активации Akt-киназы можно судить по ее фосфорилированию по остатку Ser⁴⁷³, в то время как основным сайтом для фосфорилирования в молекуле GSK3 β является расположенный недалеко от N-конца фермента остаток Ser⁹, фосфорилирование которого приводит к ингибированию фермента. Анализ лизатов гиппокампа методом Вестерн блоттинга показал, что по-

сле лечения диабетических крыс ИВИ (группа ДИ) уровень фосфорилирования Akt-киназы по остатку Ser⁴⁷³ значительно снижался по сравнению с контрольной группой (К) (рис. 6а). Однако в гиппокампе диабетических крыс после обработки с помощью ИВИ (группа ДИ) уровень фосфорилирования GSK3 β по остатку Ser⁹ не менялся, оставаясь на уровне значений в контрольной группе (К). В отличие от контрольных животных совместные введения инсулина и ганглиозидов оказывали значительное модулирующее влияние на фосфорилирование GSK3 β по остатку Ser⁹, вследствие чего содержание этой формы фермента в группе с СД2 (группа ДГИ) достоверно увеличивалось как по отношению к контролю, так и к группе с СД2 без лечения ($p < 0.02$) (рис. 6б). Если 3-фосфоинозитидный путь, включающий в качестве эффекторного компонента Akt-

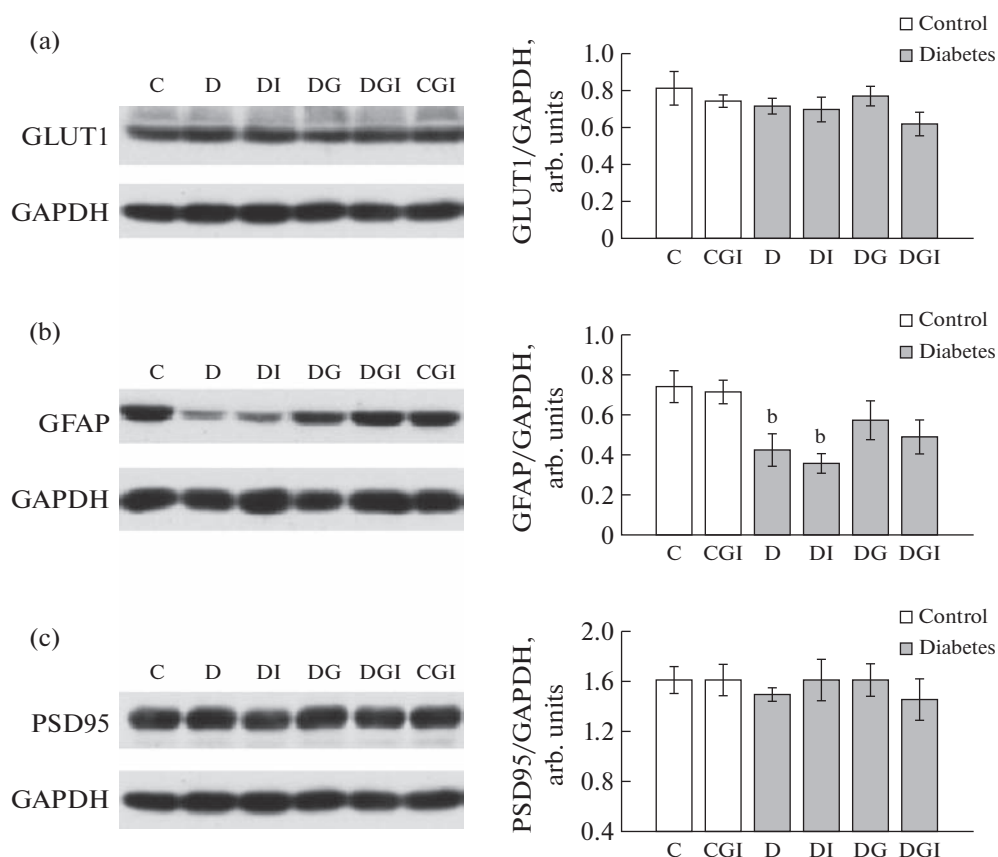


Рис. 5. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на экспрессию GLUT-1, GFAP и PSD95 в гиппокампе контрольных крыс и крыс с СД2. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). (a) – Экспрессия GLUT-1, (b) – Экспрессия GFAP, (c) – Экспрессия PSD95. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 7$). Различия значимы по *t*-тесту по сравнению с контрольными крысами (К) при: b – $p < 0.02$.

киназу, активируется через посредство инсулинрецепторных субстратов (IRS), функционально сопряженных с инсулиновым рецептором, то каскад МАПК запускается через посредство белка Grb2, который также функционально взаимодействует с рецептором инсулина. Для ERK1/2, важнейшего представителя семейства МАПК, в гиппокампе наблюдали такую же закономерность, как и для Akt-киназы. Уровень фосфорилирования ERK1/2 в гиппокампе крыс с СД2 после 4-х недельных введений инсулина (группа ДИ) достоверно снижался как по отношению к контролю (К), так и по сравнению с диабетической группой без лечения (Д) ($p < 0.05$) (рис. 6с).

Метаболические нарушения в организме сопровождаются интенсификацией воспалительных процессов, в том числе в мозге. Накопление провоспалительных цитокинов коррелирует с интенсивностью этих процессов. Анализ лизатов гиппокампа на содержание в них цитокина интерлейкина-6 (IL-6) показал, что его количество увеличивается только у крыс с СД2 после обработки ИВИ (группа ДИ),

что, возможно, и является причиной одновременного снижения степени фосфорилирования ключевых протеинкиназ Akt и ERK1/2 (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаболизм глюкозы и энергетический обмен на периферии, прежде всего в печени и жировой ткани, регулируются инсулином не только напрямую, но и через посредство ЦНС. В этой связи большинство работ, в которых описываются центральные эффекты гормона на метаболические процессы, посвящены изучению его действия на нейроны гипоталамуса [38–40]. Однако высокий уровень экспрессии инсулиновых рецепторов выявлен также в гиппокампе [41, 42]. Инсулин, как было показано в опытах *in vitro* и *in vivo*, модулирует синаптическую пластичность в гиппокампе [7–10, 43, 44]. Учитывая взаимосвязь синаптической пластичности и когнитивных функций, логично предположить, что инсулин способен оказывать позитивное влияние на процессы обучения и фор-

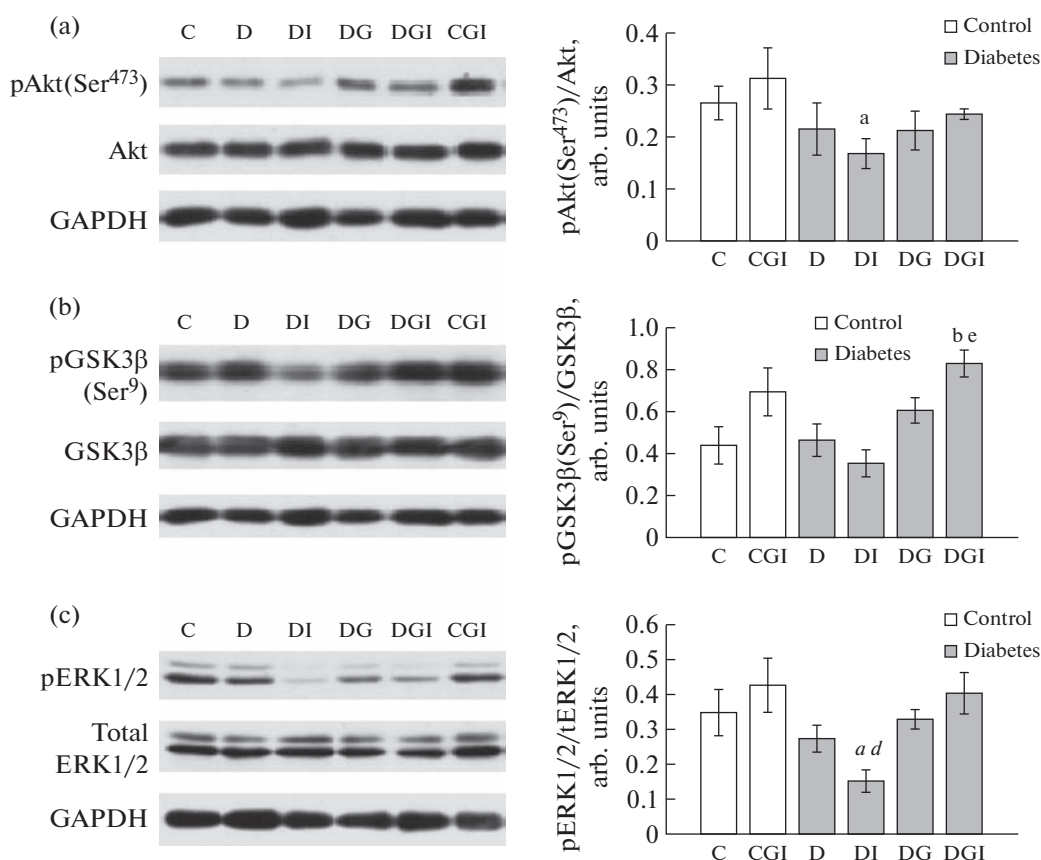


Рис. 6. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на уровень фосфорилирования протеинкиназ Akt, GSK3β, ERK1/2 в гиппокампе контрольных крыс и крыс с СД2. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). (a) – Фосфорилирование Akt-киназы по Ser⁴⁷³, (b) – фосфорилирование киназы GSK3β по Ser⁹, (c) – фосфорилирование ERK1 по Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ и ERK2 по Thr¹⁸⁶/Tyr¹⁸⁷. Данные представлены как среднее ± SEM (*n* = 7). Различия значимы по *t*-тесту по сравнению с контрольными крысами (К) при: a – *p* < 0.05, b – *p* < 0.02. Различия значимы по сравнению с необработанными диабетическими крысами (Д) при: d – *p* < 0.05; e – *p* < 0.02.

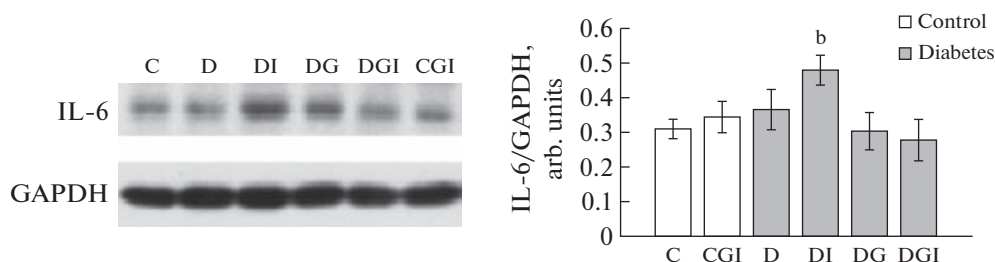


Рис. 7. Влияние ИВИ (0.5 МЕ/крысу/сутки) и ИВГ (6 мг/кг/сутки) при раздельном и совместном введении на уровень экспрессии IL-6 в гиппокампе контрольных крыс и крыс с СД2. Обозначения групп на графике: группа 1 (C) – контроль (К), группа 4 (CGI) – контроль + ганглиозиды + инсулин (КГИ), группа 5 (D) – диабет (Д), группа 6 (DI) – диабет + инсулин (ДИ), группа 7 (DG) – диабет + ганглиозиды (ДГ), группа 8 (DGI) – диабет + ганглиозиды + инсулин (ДГИ). Данные представлены как среднее ± SEM (*n* = 7). Различия значимы по *t*-тесту по сравнению с контрольными крысами (К) при: b – *p* < 0.02.

мирования памяти, что и было подтверждено экспериментально [45–48]. Представления о роли инсулиновой сигнальной системы в гиппокампе были значительно расширены, благодаря работе с животными нокаутными по рецепторам инсулина

и IGF-1 в этой области мозга [49]. У нокаутных мышей наблюдали не только когнитивные расстройства, вызванные снижением экспрессии GluA1 субъединицы AMPA-рецепторов в синапсомембранных мембранах гиппокампа, но и нару-

шенную толерантность к глюкозе. Это подчеркивает важность гиппокампа не только как центра консолидации памяти, но и как важнейшего звена в нейрональной сети, регулирующей метаболизм глюкозы в организме.

Для улучшения запоминания или коррекции когнитивных нарушений используются различные способы доставки инсулина в мозг, среди которых интрацеребровентрикулярный (i.c.v.), непосредственное введение гормона в область гиппокампа, а также интраназальный способ доставки [45–48]. Первые два подхода высокотравматичны и трудно реализуемы не только для человека, но и для животных, и не могут быть использованы в клинике.

В качестве вспомогательного вещества, наделенного нейропротекторными свойствами, способного усилить действие инсулина, в наших экспериментах использовался препарат суммарных ганглиозидов мозга быка. Помимо нейропротекторного, антиоксидантного и противовоспалительного действия описано положительное влияние ганглиозидов в контроле энергетического гомеостаза, реализуемого через гипоталамические механизмы [50]. В составе липидных рафтов ганглиозиды регулируют активность тирозинкиназных доменов рецепторов инсулина и ростовых факторов [33]. Взаимодействие различных видов гликофинголипидов с GluA2-субъединицей AMPA-рецепторов препятствует интернализации этих рецепторов и пролонгирует нахождение в синаптической мембране в функционально активном состоянии [51, 52], что имеет большое значение в процессе обучения, в который вовлечены AMPA-рецепторы. Если эффективность ИВИ общепризнана и этот способ введения инсулина широко применяется в клинике для лечения нейродегенеративных заболеваний, то ИВГ, помимо наших исследований [53], применялся еще лишь в одной работе [54].

Сравнивая различные способы доставки инсулина в мозг, следует отметить, что при i.c.v. и при введении в определенные области мозга через имплантированные канюли эффективная концентрация гормона при однократном применении не превышает 1–4 мЕД [45–47], тогда как для длительных воздействий используются ИВИ в суточных дозах 0.48 ЕД и выше. Тем не менее при обработке ИВИ контрольных животных через 2 нед мы наблюдали улучшение пространственной ориентации в водном лабиринте Морриса, благодаря чему сокращались латентное время поиска платформы и длина пути (табл. 1). Если эффект прямого введения может быть связан с быстрой активацией Akt-киназы в клетках гиппокампа [47], то в нашем случае улучшение когнитивных функций является следствием накопления BDNF в нейронах гиппокампа (рис. 4), усиливающего долговременную потенциацию (LTP) [55]. Отсутствие значимого эффекта на формирование пространственной памяти при введе-

нии одних ганглиозидов как контрольным крысам, так и животным с СД2, возможно, связано с тем, что в LTP на нашей модели задействованы AMPA-рецепторы с ионным каналом, сформированным не GluA2-субъединицей, к которым ганглиозиды имеют наибольшее сродство, а преимущественно GluA1- или GluA3-субъединицами.

Активные межнейронные взаимодействия, в том числе при обучении, сопровождаются интенсификацией метаболических процессов, увеличивающих расход глюкозы [56, 57]. Анализ экспрессии транспортера GLUT-1, через который глюкоза поступает в астроциты, показал, что содержание GLUT-1 в общем лизате гиппокампа у животных как контрольных, так и групп с СД2 остается неизменным (рис. 5). Нельзя исключать, что существуют различия между группами в распределении GLUT-1 между плазматической мембраной и цитозолем, однако это требует дальнейших исследований. Интерес представляет уменьшение содержания маркерного белка астроцитов GFAP в гиппокампе крыс с СД2 без лечения и после обработки ИВИ. Однако на основании этих данных неправильно делать заключение, что снижается и количество самих астроцитов. GFAP — всего лишь один из компонентов промежуточных филаментов. Мыши, нокаутные по GFAP и его аналогу виментину, жизнеспособны, хотя и лишены промежуточных филаментов и менее устойчивы к стрессорным воздействиям [58, 59]. Проверка когнитивных функций у таких мышей в различных поведенческих тестах не выявила существенных различий по сравнению с животными дикого типа за исключением их особенности к более быстрому “выгоранию” памяти [60]. Благодаря введению ганглиозидов как отдельно, так и вместе с инсулином крысам с СД2, уровень GFAP в гиппокампе возрастал и достоверно не отличался от контрольной группы. В свою очередь, постоянство экспрессии белка PSD95 свидетельствует об отсутствии изменений в постсинаптической мембране.

В отличие от периферии GLUT-4 не является доминирующим переносчиком глюкозы в мозге. Однако в отдельных синапсах требуется его присутствие, чтобы поддержать развитие потенциала действия [61]. GLUT-4 причисляют к критически важным молекулярным компонентам гиппокампа, без которых невозможно формирование памяти [62]. Мы также попытались оценить вклад GLUT-4 в развитие когнитивного дефицита при СД2. Однако анализ уровня его экспрессии в гиппокампе с помощью ПЦР в реальном времени не принес никакого результата из-за низкого содержания исходной матрицы (мРНК данного гена), количество которой не удалось амплифицировать до необходимого порогового уровня даже при большом числе циклов. Используя специфические антитела к GLUT-4, были выявлены иммунопозитивные клетки на срезах гиппокампа без видимых разли-

чий в оптической плотности между группами. С помощью иммуногистохимии также не было обнаружено различий в экспрессии GLUT-3, основного транспортера глюкозы в нейронах. Отчасти это может быть связано с временным фактором, так как после завершения последних испытаний в ВЛМ декапитация животных проводилась только через 72 ч. Анализ экспрессии генов и белков, обеспечивающих сопряжение метаболизма между нейронами и астроцитами при обучении и формировании долговременной памяти, показал значительные изменения уже через 3, 6 и 24 ч после окончания тестирования [63]. Лишь некоторые из них сохранялись на более поздних сроках.

В отношении когнитивных функций протеинкиназы Akt, GSK3 β и ERK1/2 рассматриваются как регуляторы синаптической пластичности [64–66]. Ингибиторы GSK3 β блокируют индукцию LTD, тогда как развитие LTP приводит к подавлению активности GSK3 β [64]. Столь сложные взаимодействия способствуют защите информации, кодируемой LTP, от последующего удаления при развитии LTD, что обеспечивает консолидацию памяти. Семейство киназ GSK3 чаще всего связывают с патогенезом болезни Альцгеймера, поскольку фермент участвует в гиперфосфорилировании Тау-белка, что вызывает его агрегацию и образование нейрофибриллярных клубков [67]. В таком случае высокий уровень ингибирующего фосфорилирования GSK3 β по остатку Ser⁹, наблюдаемый в гиппокампе крыс с СД2 после обработки совместно ИВИ и ИВГ, способен обеспечить защиту не только от гиперфосфорилирования Тау-белка и тауропатии, но и от когнитивного дефицита.

В клинической практике интраназальные введения инсулина используются для улучшения когнитивных функций у пациентов с болезнью Альцгеймера и легкими нарушениями памяти, внимания, восприятия информации и логического мышления [68–70]. При введении людям с когнитивными расстройствами детского возраста, фармакологического препарата инсулина пролонгированного действия (40 ЕД/сутки) через 3 нед наблюдались улучшения различных видов памяти [68]. Если же введения продолжались в течение 4 мес, то позитивный эффект отсутствовал, что связывают с развитием ИР [69]. Одним из побочных эффектов длительной обработки ИВИ здоровых животных и животных с СД 1-го типа можно считать увеличение содержания в крови тиреотропного гормона, определяющего не только функциональную активность тиреоидной системы, но и зависимых от нее функций ЦНС и эндокринной систем [71]. Возможно, наблюдаемое нами через 4 нед ежедневных интраназальных введений инсулина снижение активности Akt-киназы и ERK1/2, оцениваемое по уровню их специфического фосфорилирования, а также увеличение содержания IL-6 являются предвестниками развивающейся ИР и дисбаланса выработки тиролибе-

рина, рилизинг-фактора тиреотропного гормона (рис. 6 и 7). Неясным остается источник, продуцирующий IL-6, поскольку иммуногистохимический анализ с антителом к Iba1 показал отсутствие активированной микроглии в гиппокампе.

Таким образом, ИВИ улучшает пространственную память у животных с СД2, но длительные введения гормона могут привести к десенситизации в гиппокампе как инсулиновой сигнальной системы, так и функционально взаимодействующих с ней других сигнальных и нейромедиаторных систем. Процессы десенситизации, как мы полагаем, по крайней мере в некоторых случаях удастся преодолеть путем комбинированного применения ИВИ с ганглиозидами. Крайне важным представляется установление временной динамики восстанавливающего эффекта комбинированной терапии ИВИ+ИВГ на сниженную при СД2 чувствительность к инсулину, на измененные в условиях диабетической патологии протеинкиназные каскады, мишени инсулина, и экспрессию факторов нейродифференцировки и воспаления, и это требует дальнейших исследований. Полученные данные свидетельствуют в пользу перспективности применения комбинаций ИВИ с ганглиозидами как для предотвращения диабетической энцефалопатии, так и для восстановления центральной регуляции энергетического обмена.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по работе с животными проводили в соответствии с утвержденным Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных протоколом-заявкой ИЭФБ РАН (Протокол № 1-11/2022 от 27.01.2022 г.) и требованиями, предусмотренными European Communities Council Directive 1986 и изложенными в Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ ИЭФБ РАН (№ 075-00967-23-00).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR (2012) Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res* 2012: 384017. <https://doi.org/10.1155/2012/384017>
2. Petersen MC, Shulman G (2018) Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98: 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
3. White MF, Kahn CR (2021) Insulin action at a molecular level – 100 years of progress. *Mol Metab* 52: 101304. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101304>
4. Vinuesa A, Pomilio C, Gregosa A, Bentivegna M, Presa J, Bellotto M, Saravia F, Beauquis J (2021) Inflammation and Insulin Resistance as Risk Factors and Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 15: 653651. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.653651>
5. Sullivan M, Fernandez-Aranda F, Camacho-Barcia L, Harkin A, Macri S, Mora-Maltas B, Jiménez-Murcia S, O'Leary A, Ottomana AM, Presta M, Slattery D, Scholtz S, Glennon JC (2023) Insulin and disorders of behavioural flexibility. *Neurosci Biobehav Rev* 150: 105169. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105169>
6. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376–1382. <https://doi.org/10.1038/nm1202-798>
7. Viswaprakash N, Vaithianathan T, Viswaprakash A, Judd R, Parameshwaran K, Suppiramaniam V (2015) Insulin treatment restores glutamate (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptor function in the hippocampus of diabetic rats. *J Neurosci Res* 93: 1442–1450. <https://doi.org/10.1002/jnr.23589>
8. Zhao F, Siu JJ, Huang W, Askwith C, Cao L (2019) Insulin Modulates Excitatory Synaptic Transmission and Synaptic Plasticity in the Mouse Hippocampus. *Neuroscience* 411: 237–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.033>
9. Hammoud H, Netsyk O, Tafreshi AS, Korol SV, Jin Z, Li JP, Bimir B (2021) Insulin differentially modulates GABA signalling in hippocampal neurons and, in an age-dependent manner, normalizes GABA-activated currents in the tg-APPswe mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Physiol* 232: e13623. <https://doi.org/10.1111/apha.13623>
10. Shypshyna M, Kolesnyk O, Fedulova S, Veselovsky N (2023) Insulin modulates the paired-pulse plasticity at glutamatergic synapses of hippocampal neurons under hypoinsulinemia. *Front Cell Neurosci* 17: 1132325. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1132325>
11. Janssen JAMJL (2021) Hyperinsulinemia and Its Pivotal Role in Aging, Obesity, Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease and Cancer. *Int J Mol Sci* 22: 7797. <https://doi.org/10.3390/ijms22157797>
12. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4162–4167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230450100>
13. Qiu WQ, Folstein MF (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27: 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.004>
14. Spinelli M, Fusco S, Grassi C (2019) Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline. *Front Neurosci* 13: 788. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00788>
15. Reinke C, Buchmann N, Fink A, Tegeler C, Demuth I, Doblhammer G (2022) Diabetes duration and the risk of dementia: a cohort study based on German health claims data. *Age Ageing* 51: afab231. <https://doi.org/10.1093/ageing/afab231>
16. Heni M, Schöpfer P, Peter A, Sartorius T, Fritsche A, Synofzik M, Häring HU, Maetzler W, Hennige AM (2014) Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetol* 51: 679–681. <https://doi.org/10.1007/s00592-013-0546-y>
17. Sartorius T, Peter A, Heni M, Maetzler W, Fritsche A, Häring HU, Hennige AM (2015) The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier? *PLoS One* 10: e0126804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126804>
18. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtuykov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14: e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
19. Jurcovicova J (2014) Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr Regul* 48: 35–48. https://doi.org/10.4149/endo_2014_01_35
20. Koepsell H (2020) Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch* 472: 1299–1343. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02441-x>
21. Hernandez-Garzón E, Fernandez AM, Perez-Alvarez A, Genis L, Bascuñana P, Fernandez de la Rosa R, Delgado M, Angel Pozo M, Moreno E, McCormick PJ, Santi A, Trueta-Saiz A, García-Caceres C, Tschöp MH, Araque A, Martín ED, Torres Aleman I (2016) The insulin-like growth factor I receptor regulates glucose transport by astrocytes. *Glia* 64: 1962–1971. <https://doi.org/10.1002/glia.23035>
22. Fernandez AM, Hernandez-Garzón E, Perez-Domper P, Perez-Alvarez A, Mederos S, Matsui T, Santi A, Trueta-Saiz A, García-Guerra L, Pose-Utrilla J, Fielitz J, Olson EN, Fernandez de la Rosa R, García García L, Pozo MA, Iglesias T, Araque A, Soya H, Perea G, Martín ED, Torres Aleman I (2017) Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. *Diabetes* 66: 64–74. <https://doi.org/10.2337/db16-0861>
23. Fernandez AM, Hernandez E, Guerrero-Gomez D, Miranda-Vizuet A, Torres Aleman I (2018) A network of insulin

- peptides regulate glucose uptake by astrocytes: Potential new druggable targets for brain hypometabolism. *Neuropharmacology* 136 (Pt B): 216–222.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.034>
24. Blázquez E, Hurtado-Carneiro V, LeBaut-Ayuso Y, Velázquez E, García-García L, Gómez-Oliver F, Ruiz-Albusac JM, Avila J, Pozo MÁ (2022) Significance of Brain Glucose Hypometabolism, Altered Insulin Signal Transduction, and Insulin Resistance in Several Neurological Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 873301.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873301>
 25. Sukhov IB, Shipilov VN, Chistyakova OV, Trost AM, Shpakov AO (2013) Long-term intranasal insulin administration improves spatial memory in male rats with prolonged type 1 diabetes mellitus and in healthy rats. *Dokl Biol Sci* 453: 349–352.
<https://doi.org/10.1134/S001249661306015X>
 26. Rajasekar N, Nath C, Hanif K, Shukla R (2017) Intranasal Insulin Administration Ameliorates Streptozotocin (ICV)-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Memory Impairment in Rats. *Mol Neurobiol* 54: 6507–6522.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0169-8>
 27. 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: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 77: 1099–1109.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1840>
 28. Yang L, Zhang X, Li S, Wang H, Zhang X, Liu L, Xie A (2020) Intranasal insulin ameliorates cognitive impairment in a rat model of Parkinson's disease through Akt/GSK3 β signaling pathway. *Life Sci* 259: 118159.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118159>
 29. Mastrototaro L, Roden M (2021) Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism* 125: 154892.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154892>
 30. Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmaschuk EV, Tyurina YY, Gonchar VS (1998) Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23: 945–952.
<https://doi.org/10.1023/a:1021076220411>
 31. Zakharova IO, Sokolova TV, Vlasova YA, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2014) GM1 ganglioside activates ERK1/2 and Akt downstream of Trk tyrosine kinase and protects PC12 cells against hydrogen peroxide toxicity. *Neurochem Res* 39: 2262–2275.
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1428-6>
 32. Nikolaeva S, Bayunova L, Sokolova T, Vlasova Y, Bachtieva V, Avrova N, Parnova R (2015) GM1 and GD1a gangliosides modulate toxic and inflammatory effects of *E. coli* lipopolysaccharide by preventing TLR4 translocation into lipid rafts. *Biochim Biophys Acta* 1851: 239–247.
<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.12.004>
 33. Sipione S, Monyror J, Galleguillos D, Steinberg N, Kadam V (2020) Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Front Neurosci* 14: 572965.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>
 34. Galleguillos D, Wang Q, Steinberg N, Zaidi A, Shrivastava G, Dhama K, Daskhan GC, Schmidt EN, Dworsky-Fried Z, Giuliani F, Churchward M, Power C, Todd K, Taylor A, Macauley MS, Sipione S (2022) Anti-inflammatory role of GM1 and other gangliosides on microglia. *J Neuroinflammation* 19: 9.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02374-x>
 35. Zakharova IO, Avrova NF (2001) The effect of cold stress on ganglioside fatty acid composition and ganglioside-bound sialic acid content of rat brain subcellular fractions. *J Therm Biol* 26: 215–222.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4565\(00\)00045-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4565(00)00045-0)
 36. Vanier MT, Holm M, Ohman R, Svennerholm L (1971) Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *J Neurochem* 18: 581–592.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb11988.x>
 37. Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO (2015) The Effect of Long-Term Intranasal Serotonin Treatment on Metabolic Parameters and Hormonal Signaling in Rats with High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol* 2015: 245459.
<https://doi.org/10.1155/2015/245459>
 38. Könnner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Brüning JC (2007) Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5: 438–449.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>
 39. Loh K, Zhang L, Brandon A, Wang Q, Begg D, Qi Y, Fu M, Kulkarni R, Teo J, Baldock P, Brüning JC, Cooney G, Neely GG, Herzog H (2017) Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. *Mol Metab* 6: 574–584.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.03.013>
 40. Shin AC, Filatova N, Lindtner C, Chi T, Degann S, Oberlin D, Buettner C (2017) Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action. *Diabetes* 66: 1560–1571.
<https://doi.org/10.2337/db16-1238>
 41. Hill JM, Lesniak MA, Pert CB, Roth J (1986) Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 17: 1127–1138.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90082-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90082-5)
 42. Doré S, Kar S, Rowe W, Quirion R (1997) Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I]IGF-II and [125I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience* 80: 1033–1040.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00154-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00154-1)
 43. Izumi Y, Yamada KA, Matsukawa M, Zorumski CF (2003) Effects of insulin on long-term potentiation in hippocampal slices from diabetic rats. *Diabetologia* 46: 1007–1012.
<https://doi.org/10.1007/s00125-003-1144-2>

44. van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispen WH, Ramakers GM (2005) Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem* 94: 1158–1166.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03269.x>
45. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC (2000) Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 68: 509–514.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00220-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00220-6)
46. Babri S, Badie HG, Khamenei S, Seyedlar MO (2007) Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain Cogn* 64: 86–91.
<https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.01.002>
47. McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS (2010) Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 93: 546–553.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.02.002>
48. Erichsen JM, Calva CB, Reagan LP, Fadel JR (2021) Intranasal insulin and orexins to treat age-related cognitive decline. *Physiol Behav* 234: 113370.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113370>
49. Soto M, Cai W, Konishi M, Kahn CR (2019) Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 6379–6384.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1817391116>
50. Inamori KI, Inokuchi JI (2020) Roles of Gangliosides in Hypothalamic Control of Energy Balance: New Insights. *Int J Mol Sci* 21: 5349.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155349>
51. Cole AA, Dosemeci A, Reese TS (2010) Co-segregation of AMPA receptors with G(M1) ganglioside in synaptosomal membrane subfractions. *Biochem J* 427: 535–540.
<https://doi.org/10.1042/BJ20091344>
52. Prendergast J, Umanah GK, Yoo SW, Lagerlöf O, Motari MG, Cole RN, Hagan RL, Dawson TM, Dawson VL, Schnaar RL (2014) Ganglioside regulation of AMPA receptor trafficking. *J Neurosci* 34: 13246–13258.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1149-14.2014>
53. Sukhov IB, Lebedeva MF, Zakharova IO, Derkach KV, Bayunova LV, Zorina II, Avrova NF, Shpakov AO (2020) Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* 168: 317–320.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04699-8>
54. Itokazu Y, Fuchigami T, Morgan JC, Yu RK (2021) Intranasal infusion of GD3 and GM1 gangliosides downregulates alpha-synuclein and controls tyrosine hydroxylase gene in a PD model mouse. *Mol Ther* 29: 3059–3071.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.06.005>
55. Leal G, Comprido D, Duarte CB (2014) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C: 639–656.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>
56. Gold PE (2005) Glucose and age-related changes in memory. *Neurobiol Aging* 26 Suppl 1: S60–S64.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.002>
57. McNay EC, Canal CE, Sherwin RS, Gold PE (2006) Modulation of memory with septal injections of morphine and glucose: effects on extracellular glucose levels in the hippocampus. *Physiol Behav* 87: 298–303.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.016>
58. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T, Moons L, Fotheringham A, Davies I, Carmeliet P, Schwartz JP, Pekna M, Kubista M, Blomstrand F, Margakis N, Nilsson M, Pekny M (2008) Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 468–481.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600546>
59. de Pablo Y, Nilsson M, Pekna M, Pekny M (2013) Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Histochem Cell Biol* 140: 81–91.
<https://doi.org/10.1007/s00418-013-1110-0>
60. Wilhelmsson U, Pozo-Rodríguez A, Kalm M, de Pablo Y, Widestrand Å, Pekna M, Pekny M (2019) The role of GFAP and vimentin in learning and memory. *Biol Chem* 400: 1147–1156.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0199>
61. Ashrafi G, Wu Z, Farrell RJ, Ryan TA (2017) GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses. *Neuron* 93: 606–615.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.020>
62. McNay EC, Pearson-Leary J (2020) GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. *Exp Neurol* 323: 113076.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113076>
63. Tadi M, Allaman I, Lengacher S, Grenningloh G, Magistretti PJ (2015) Learning-Induced Gene Expression in the Hippocampus Reveals a Role of Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling in Long Term Memory. *PLoS One* 10: e0141568.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141568>
64. Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3 β . *Neuron* 53: 703–717.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.029>
65. Racaniello M, Cardinale A, Mollinari C, D'Antuono M, De Chiara G, Tancredi V, Merlo D (2010) Phosphorylation changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt kinases and CREB activation during early long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 mouse hippocampal synapses. *Neurochem Res* 35: 239–246.
<https://doi.org/10.1007/s11064-009-0047-0>
66. Martínez-Mármol R, Chai Y, Conroy JN, Khan Z, Hong SM, Kim SB, Gormal RS, Lee DH, Lee JK, Coulson EJ, Lee MK, Kim SY, Meunier FA (2023) Hericerin derivatives activates a pan-neurotrophic pathway in central hippocampal neurons converging to ERK1/2 signaling enhancing spatial memory. *J Neurochem* 165: 791–808.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15767>
67. Hernandez F, Lucas JJ, Avila J (2013) GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1: S141–S44.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025>

68. Claxton A, Baker LD, Hanson A, Trittschuh EH, Cholerton B, Morgan A, Callaghan M, Arbuckle M, Behl C, Craft S (2015) Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J Alzheimers Dis* 44: 897–906.
<https://doi.org/10.3233/JAD-141791>
69. Craft S, Claxton A, Baker LD, Hanson AJ, Cholerton B, Trittschuh EH, Dahl D, Caulder E, Neth B, Montine TJ, Jung Y, Maldjian J, Whitlow C, Friedman S (2017) Effects of Regular and Long-Acting Insulin on Cognition and Alzheimer's Disease Biomarkers: A Pilot Clinical Trial. *J Alzheimers Dis* 57: 1325–1334.
<https://doi.org/10.3233/JAD-161256>
70. Avgerinos KI, Kalaitzidis G, Malli A, Kalaitzoglou D, Myserlis PG, Lioutas VA (2018) Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment: a systematic review. *J Neurol* 65: 1497–1510.
<https://doi.org/10.1007/s00415-018-8768-0>
71. Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47: 916–924.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>

CORRECTION OF COGNITIVE IMPAIRMENTS AND SIGNALING PATHWAYS IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS USING INTRANASALLY ADMINISTERED INSULIN AND GANGLIOSIDES

I. O. Zakharova^{a, #}, L. V. Bayunova^a, K. V. Derkach^a, A. O. Shpakov^a, and N. F. Avrova^a

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

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

Insulin controls both systemic glucose homeostasis and the functional activity of the brain. Insulin content and the activity of the insulin signaling system decreases in the brain in diabetes mellitus type 2 (DM2). It gives rise to disorders of energy metabolism, including hypometabolism of glucose in the brain, and to cognitive dysfunctions. The deficiency of hormone in the brain can be restored by intranasally administered insulin (IAI). It is also reasonable to use it in combination with substances with neuroprotective properties, including complex glycosphingolipids gangliosides, in order to increase the effectiveness of IAI for the correction of brain functions. Intranasal way of ganglioside delivery (IAG) to the brain can be explored as well. The aim of the research comprised the evaluation of efficiency of separate and combined IAI and IAG use to correct the cognitive impairment in Wistar rats with DM2 using the Morris water maze (MWM) and analysis of expression of proteins (BDNF, GLUT-1, GLUT-3, GLUT -4, GFAP, PSD95) and activity of protein kinases (Akt, GSK3 β , ERK1/2) involved in learning and long-term memory formation in the hippocampus. IAI and IAG improved spatial orientation of rats with DM2 in the MWM, and the effect of combined use of IAI and IAG was similar to the effect of each substance used separately. Owing to combined IAI and IAG the activity of effector protein kinases (Akt and ERK1/2) was maintained at the same level as in control rats while IAI monotherapy resulted in the reduced level of their phosphorylation. The level of GSK3 β phosphorylation at Ser⁹ was also increased after combined treatments with insulin and gangliosides which is protective against tauopathy. Thus, the combined application of IAI and IAG improves the functional state of the components of the insulin system in the brain of rats with DM2, although it does not significantly enhance the effects of IAI on long-term memory.

Keywords: insulin, gangliosides, intranasal administration, hippocampus, signaling pathways, type 2 diabetes mellitus

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

НЕКОТОРЫЕ КОМПОНЕНТЫ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ГЛАЗАХ ДВУХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

© 2023 г. И. Н. Доминова¹, А. А. Хусенова¹, В. В. Котова¹, М. В. Сидорова¹, В. В. Жуков^{1,*}

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

*e-mail: valerzhukov@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 11.10.2023 г.

Выполнено маркирование 5-НТ-иммунореактивных структур на срезах глаз пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Pomacea canaliculata*. В периокулярной области животных обоих видов обнаружена повышенная плотность 5-НТ-ергических волокон, образующих структурно выраженные сплетения и частично проникающих в сетчатку. В тканях глаза обнаружена транскрипция генов рецепторов серотонина: двух типов у *L. stagnalis* и трех — у *P. canaliculata*. Ее относительный уровень статистически значительно превышает этот показатель в центральных ганглиях нервной системы и щупальцах. Дополнительно в тканях *P. canaliculata* была зафиксирована транскрипция гена транспортера 5-НТ. Полученные результаты обсуждаются с позиций возможного серотонинергического механизма модуляции процессов в сетчатке у брюхоногих моллюсков.

Ключевые слова: *Lymnaea stagnalis*, *Pomacea canaliculata*, сетчатка, серотонин, иммунореактивность, транскрипция генов, рецепторы 5-НТ, транспортер серотонина

DOI: 10.31857/S0044452923060037, **EDN:** HVCSLT

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) является одним из самых распространенных медиаторов и модуляторов нервных процессов в организмах как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Влияние серотонина проявляется в широком круге функций, начиная от базовых физиологических механизмов жизнеобеспечения, таких как локомоция и питание, до процессов обучения и памяти [1, 2]. Известно также о модулирующем влиянии 5-НТ на сенсорные [3], в том числе фоторецепторные [4, 5] процессы и связанные с ними механизмы регуляции биологических ритмов [6].

Рецепторы серотонина (5-НТР), обеспечивающее его влияние на сетчатку, идентифицированы у нескольких видов позвоночных [7]. Из нервной ткани беспозвоночных, в том числе моллюсков, также выделены и охарактеризованы несколько типов 5-НТР [1], однако сведения об их присутствии в сетчатке пока отсутствуют. При этом существование серотонинергической иннервации глаза моллюсков, указывающее на возможную физиологическую роль этого вещества, выявлено у осьминога [8], и нескольких видов брюхоногих: *Aplysia californica* [9], *Bulla gouldiana* [10] и *Lymnaea stagnalis* [11, 12].

Небольшой объем и фрагментарность сведений о серотонинергическом механизме в глазах моллюсков стимулировали данную работу. Ее целью

была определена детализация характеристики серотонинергической иннервации глаза пресноводных брюхоногих моллюсков на примере двух видов: *L. stagnalis* и *P. canaliculata*. Структурной задачей исследования стал анализ топографии серотонинергических нервных элементов с точки зрения их возможности оказывать влияние на сетчатку. Задачей молекулярной части работы были поставлены выявление и идентификация компонентов серотонинергической системы в глазу исследованных моллюсков. Для этого был предпринят поиск транскриптов генов рецепторов и транспортера серотонина, а также оценка относительного уровня их транскрипции в тканях глаза сравнительно с центральной нервной системой и щупальцами. Выбор объектов был обусловлен наличием информации о 5-НТР прудовика [13, 14] и их генов у *P. canaliculata* в базе данных Gene NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=serotonin%20pomacea>; дата обращения: 01.11.2022 г.).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Взрослые особи прудовиков *Lymnaea stagnalis* со средним размером раковины около 3 см были собраны в пресноводных водоемах Калининградской области и содержались в лабораторных условиях. Улитки *Pomacea canaliculata* (средний размер раковины около 2–3 см) были вы-

рашены в аквариумах Балтийского федерального университета им. И. Канта в аэрированной водопроводной воде при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и световом режиме 10 C:14T.

Подготовка материала для приготовления гистологических препаратов. Из тела животного (по 4 особи каждого вида) извлекали глаза ($n = 16$) с небольшими фрагментами окружающих тканей. Все образцы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 48 ч при температуре 4°C . После фиксации проводили пробоподготовку глаза перед приготовлением срезов на микротомекриостате (KD-3000, KEDEE) при -20°C . Для этого образцы помещали в 30%-ный раствор сахарозы и выдерживали в нем 48 ч при температуре 4°C . Образцы нарезают толщиной 70 мкм. Полученные срезы раскладывали в 12-ти луночный планшет в раствор натрий-фосфатного буфера ($\text{pH} = 7.6$) с 0.1%-м азидом натрия.

Иммуногистохимическое окрашивание. Перед проведением окрашивания на серотонин срезы промывали в растворе фосфатного буфера ($\text{pH} = 7.6$) 3 раза по 10 мин и помещали в блокирующий раствор, который включал в себя натрий-фосфатный буфер ($\text{pH} = 7.6$), 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) и 0.3% детергента Triton X-100 (0.3% Triton X-100, Sigma), в котором оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Далее срезы инкубировали с поликлональными первичными антителами к 5-HT (кролик, PAA808Ge01, Cloud-Clone corp.) с разведением (1:1500) и оставляли в течение 48 ч при 4°C на шейкере. По завершении инкубации с первичными антителами срезы промывали 5 раз в натрий-фосфатном буфере ($\text{pH} = 7.6$), а затем на 30 мин помещали в блокирующий раствор. После этапа блокирования срезы инкубировали со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с Cy3 (SAA544Rb16, Cloud-Clone corp.) с разведением (1:500) в течение 48 ч при 4°C на шейкере в темноте. По истечении этого периода перед промыванием в каждую лунку добавляли флуоресцентный маркер ДНК Hoechst 33342 (2 мкг/мл) для окрашивания ядер клеток. Через 10 мин срезы промывали по 5 раз в натрий-фосфатном буфере ($\text{pH} = 7.6$).

Окрашенные срезы раскладывали на предметные стекла толщиной 1 мм, заключали в среду Mowiol (Sigma-Aldrich) и накрывали покровным стеклом толщиной 0.17 мм.

Микроскопия. Готовые препараты предварительно изучали на флуоресцентном микроскопе (Axio Imager A2, Carl Zeiss) с использованием фильтров для Hoechst (355 нм) и Cy3 (550 нм). Наиболее удачные препараты отбирали для дальнейшей работы на конфокальном микроскопе (LSM 780, Carl Zeiss). Для получения четкого представления о расположении серотонинергических волокон в сетчатке моллюсков проводили сканирование на раз-

ных фокальных плоскостях с шагом 4.33 мкм, используя функцию Z-управление (Z-stack). Серии изображений были объединены с помощью программного обеспечения ZEN конфокального микроскопа.

Обработка изображений. Количественную оценку серотонинергических волокон проводили в программе ImageJ. Для этого на изображениях, полученных с использованием объектива 20 $\times$, выбирали по 3 зоны интереса (200 $\times$ 300 px) вблизи и на удалении от сетчатки, в которых определяли число визуализированных волокон.

Статистический анализ данных иммуногистохимического окрашивания. Обработку результатов проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post hoc* тестом с помощью критерия Тьюки в ПО GraphPad Prism 9. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$. На графиках результаты представлены как среднее $\pm$ SD.

Подготовка материала для анализа относительных уровней транскрипции (ОУТ). Из тела животного извлекали глаза, окологлоточное кольцо ганглиев, а также шупальца. Выделенные образцы хранили при -80°C .

Дизайн праймеров. Последовательность нуклеотидов праймеров для транскриптов гена *LymHTR2* (U50080.1) *L. stagnalis* была взята из работы [15]. Для других изучаемых генов обоих видов брюхоногих моллюсков праймеры подбирали с помощью программного обеспечения NCBI Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome; дата обращения: 20.11.2022 г.). Полученные праймеры анализировали и оценивали в ПО Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome; дата обращения: 20.11.2022 г.) по следующим показателям:

- 1) температура отжига forward и reverse праймеров $53\text{--}63^\circ\text{C}$;
- 2) содержание GC в последовательности праймеров — 50%;
- 3) длина праймера — 17–25 нуклеотидов;
- 4) размер ампликона — 100–300 пар оснований;
- 5) комплементарность исследуемой последовательности только одной последовательности кДНК исследуемого вида;
- 6) способность формировать шпильки (hairpins) — ΔG (энергия Гиббса) 3'-конца больше -2 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше -3 ккал/моль;
- 7) способность формировать димеры с таким же праймером (self-dimer) — ΔG 3'-конца больше -5 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше -6 ккал/моль;
- 8) способность формировать димеры с другим праймером (hetero-dimer) — ΔG 3'-конца больше —

5 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше — 6 ккал/моль.

Все пары праймеров были подобраны таким образом, чтобы области отжига на кДНК располагались на стыках экзонов [16].

Последовательности подобранных праймеров приведены в табл. 1.

Анализ уровней транскрипции генов. Количественный анализ экспрессии генов рецепторов и транспортера серотонина проводился в трех образцах тканей моллюсков: глаза, центральных ганглиев и щупальцев. У *P. canaliculata*, использовали головные щупальца, расположенные рядом с глазными стебельками.

РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген) в соответствии с инструкцией производителя с дополнительной обработкой ДНКазой. Для обработки использовали 10X ДНКазный буфер и ДНКазу I (Thermo Fisher) с последующей инкубацией при 30°C в течение 10 мин. Затем ДНКазу I нейтрализовали 0.5 М ЭДТА и инкубировали при 75°C, а очищенную РНК использовали для обратной транскрипции. Концентрацию выделенной общей РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen) и набора Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen).

Выделенная РНК использовалась для постановки реакции обратной транскрипции с использованием смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов ("Смесь dNTP (10 mM)") в эквимольных концентрациях, Oligo(dT) 15ММ праймера и набора реагентов "Обратная транскриптаза MMLV" (все Евроген) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Обратную транскрипцию проводили с использованием термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad). На проведение реакции обратной транскрипции брали около 500 нг РНК каждого образца. В качестве контрольных реакций были выбраны следующие растворы:

- 1) отрицательный контроль (вместо РНК — вода),
- 2) контроль без обратной транскриптазы MMLV (нужен для определения загрязнения геномной ДНК),
- 3) контроль без праймеров.

Уровни транскрипции генов рецепторов и транспортера серотонина определяли методом количественной ПЦР. В качестве референсного гена был выбран ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*Gapdh*), так как он является одним из наиболее стабильно экспрессирующихся генов моллюсков [17]. Для количественной ПЦР использовали следующий набор реагентов: 5X qPCRmix-HS (Евроген), 50X SYBR Green I для ПЦР-РВ (Евроген), праймеры для каждого гена (синтезированы в "Евроген", последовательности приведены в

табл. 1). Таким образом, реакционная смесь содержала:

- 1) 1X qPCRmix-HS;
- 2) праймер (0.3 mM, смесь R и F);
- 3) 1X SYBRGreenI;
- 4) кДНК, синтезированная на матрице выделенной РНК;
- 5) mQH₂O.

Суммарный объем смеси составлял 20 мкл.

Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX96 Thermal cycler (Bio-Rad) при следующих условиях: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 50 циклов: денатурация при 95°C в течение 20 с, отжиг праймеров при 57°C и 64°C в зависимости от амплифицируемой мишени в течение 30 с и элонгация цепи при 72°C в течение 20 с. Все исследуемые и контрольные образцы амплифицировали в десятикратной повторности.

ОУТ выбранных генов рассчитывали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [18].

Статистический анализ ОУТ генов рецепторов и транспортера серотонина осуществляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Обработку данных выполняли однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим *post hoc* тестом с помощью критерия Тьюки. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$. На графиках результаты представлены как среднее $\pm$ SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногистохимический анализ показал присутствие у исследованных моллюсков 5-НТ-ергических волокон как вблизи глаза, так и на удалении от него (рис. 1 и 2). Плотность сети волокон, оцениваемая как их число, заключенное в равных площадях, у *L. stagnalis* ниже, чем у *P. canaliculata* (рис. 3). При этом у *L. stagnalis* плотность визуализируемых структур вблизи сетчатки выше, чем в более удаленных от нее областях тела. Распределение 5-НТ-ергических волокон у *P. canaliculata* выглядит более равномерным. Однако и у этого моллюска на срезах, сделанных во фронтальной плоскости, видно четко обособленное кольцо волокон, окружающих глазной бокал и проникающих к базальным отделам клеток сетчатки (рис. 2). Похожая концентрация волокон также выявляется на фронтальных срезах глаза прудовика, особенно в проксимальной части, начиная с вершины гребня, разделяющего два углубления в структуре сетчатки (рис. 1c и d) до основания глазного бокала (рис. 1e и f). У *L. stagnalis* окончания, содержащие 5-НТ волокна, в основном сосредоточены в базальных областях сетчатки (рис. 4a). Тем не менее небольшое их количество можно обнаружить также среди тел, составляющих сетчатку клеток (рис. 4b). По сравнению с прудови-

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные для анализа уровней транскрипции генов рецепторов и транспортера серотонина *Lymnaea stagnalis* и *Pomacea canaliculata*

Ген	NCBI Accession #	Последовательность праймеров (5'-3')	Длина ампликона, п.н.	Температура отжига, °C
<i>Lymnaea stagnalis</i>				
<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	MH687363.1	Forward— AGGCGC-GTCCTATGAGGATA Reverse— GCCTTGG-CATCGAAGATGGA	144	64
<i>serotonin receptor</i>	L06803.1	Forward— TGGCTA-CATTCTGACCTG-GGA Reverse— CCATTTTCCGTAAA-CAAACGGCTTC	148	64
<i>serotonin receptor 5-HT2</i>	U50080.1	Forward— ACACCTG-GAGTATTCTCATC Reverse— GAAG-TAGTTGGTCAC-GTTCT	116	64
<i>Pomacea canaliculata</i>				
<i>glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase-like</i>	XM_025226530.1	Forward— CAACCT-CAAAACCGATGCCA Reverse— GACAAAG-CGATTAGTCAGT-GGA	184	57
<i>5-hydroxytryptamine receptor 1-like</i>	XM_025238755.1	Forward— ATCTTTG-GCTGGAAGAGCCC Reverse— TTGGC-GATCTTGGAGGA-CAC	158	57
<i>5-hydroxytryptamine receptor 4-like</i>	XM_025238614.1	Forward— GCAAG-CAGGCGTAC-CAAATC Reverse— AGCCCAT-GATGATCCCCAAC	129	57
<i>5-hydroxytryptamine receptor 2C-like</i>	XM_025223758.1	Forward— AAC-GAGTTCACAGG-CAAGTGG Reverse— TGC-GCTTG-GACTTGTTCTTG	166	57
<i>sodium-dependent serotonin transporter-like</i>	XM_025237076.1	Forward— ATTCGCT-GGCAACTTCTCCT Reverse— GCAGT-GATCCAAACAG-CCTTG	104	57

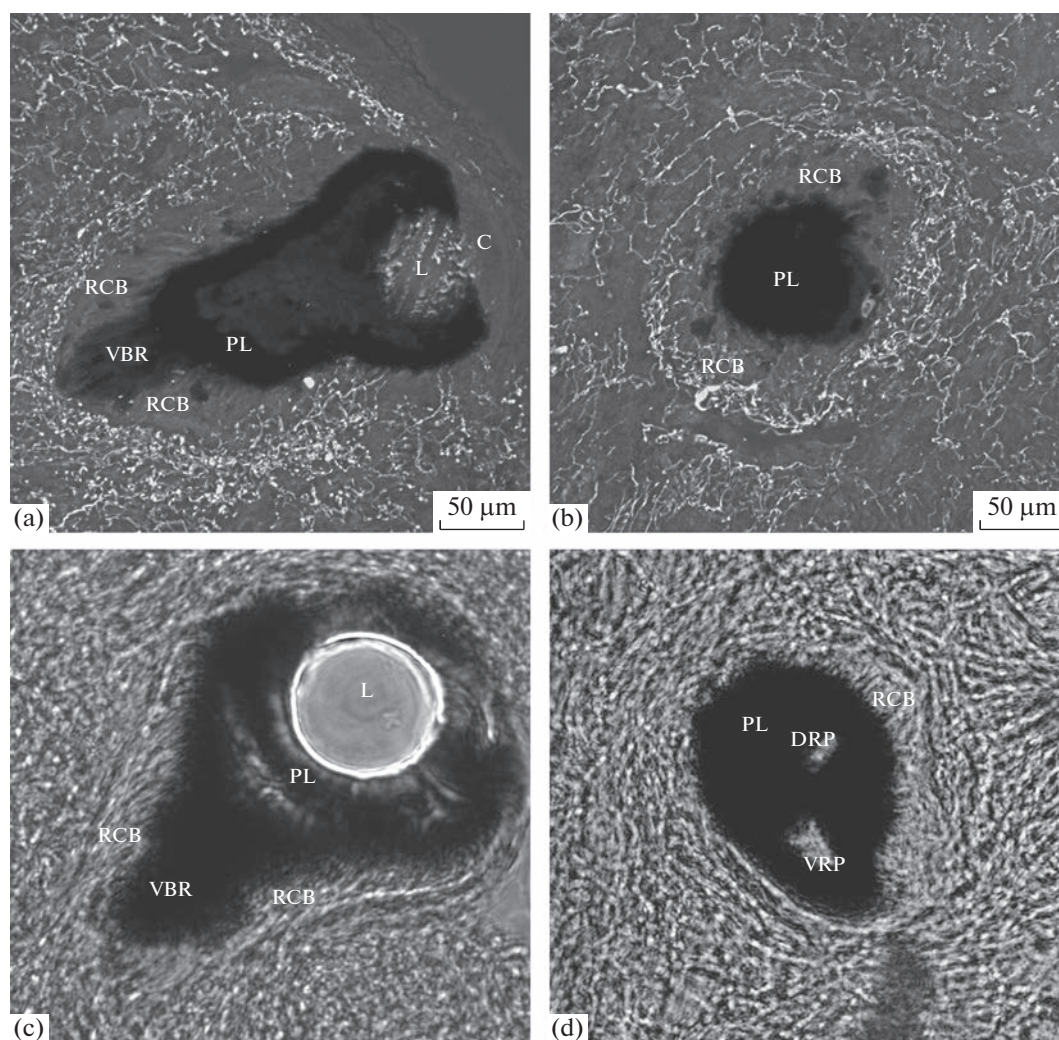


Рис. 1. Конфокальные изображения соответствующих друг другу сагиттальных (а и с) и фронтальных (b и d) срезов глаза и периоптической области *Lymnaea stagnalis*, сделанные в режиме флуоресценции (а и b) и проходящем свете (с и d). Визуализация 5-НТ-иммунореактивности на сагиттальном (а) и фронтальном (b) срезах глаза. (с) и (d) – Изображения в проходящем свете срезов, сделанные в уровнях, соответствующих конфокальным снимкам. Условные обозначения: С – роговица; L – хрусталик; PL и RCB – пигментные слои тела клеток сетчатки; VRP и DRP – вентральное и дорзальное углубление сетчатки. Калибровка – 50 мкм.

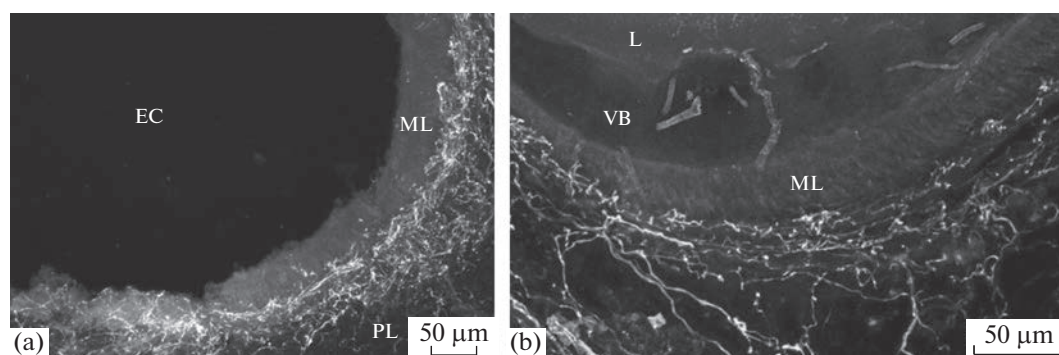


Рис. 2. 5-НТ-иммунореактивные структуры, визуализированные на срезах глаза *Pomacea canaliculata* с удаленным (а) и сохранившимся (b) хрусталиком. Условные обозначения: EC – внутриглазная полость; L – хрусталик; VB – стекловидное тело; ML и PL – микровиллярный и пигментный слои сетчатки. Калибровка – 50 мкм.

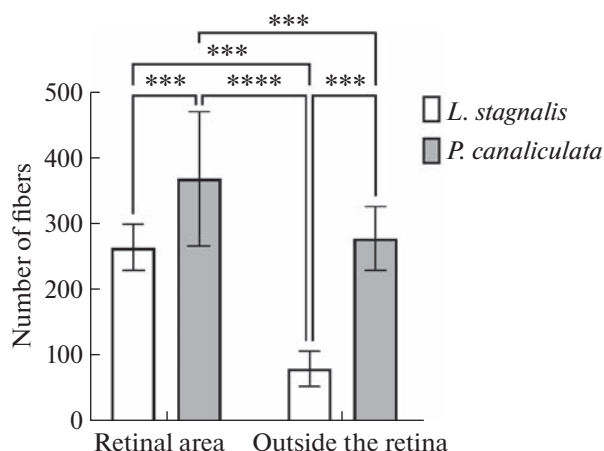


Рис. 3. Средние значения числа иммунореактивных к 5-НТ волокон, визуализированных и подсчитанных в пределах равных площадей выделенных на конфокальных микрофотографиях срезов глаз моллюсков в области сетчатки и на удалении от нее. Число проанализированных срезов: *Lymnaea stagnalis* – 20; *Pomacea canaliculata* – 11. Все результаты представлены как среднее $\pm$ SD. *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.

ком у *P. canaliculata* 5-НТ-ергические волокна проникают в слой тел клеток сетчатки заметно глубже (рис. 2а и б).

Маркирование ДНК выявляет у *L. stagnalis* рядом со слоем упорядоченных ядер клеток сетчатки пространственно разбросанные ядра клеток окружающих тканей (рис. 4). Однако нет оснований по-

лагать, что эти ядра принадлежат клеткам серотонинергического сплетения. Поэтому вопрос о местоположении тел клеток этого сплетения пока остается открытым.

Расчет ОУТ двух генов рецепторов серотонина *L. stagnalis* показал, что наименьший уровень транскрипции наблюдается в глазах по сравнению с центральными ганглиями и щупальцами ($p < 0.05$) (рис. 5). При этом статистически значимых различий между уровнями транскрипции в ганглиях и щупальцах нет.

Схожая картина по ОУТ генов рецепторов серотонина была получена и для образцов тканей *P. canaliculata* (рис. 6), в которых наиболее низкий ОУТ генов рецепторов серотонина также выявили в тканях глаза, а наибольший – в тканях щупальца. Исключением стал ген *5-hydroxytryptamine receptor 4-like* (рис. 6b), ОУТ которого были примерно одинаковы во всех трех проанализированных образцах тканей. Противоположный результат был получен для гена транспортера серотонина *sodium-dependent serotonin transporter-like* (рис. 6d), более высокое значение ОУТ которого было выявлено в образцах тканей глаза сравнительно с ганглиями и щупальцами ($p < 0.05$), тогда как уровни транскрипции в последних двух образцах тканей были статистически неразличимы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серотонинергический механизм у животных является одним из базовых в системе контроля и

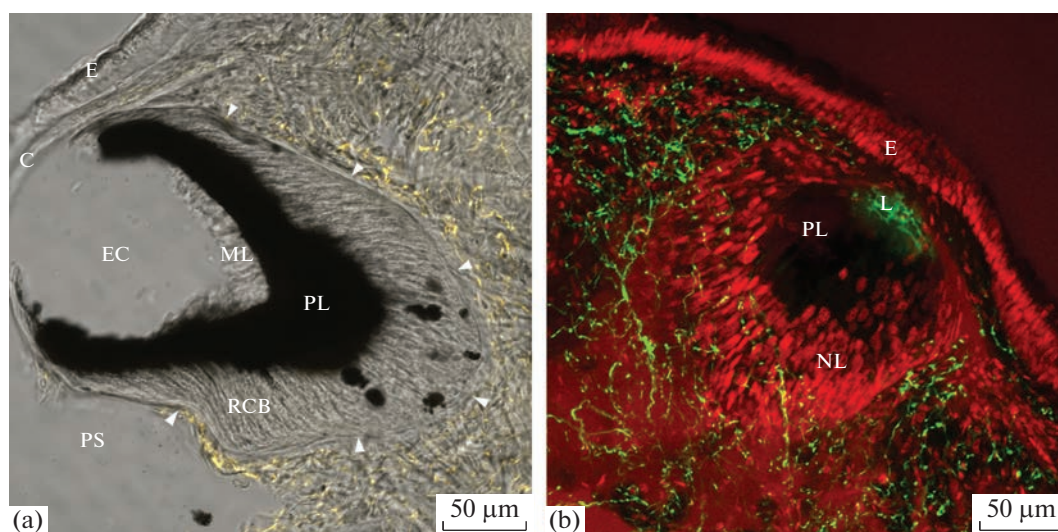


Рис. 4. 5-НТ-иммунореактивные структуры, визуализированные на срезах глаза и перипоической области *Lymnaea stagnalis*. (а) – Фотография среза, сделанного в плоскости, близкой к сагиттальной, и полученная соединением стека конфокальных оптических срезов и изображения препарата в проходящем свете. Хрусталик и стекловидное тело отсутствуют. (б) – Тангенциальный срез, окрашенный на иммунореактивность антителом к 5-НТ (зеленый) и маркером ДНК (красный). Условные обозначения: Е – эпидермис; PS – перипоический синус; С – роговица; L – хрусталик; ЕС – внутриглазная полость; ML и PL – микровиллярный и пигментный слои сетчатки; RCB и NL – тела и ядра клеток сетчатки соответственно. Калибровка – 50 мкм.

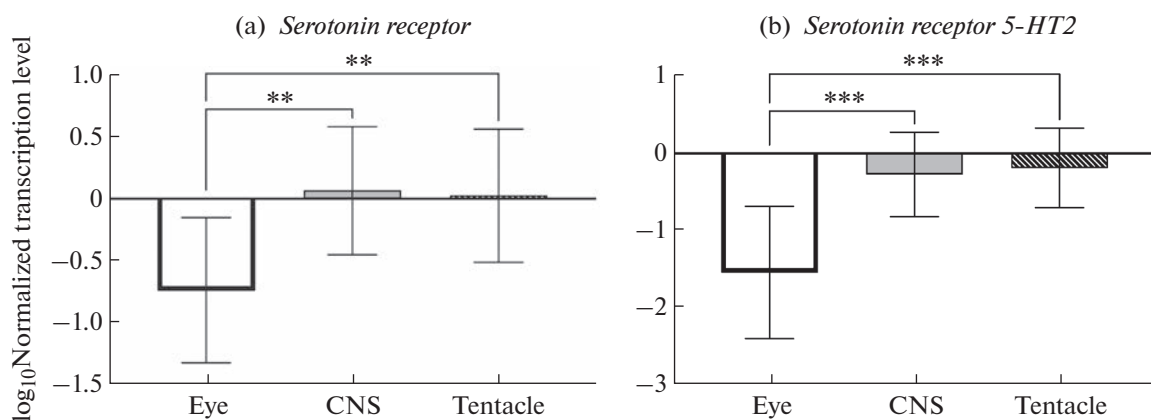


Рис. 5. Относительные уровни транскрипции генов рецепторов серотонина *Lymnaea stagnalis*, нормализованные на референсный ген (*Gapdh*) и представленные в логарифмической шкале. Все результаты представлены как среднее $\pm$ SD. ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

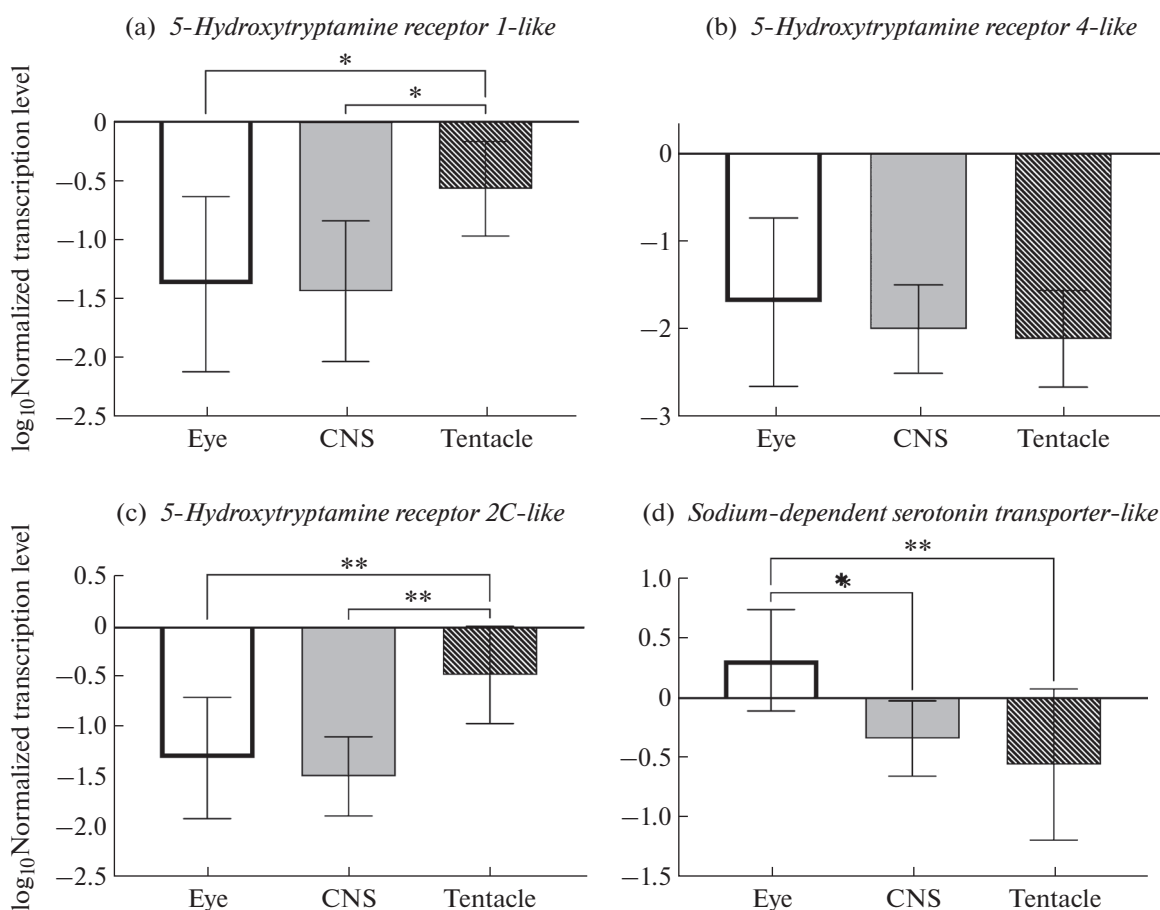


Рис. 6. Уровни транскрипции генов рецепторов и транспортера серотонина *Potamococcus canaliculatus*, нормализованные на референсный ген (*Gapdh*) и представленные в логарифмической шкале. Все результаты представлены как среднее $\pm$ SD. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

регуляции физиологических процессов, включая самые сложные из них. Он широко представлен в организме животных различного уровня филогенетического развития [19]. У брюхоногих моллюсков

серотонин вовлечен в управление многими функциями, начиная с регуляции мышечной активности [20] до сложных форм поведения, включая ассоциативное научение, память и принятие решений [21]. Сво-

ей работой мы продолжаем накопление свидетельств участия серотонина в контроле фоторецепторных процессов у брюхоногих моллюсков. В пользу предположения о существовании такого механизма свидетельствуют описанные выше результаты. В частности, у *L. stagnalis* наличие вокруг глазного бокала пространственно организованного сплетения волокон, содержащих 5-НТ, а также обнаружение в тканях глаза транскриптов рецепторов серотонина дополняют полученные ранее факты изменения электроретинограммы в результате аппликации этого медиатора [22]. При этом наличие у *P. canaliculata* в области глаза топографически выраженного сплетения 5-НТ-иммунореактивных волокон хорошо соответствует обнаружению там транскриптов генов не только 5-НТР, но и транспортера серотонина. Это позволяет предположить возможность модуляции серотонином электрических процессов в сетчатке этого моллюска что, несомненно, должно быть проверено в физиологическом эксперименте. Отметим, что развитая сеть серотонинергических волокон простирается у исследованных моллюсков за пределы глаза и вне структурной связи с ним. Однако повышенная плотность распределения и пространственная ориентация 5-НТ-иммунореактивных волокон в области сетчатки дают основания предполагать их специфическую роль в отношении глаза. Кроме того, наличие в тканях глаз транскриптов генов рецепторов 5-НТ свидетельствует о присутствии, скорее всего в сетчатке, клеток-мишеней серотонинергической иннервации. Наличие серотонинергических нейронов в центральных ганглиях *L. stagnalis* и высокое содержание в них 5-НТ [23] предполагают наличие там механизмов его трансмембранного транспорта, что должно стать предметом дальнейшего анализа. Развитая периферическая сеть серотонинергических волокон описана также в коже различных отделов тела [24] и репродуктивных органах *L. stagnalis* [25], что, вероятно, подчеркивает типичность такого механизма регуляции в организме моллюска.

Результаты количественной оценки ОУТ генов рецепторов 5-НТ прежде всего подтверждают распространенность серотонинергических механизмов в организме моллюсков, в том числе и периферических его отделах, конкретно в глазах и щупальцах этих животных. В первом приближении они могут быть интерпретированы как показатель количества или плотности посадки молекулярных мишеней. Однако они не дают пока оснований делать выводы об их относительной эффективности и функциональной важности 5-НТ в этих органах. Располагая на данный момент только данными о содержании серотонина в центральных ганглиях *L. stagnalis* [23], мы не можем провести корреляцию между этим показателем и ОУТ генов рецепторов.

Полученные результаты уместно рассматривать в контексте функционального значения серото-

нина в глазах животных различного уровня эволюционного развития, хотя, несмотря на широкую распространенность серотонинергических механизмов в нервной системе животных [26], об их участии в осуществлении зрительных функций известно не так много [7]. Есть свидетельства, что 5-НТ играет роль нейромодулятора в сетчатке позвоночных, амакриновые клетки которой синтезируют и выделяют 5-НТ, а биполярные, ганглиозные клетки и терминалы фоторецепторов экспрессируют несколько типов 5-НТР [7]. При этом ганглиозные клетки сетчатки также содержат 5-НТ и, возможно, могут осуществлять свое влияние на центральном уровне по серотонинергическому механизму. 5-НТ обнаружен также в структурах ретинопетальной системы позвоночных и, таким образом, возможно, опосредует модулирующее влияние мозга на функции сетчатки [27].

Среди беспозвоночных животных присутствие серотонинергических волокон, а также функциональное влияние 5-НТ на сетчатку установлено у моллюсков и членистоногих нескольких видов. У ряда изученных животных этих таксонов физиологическая активность 5-НТ проявляется в модулирующем влиянии на циркадианные ритмы и генерирующие их нейроны. Такое влияние оказывают серотонинергические клетки на световую чувствительность фоторецепторов 6-го абдоминального ганглия раков [28]. В ганглиозном слое оптической доли мозга *Procambarus clarkii* волокна с 5-НТ-подобной иммунореактивностью обнаруживаются в непосредственной близости от аксонов фоторецепторов. При этом показано, что антагонисты 5-НТ способны блокировать ретракцию гранул экранирующего пигмента в фоторецепторах в ночное время. По-видимому, 5-НТ действует как модулятор ночной фазы циркадного цикла световой чувствительности фоторецепторов сетчатки рака [29]. Суточная периодичность наблюдается и в уровне экспрессии 5-НТ-рецепторов в глазных стебельках рака [30]. В оптической доле мозга мухи *Calliphora* также присутствуют группы 5-НТ-иммунореактивных нейронов, которые получают входы от аксонов фоторецепторов. Вероятно, что эти нейроны управляют циркадианными ритмами световой чувствительности фоторецепторов глаза, что было показано в опытах с инъекцией серотонина и его антагонистов [31].

У головоногих моллюсков влияние серотонина на глаз связано с регуляцией его световой чувствительности. Так, в сетчатке осьминога *Octopus vulgaris* динамика миграции экранирующего пигмента, перемещение которого является одним из механизмов световой адаптации глаза, управляется, по крайней мере частично, серотином [32]. Имеются данные о присутствии клеток и волокон с 5-НТ-подобной иммунореактивностью в сетчатке, зрительном нерве, а также зрительной доле осьминога и даже его хрусталике [8].

Однако наиболее детальные исследования роли 5-НТ в осуществлении зависящих от света циркадианных процессов выполнены на брюхоногих моллюсках. Так, у *Hermisenda crassicornis* серотонин изменяет реакции на свет фоторецептора В, являющегося элементом нейронального механизма ассоциативного научения в виде образования окуло-вестибулярного рефлекса [33–35]. У *A. californica* [6, 9] центрифугальные влияния на циркадианный пейсмейкер глаза осуществляются при участии 5-НТ-ергической иннервации. 5-НТ-иммунореактивность выявлена в сетчатке еще одного морского брюхоногого моллюска *Bulla gouldiana* [10], в составе глаза которого также находятся клетки циркадианного пейсмейкера.

Таким образом, присутствие серотонинергических механизмов в структурах глаза является довольно типичным явлением у животных различного уровня филогенетического развития. В этом смысле исследуемые пресноводные моллюски не являются исключением. Заметим, однако, что утверждать функциональную роль серотонина в глазах можно пока только в отношении *L. stagnalis* [22]. Что касается *P. canaliculata*, то такое утверждение носит характер предположения до получения физиологических эффектов серотонина.

В настоящее время нет структурных свидетельств присутствия в структуре глаз *L. stagnalis* и *P. canaliculata* нейронов, которые могли бы выполнять функции циркадианного пейсмейкера [36, 37], подобно тому как это происходит в глазах *A. californica* и *B. gouldiana* [38]. Поэтому более правдоподобным представляется предположение о механизме модуляции световой чувствительности фоторецепторов или же регуляции миграции гранул экранирующего пигмента. Достаточно плотная сеть нервных волокон, окружающих глазной бокал, может оказывать на многочисленные фоторецепторные клетки сетчатки *L. stagnalis* и *P. canaliculata* генерализованное влияние, приводя их световую чувствительность в соответствие с уровнем освещения окружающей обстановки.

Другим остающимся пока нерешенным вопросом остается идентификация тел клеток, образующих ветвления 5-НТ-ергических волокон в периферической области глаза моллюсков. В этой работе мы не получили свидетельств колокализации окрашивания ядер с визуализацией 5-НТ-иммунореактивности у *L. stagnalis*. Также, очевидно, что 5-НТ-иммунореактивные волокна не принадлежат фоторецепторным клеткам сетчатки, аксоны которых формируют оптический нерв [11]. Кроме того, ранее было показано, что центральные нейроны, осуществляющие билатеральную иннервацию глаз *L. stagnalis*, не являются серотонинергическими и, следовательно, не могут быть источником 5-НТ-ергических волокон выявляемого периокулярного сплетения [39]. Это может означать, что тела кле-

ток, образующих указанные нервные сплетения у *L. stagnalis*, вероятно, локализируются на периферии вдали от ветвлений их отростков. У *P. canaliculata* довольно плотная сеть 5-НТ-ергических волокон похожа на ветвления в сетчатке отростков нейронов некоторых брюхоногих моллюсков [40]. Однако при этом мы также не обнаруживаем в ней тел 5-НТ-ергических нейронов. В плане понимания возможного функционального значения периокулярных сплетений серотонинергических волокон этот вопрос имеет принципиальное значение и требует дальнейшего изучения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводившиеся с участием животных, соответствовали этическим нормам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась за счет средств бюджета Высшей школы живых систем ОНК “Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)” Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (И.Н.Д., В.В.Ж.), сбор данных (И.Н.Д., А.Х.Х., В.В.К., М.В.С.), обработка данных (И.Н.Д., А.Х.Х., В.В.К., М.В.С.), написание и редактирование манускрипта (И.Н.Д., В.В.Ж.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность инженеру-исследователю Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта В. Малащенко за предоставленную возможность и помощь в работе с конфокальным микроскопом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tierney AJ (2018) Invertebrate serotonin receptors: a molecular perspective on classification and pharmacology. J Exp Biol 221(Pt 19): jeb184838. <https://doi.org/10.1242/jeb.184838>
2. Bacqué-Cazenave J, Bharatiya R, Barrière G, Delbecq JP, Bouguiyoud N, Di Giovanni G, Cattaert D, De Deurwaerdère P (2020) Serotonin in Animal Cognition and

- Behavior. *Int J Mol Sci* 21 (5): 1649.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051649>
3. Sizemore TR, Hurley LM, Dacks AM (2020) Serotonergic modulation across sensory modalities. *J Neurophysiol* 123 (6): 2406–2425.
<https://doi.org/10.1152/jn.00034.2020>
 4. Yamoah EN, Crow T (1996) Protein kinase and G-protein regulation of Ca^{2+} currents in *Hermisenda* photoreceptors by 5-HT and GABA. *J Neurosci* 16 (15): 4799–4809.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-15-04799.1996>
 5. Razy-Krajka F, Brown ER, Horie T, Callebert J, Sasakura Y, Joly JS, Kusakabe TG, Vernier P. (2012) Monoaminergic modulation of photoreception in ascidian: evidence for a proto-hypothalamo-retinal territory. *BMC Biol* 10: 45.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-45>
 6. Colwell CS (1990) Light and serotonin interact in affecting the circadian system of *Aplysia*. *J Comp Physiol A* 167 (6): 841–845.
<https://doi.org/10.1007/BF00189772>
 7. Masson J (2019) Serotonin in retina. *Biochimie* 161: 51–55.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.006>
 8. Kito-Yamashita T, Haga C, Hirai K, Uemura T, Kondo H, Kosaka K (1990) Localization of serotonin immunoreactivity in cephalopod visual system. *Brain Res* 521 (1–2): 81–88.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91527-n](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91527-n)
 9. Takahashi JS, Nelson DE, Eskin A (1989) Immunocytochemical localization of serotonergic fibers innervating the ocular circadian system of *Aplysia*. *Neuroscience* 28 (1): 139–147.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90238-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90238-8)
 10. Michel S, Schoch K, Stevenson PA (2000) Amine and amino acid transmitters in the eye of the mollusc *Bulla gouldiana*: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 425 (2): 244–256.
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000918\)425:2](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000918)425:2)
 11. Zhukov VV (2007) On the problem of retinal transmitters of the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J Evol Biochem Phys* 43: 524–532.
<https://doi.org/10.1134/S0022093007050118>
 12. Zhukov VV, Tuchina OP, Meyer-Rochow VB (2012) Serotonin immunoreactivity in the eye and optic nerve of pulmonate gastropod molluscs. *J Evol Biochem Phys* 48: 471–473.
<https://doi.org/10.1134/S0022093012040123>
 13. Sugamori KS, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HH (1993) Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1): 11–15.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.11>
 14. Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Van Heerikhuizen H (1996) Functional characterisation of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Pharmacol* 311 (2–3): 249–258.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00410-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00410-4)
 15. Benatti C, Colliva C, Blom JMC, Ottaviani E, Tascetta F (2017) Transcriptional effect of serotonin in the ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *ISJ* 14 (1): 251–258.
<https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v14i1.251-258>
 16. OligoArchitect™ Online. Glossary of Parameters.
 17. Young AP, Landry CF, Jackson DJ, Wyeth RC (2019). Tissue-specific evaluation of suitable reference genes for RT-qPCR in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *PeerJ* 7: e7888.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7888>
 18. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 19. Gillette R (2006) Evolution and function in serotonergic systems. *Integr Comp Biol* 46 (6): 838–846.
<https://doi.org/10.1093/icb/icl024>
 20. Longley RD, Peterman M (2013) Neuronal control of pedal sole cilia in the pond snail *Lymnaea stagnalis* appressa. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 99 (1): 71–86.
<https://doi.org/10.1007/s00359-012-0770-x>
 21. Aonuma H, Mezheritskiy M, Boldyshev B, Totani Y, Vorontsov D, Zakharov I, Ito E, Dyakonova V (2020) The Role of Serotonin in the Influence of Intense Locomotion on the Behavior Under Uncertainty in the Mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Front Physiol* 11: 221.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00221>
 22. Жуков ВВ, Кононенко НЛ, Панормов ИБ., Борисенко ИЛ (2006) Серотонин изменяет электрические реакции глаза *Lymnaea stagnalis* на световую стимуляцию. Сенсорные системы 20 (4): 270–278. [Zhukov VV, Kononenko NL, Panormov IB, Borisenko IL (2006) Serotonin изменяет электрические реакции глаза *Lymnaea stagnalis* на световую стимуляцию. Sensornye sistemy 20 (4): 270–278. (In Russ)].
 23. Aonuma H, Totani Y, Sakakibara M, Lukowiak K, Ito E (2018) Comparison of brain monoamine content in three populations of *Lymnaea* that correlates with taste-aversive learning ability. *Biophys Physicobiol* 15: 129–135.
https://doi.org/10.2142/biophysico.15.0_129
 24. Horváth R, Battonyai I, Máász G, Schmidt J, Fekete ZN, Elekes K (2020) Chemical-neuroanatomical organization of peripheral sensory-efferent systems in the pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Brain Struct Funct* 225 (8): 2563–2575.
<https://doi.org/10.1007/s00429-020-02145-z>
 25. Ivashkin EG, Khabarova MYu, Melnikova VI, Kharchenko OA, Voronezhskaya EE (2017) Local serotonin-immunoreactive plexus in the female reproductive system of hermaphroditic gastropod mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Zoology* 14 (2): 134–139.
<https://doi.org/10.15298/invertzool.14.2.06>
 26. Azmitia EC (2007) Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *Int Rev Neurobiol* 77: 31–56.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)77002-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)77002-7)
 27. Repérant J, Ward R, Miceli D, Rio JP, Médina M, Kenigfest NB, Vesselkin NP (2006) The centrifugal visual system of vertebrates: a comparative analysis of its functional anatomical organization. *Brain Res Rev* 52 (1): 1–57.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.11.00>
 28. Rodríguez-Sosa L, Calderón-Rosete G, Villalobos MGP, Mendoza Zamora E, González VA (2006) Serotonin modulation of caudal photoreceptor in crayfish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142 (3–4): 220–230.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.006>

29. Aréchiga H, Bañuelos E, Frixione E, Picones A, Rodríguez-Sosa L (1990) Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine. *J Exp Biol* 150: 123–143. <https://doi.org/10.1242/jeb.150.1.123>
30. Calderón-Rosete G, Flores G, Rodríguez-Sosa L (2006) Diurnal rhythm in the levels of the serotonin 5-HT_{1A} receptors in the crayfish eyestalk. *Synapse* 59 (6): 368–373. <https://doi.org/10.1002/syn.20252>
31. Chen B, Meinertzhagen IA, Shaw SR (1999) Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF. *J Comp Physiol A* 185 (5): 393–404. <https://doi.org/10.1007/s003590050400>
32. Muñoz JL, López Patiño MA, Hermosilla C, Conde-Sieira M, Soengas JL, Rocha F, Míguez JM (2011) Melatonin in octopus (*Octopus vulgaris*): tissue distribution, daily changes and relation with serotonin and its acid metabolite. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197 (8): 789–797. <https://doi.org/10.1007/s00359-011-0641-x>
33. Crow T, Bridge MS (1985) Serotonin modulates photoreponses in *Hermisenda* type-B photoreceptors. *Neurosci Lett* 60(1):83–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90385-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90385-4)
34. Farley J, Wu R (1989) Serotonin modulation of *Hermisenda* type B photoreceptor light responses and ionic currents: implications for mechanisms underlying associative learning. *Brain Res Bull* 22 (2): 335–351. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90061-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90061-0)
35. Grover LM, Farley J, Auerbach SB (1989) Serotonin involvement during in vitro conditioning of *Hermisenda*. *Brain Res Bull* 22 (2): 363–372. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90063-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90063-4)
36. Seyer JO, Nilsson DE, Warrant E (1998) Spatial vision in the prosobranch gastropod *Ampularia* sp. *J Exp Biol* 201 (Pt 10): 1673–1679. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.10.1673>
37. Zieger MV, Meyer-Rochow VB (2008) Understanding the cephalic eyes of pulmonate gastropods: A review. *Am Malac Bull* 26: 47–66. <https://doi.org/10.4003/006.026.0206>
38. Block GD, Khalsa SB, McMahon DG, Michel S, Guesz M (1993) Biological clocks in the retina: cellular mechanisms of biological timekeeping. *Int Rev Cytol* 146: 83–144. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60381-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60381-2)
39. Zhukov VV, Tuchina, OP (2008) Structure of visual pathways in the nervous system of freshwater pulmonate molluscs. *J Evol Biochem Phys* 44: 341–353. <https://doi.org/10.1134/S0022093008030113>
40. Zaitseva OV (1994) Structural organization of the sensory systems of the snail. *Neurosci Behav Physiol* 24 (1): 47–57. <https://doi.org/10.1007/BF02355652>

SOME COMPONENTS OF THE SEROTONERGIC SYSTEM IN THE EYES OF TWO SPECIES OF FRESHWATER MOLLUSCS

I. N. Dominova^a, A. A. Husenova^a, V. V. Kotova^a, M. V. Sidorova^a, and V. V. Zhukov^{a, #}

^a*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

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

Labeling of 5-HT-immunoreactive structures was performed on eye slices of freshwater molluscs *Lymnaea stagnalis* and *Pomacea canaliculata*. In the periocular region of both species an increased density of 5-HTergic fibers forming structurally distinct plexuses and partially penetrating into the retina was detected. Transcription of serotonin receptor genes was detected in eye tissues: two types in *L. stagnalis* and three in *P. canaliculata*. Its relative level is significantly upregulated compared with central ganglia of the nervous system and tentacles. Additionally transcription of the 5HT transporter gene was recorded in *P. canaliculata* tissues. The obtained results are discussed in terms of a possible serotonergic mechanism of modulation of processes in the retina of gastropods.

Keywords: *Lymnaea stagnalis*, *Pomacea canaliculata*, retina, serotonin, immunoreactivity, gene transcription, 5-HT receptors, serotonin transporter

МЕДИАТОРЫ СИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ АТФ И НОРАДРЕНАЛИН В МОДУЛЯЦИИ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ГЛУБОКОМ ОХЛАЖДЕНИИ ОРГАНИЗМА

© 2023 г. Т. В. Козырева^{1,*}, Е. С. Мейта^{1,**}

¹НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

*e-mail: kozyrevatv@neuronm.ru

**e-mail: meytaes@neuronm.ru

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 14.10.2023 г.

Принята к публикации 22.10.2023 г.

В экспериментах на крысах исследовалось участие со-медиаторов симпатической нервной системы в угнетающем влиянии глубокого охлаждения на антителообразующую функцию селезенки. Изучалось: 1) воздействие глубокого охлаждения (снижение глубокой температуры на 3–4°C), 2) введение медиатора симпатической нервной системы норадреналина (НА, 1 мг/мл), 3) его со-медиатора АТФ (0.01 и 10 мг/мл) и 4) блокатора P2X-пуриnergических рецепторов PPADS на количество антителообразующих клеток селезенки в ответ на иммунизацию эритроцитами барана. Глубокое охлаждение и АТФ угнетали, тогда как НА стимулировал антителообразование в селезенке. Блокада P2X-пуриnergических рецепторов с помощью PPADS стимулировала антителообразование в норме. На фоне блокады P2X-пуриnergических рецепторов угнетающее действие АТФ и глубокого охлаждения на антителообразование не проявлялось. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии со-медиаторов симпатической нервной системы на антителообразование в селезенке и позволяют считать, что угнетающее действие холода на антителообразование в селезенке происходит с участием АТФ через P2X пуриnergические рецепторы.

Ключевые слова: глубокое охлаждение, норадреналин, АТФ, иммунный ответ, блокатор P2X пуриnergических рецепторов, PPADS

DOI: 10.31857/S0044452923060062, **EDN:** GJUEBC

ВВЕДЕНИЕ

Реакция организма на воздействие того или иного фактора является комбинацией ответов различных физиологических систем организма. Охлаждение оказывает влияние практически на все функциональные системы организма, включая иммунную. Показано, что глубокое охлаждение приводит к угнетению иммунного ответа на антиген в селезенке, причем это проявляется в угнетении как антигенсвязывания, так и антителообразования [1–4].

Хорошо известно, что холодовое воздействие на организм вызывает активацию симпатической нервной системы, которое сопровождается выбросом норадреналина в кровь из симпатических нервных окончаний [5–8]. Механизм реализации действия эндогенного и экзогенного норадреналина на функцию различных органов и тканей предполагает вовлечение различных групп адренорецепторов [9, 10].

К настоящему времени наглядно продемонстрирована симпатическая и пуриnergическая со-трансмиссия, т.е. при активации симпатических

нервных окончаний выделяется не только норадреналин (НА), но и другие биологически активные вещества, в том числе и аденозин-5'-трифосфат (АТФ) [11–15]. Симпатическая нервная система, иннервируя иммунные органы, выделяет свои со-трансммиттеры – НА и АТФ – в непосредственной близости от иммунных клеток [16, 17]. АТФ, действуя как сигнальная молекула и активируя пуриnergические рецепторы, может участвовать в формировании иммунного ответа организма [18]. АТФ взаимодействует с пуриnergическими рецепторами клеток и индуцирует их различные реакции.

Существование со-медиаторов предполагает вариации механизмов нейромодуляции иммунных процессов. Роль АТФ, как нейротрансммиттера, в формировании иммунного ответа организма на холодовое воздействие не исследовалась. Учитывая то, что АТФ является со-медиатором норадреналина, важно понять, на какие составляющие иммунной реакции оказывают влияние каждый из этих медиаторов, а также через какие типы пуриnergических рецепторов реализуется влияние АТФ. Для

изучения физиологической роли вещества, действующего через рецепторы клеточной мембраны, необходимы специфические блокаторы этих рецепторов. Показано, что пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота (PPADS) блокирует ионотропные P2X рецепторы АТФ [19, 20].

В настоящем исследовании предпринята попытка выяснить вклад пуринергической системы в механизмы взаимоотношения терморегуляторной и иммунной систем в условиях глубокого охлаждения организма. Мы попытались ответить на следующие вопросы: (1) какой из со-медиаторов симпатической нервной системы НА или АТФ ответствен за угнетение антителообразования в селезенке, которое происходит при глубоком охлаждении, (2) выяснить возможность участия P2X пуринергических рецепторов в эффектах АТФ и глубокого охлаждения на антителообразование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В экспериментах использовались крысы-самцы Вистар массой 270–290 г, содержавшиеся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры, включая фиксацию термопары, ионофорез, охлаждение и иммунизацию на пике охлаждения, проводились на анестезированных крысах, чтобы исключить эмоциональную составляющую и движение животных. Каждое животное использовалось только один раз.

Введение АТФ, НА и PPADS

Ионофорез биологически активных веществ АТФ (Fluka, BioChemika) и норадреналин (НА) (Sigma) производили с использованием системы доставки лекарств (медицинский гальванизатор “Поток”, Россия); сила тока составляла 0.08 мА/см² на площади 25 см² в течение 20 мин. PPADS (Sigma) вводили внутривенно. Температура применяемых растворов составляла 37–38°C. В опытных группах животным перед охлаждением проводилось внутривенное введение или ионофорез 1 мл того или иного вещества в кожу живота (область последующего приложения холодового стимула).

Охлаждение

Эксперименты проводились при температуре воздуха в помещении 24–25°C. Исходно с помощью водяного термодатчика и термостата поддерживались температура кожи живота $37.3 \pm 0.13^\circ\text{C}$, ректальная температура $38.1 \pm 0.11^\circ\text{C}$. Использовалась модель быстрого охлаждения с вовлечением динамической и статической компонент активности кожных терморепцепторов. Охлаждение проводилось с помощью термодатчика и термостата в области

живота, предварительно освобожденной от шерсти, со скоростью $0.1^\circ\text{C}/\text{с}$, площадь охлаждаемой поверхности составляла 25 см². Во всех случаях глубина охлаждения животных была одинаковой, до снижения ректальной температуры на 3–4°C. Для контроля глубины и скорости охлаждения ректальную температуру и температуру кожи измеряли с помощью термопар и регистрировали с помощью системы “БИОРАС” (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, США).

Экспериментальные группы животных

Для выявления иммуномодулирующих эффектов животных подвергали экспериментальному воздействию по одной из указанных схем: (1) анестезия, иммунизация (контроль, $n = 19$); (2) анестезия, охлаждение, иммунизация на пике охлаждения (влияние быстрого глубокого охлаждения, предшествующего иммунизации, на иммунный ответ (БГО, $n = 12$)); (3) анестезия, ионофорез биологически активных веществ, иммунизация (влияние биологически активных веществ на иммунный ответ в термонейтральных условиях (АТФ 0.001 мг/мл, $n = 13$; АТФ 10 мг/мл, $n = 11$; НА 1 мг/мл, $n = 10$; PPADS 0.001 мг/мл, $n = 12$; АТФ 0.001 мг/мл + PPADS 0.001 мг/мл, $n = 12$)); и (4) анестезия, ионофорез биологически активных веществ, быстрое глубокое охлаждение (БГО), иммунизация (влияние охлаждения на фоне биологически активных веществ на иммунный ответ (НА 1 мг/мл + БГО, $n = 10$; PPADS 0.001 мг/мл + БГО, $n = 10$; АТФ 0.001 мг/мл + PPADS 0.001 мг/мл + БГО, $n = 14$)).

Иммунизация и забор материала

Животных иммунизировали эритроцитами барана (внутрибрюшинное введение 5×10^8 эритроцитов барана в 0.5 мл 0.9%-ного NaCl) на пике охлаждения, в момент снижения ректальной температуры на 3–4°C. На пятые сутки после процедур охлаждения и иммунизации животных декапитировали и производили забор селезенки для иммунологического анализа.

Выделение клеток селезенки

Селезенку забирали во флакончик со средой, затем вынимали, очищали от жира и взвешивали. Из середины селезенки, захватывая все слои, ножницами отрезали кусочек, взвешивали на торсионных весах, помещали в среду. Вес кусочка составлял 100–200 мг. Результаты взвешивания фиксировали в журнале.

В гомогенизатор наливали 1.5 мл среды Хенкса и гомогенизировали вышеуказанную часть селезенки двумя плавными движениями. Добавляли еще 1.5 мл среды, встряхивали. Полученную смесь фильтровали через металлическую сеточку. Ядро-

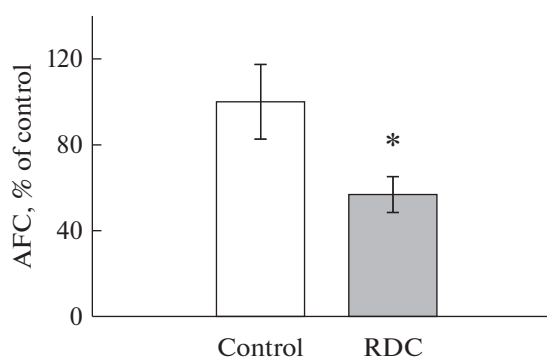


Рис. 1. Влияние быстрого глубокого охлаждения (БГО, RDC-Rapid Deep Cooling) на показатели антителообразования в селезенке у крыс. Контроль принят за 100% — исходные показатели у животных в термонейтральных условиях без воздействия холода. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) — АОК (антителообразующие клетки).

содержащие клетки, если было необходимо знать их количество, подсчитывали в камере Горяева.

Иммунная реакция

Антителообразование (АОК) в селезенке оценивалось по количеству бляшкообразующих клеток с помощью метода локального гемолиза [21, 22]. Принцип метода заключается в следующем: иммунные лимфоциты инкубируются с эритроцитами барана (ЭБ), которыми проводили иммунизацию. Секретируемые иммунными лимфоцитами антитела диффундируют в окружающее пространство и фиксируются на эритроцитах. Добавление комплемента вызывает лизис эритроцитов с присоединенными антителами, и вокруг лимфоцитов, выделивших антитела, образуются прозрачные зоны гемолиза, число которых можно сосчитать.

Для определения АОК в жидкой среде готовили инкубационную смесь: 0.8 мл разведенной в 50 раз клеточной суспензии, 0.1 мл суспензии ЭБ (4×10^9) и 0.1 мл разведенной в 1.5 раза сыворотки морской свинки (источник комплемента). Компоненты перемешивали, смесь заливали в стеклянные камеры для подсчета зон гемолиза. Объем камеры фиксировался для последующего подсчета антителообразующих клеток во всей селезенке.

Расчет АОК на селезенку производили по следующей формуле:

$$A = \frac{n}{(0.8 \times V_k)} \times S \times V_1 \times \frac{M_1}{M_2}$$

Где A — количество АОК в селезенке;

n — количество АОК в камере;

V_k — объем камеры;

S — разведение;

V_1 — исходный объем;

M_1 — масса всей селезенки;

M_2 — масса кусочка селезенки.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 8 (Statsoft Russia). Проверку на нормальность распределения проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения идентичных показателей в контрольной и экспериментальной группах использовали t -критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Критический уровень значимости принимался равным 5% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Быстрое глубокое охлаждение (БГО) со снижением ректальной температуры на $3-4^\circ\text{C}$ приводило к угнетению антителообразования в селезенке, количество антителообразующих клеток в селезенке снижалось в два раза ($p < 0.05$) при быстром глубоком охлаждении (рис. 1). Что подтверждает данные, ранее полученные нами и другими исследователями [4, 23, 24].

Для выявления ведущего медиатора в эффекте глубокого охлаждения на антителообразование проводились следующие исследования.

Ионофоретическое введение НА (1 мг/мл) вызывало стимуляцию антителообразования в селезенке в два раза (рис. 2), т.е. эффект НА в данном случае был противоположным эффекту глубокого охлаждения (БГО). Глубокое охлаждение на фоне предварительного введения НА также приводило к угнетению уровня антителообразования в селезенке (число антителообразующих клеток селезенки — контроль: 349125.70 ± 42928.28 , $n = 10$; НА+ БГО: 160651.20 ± 55435.45 , $n = 7$; $t = 2.62$, $p < 0.05$), как и при охлаждении без воздействия веществами (рис. 1).

Ионофоретическое введение АТФ, как в концентрации 0.001 мг/мл, так и в концентрации 10 мг/мл приводило к угнетению антителообразования в селезенке более, чем в два раза (рис. 2). Эффект АТФ оказался однонаправленным с действием холода и противоположным эффекту НА, который вызывал стимуляцию антителообразования.

Участие P2X пуриnergических рецепторов в эффектах АТФ на антителообразование. Блокада P2X рецепторов с помощью PPADS в противоположность АТФ вызывала значительную (в 2 раза) стимуляцию антителообразования в селезенке (рис. 3).

Введение же АТФ на фоне блокады P2X рецепторов уже не вызывало статистически значимых изменений антителообразования в селезенке.

Угнетающее влияние глубокого охлаждения на антителообразование в селезенке не проявлялось,

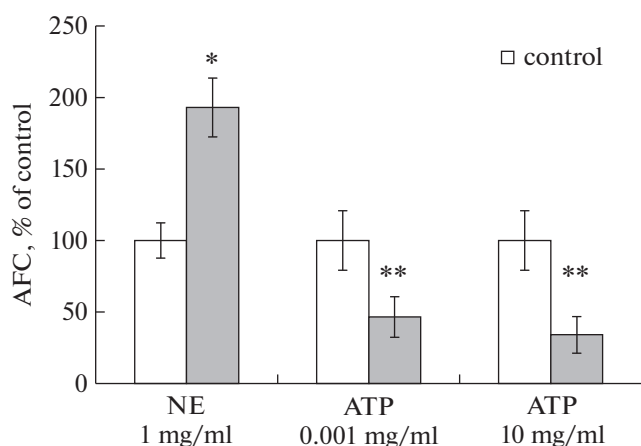


Рис. 2. Влияние норадреналина (НА 1 мг/мл) и АТФ (0.001 и 10 мг/мл) на показатели антителообразования в селезенке у крыс в термонеutralных условиях. Контроль принят за 100% — исходные показатели у животных в термонеutralных условиях без воздействия веществ. * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) — АОК (антителообразующие клетки).

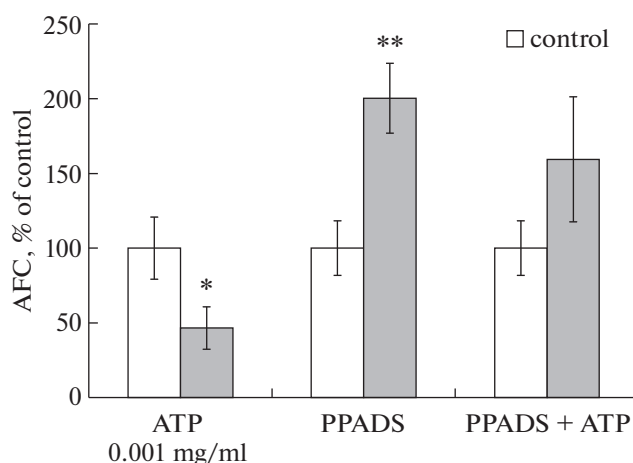


Рис. 3. Влияние АТФ (0.001 мг/мл), блокатора пуриnergических рецепторов PPADS и PPADS на фоне предварительного введения АТФ на показатели антителообразования в селезенке у крыс в термонеutralных условиях. Контроль принят за 100% — исходные показатели у животных в термонеutralных условиях без воздействия веществ. * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) — АОК (антителообразующие клетки).

если охлаждение проводилось после предварительного введения блокатора P2X рецепторов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что два со-медиатора симпатической нервной системы могут по-разному изменять характер антителообразования в селезенке. НА преимущественно стимулирует антителообразование, тогда как АТФ в исследованных дозах, наоборот, угнетает. Угнетающий эффект глубокого охлаждения на антителообразование, по-видимому, связан именно с АТФ. Об этом свидетельствуют следующие результаты, полученные в настоящем исследовании. В термонеutralных условиях НА стимулирует антителообразование, тогда как АТФ его угнетает. Глубокое охлаждение на фоне НА угнетает антителообразование, т.е. предварительное введение НА не снимает угнетающего эффекта глубокого охлаждения. АТФ угнетающе влияет на антителообразование в термонеutralных условиях, при этом предварительная блокада пуриnergических P2X рецепторов предотвращает это угнетающее действие АТФ. Угнетающее действие глубокого охлаждения также не проявляется на фоне блокады P2X рецепторов. Это свидетельствует о том, что именно P2X рецепторы вовлечены в угнетающее действие АТФ на антителообразование при глубоком охлаждении. В литературе имеются немногочисленные факты, свидетельствующие о специфической температурной чувствительности пуриnergических P2X3 рецепторов [25, 26], и взаимосвязи P2X7 рецепторов с

регулированием температуры тела, особенно при воспалении [27, 28].

Попав в кровь, АТФ, помимо паракринной роли как межклеточного мессенджера, высвобождаемый клетками, также может действовать аутокринно, что помогает регулировать и настраивать функции клеток [18, 29]. Высвобождение АТФ из иммунных кле-

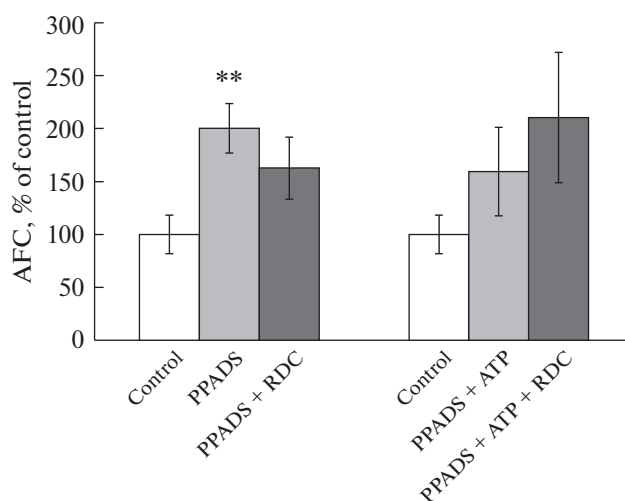


Рис. 4. Влияние быстрого глубокого охлаждения (RDC) после предварительного введения PPADS или сочетания PPADS+АТФ на антителообразование в селезенке у крыс. Контроль принят за 100% — исходные показатели у животных в термонеutralных условиях без воздействия веществ или холода. ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем. AFC (Antibody Forming Cells) — АОК (антителообразующие клетки).

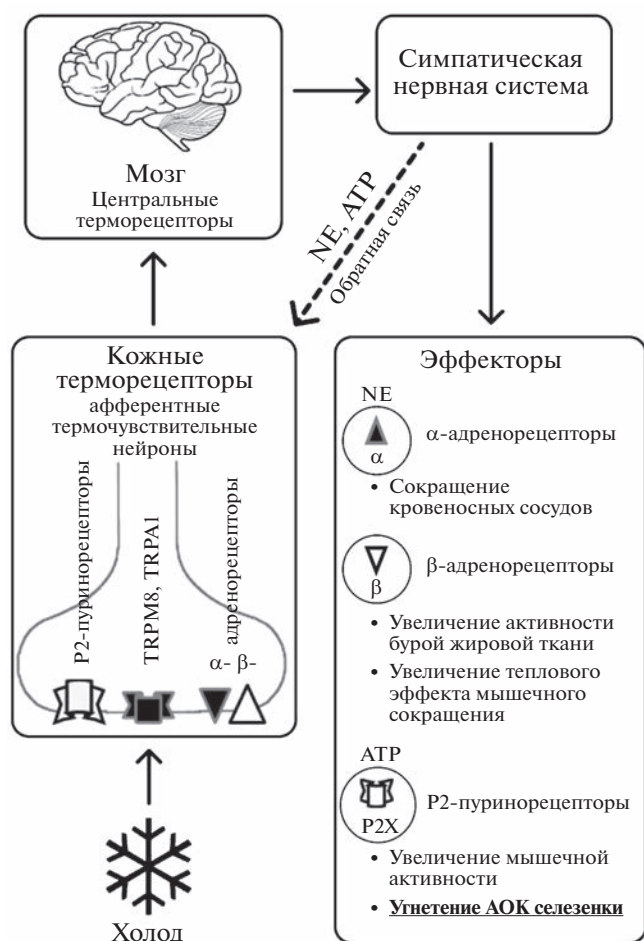


Рис. 5. Схема развития реакций организма на внешнее охлаждение. Переработано и дополнено из [40]. Факты, установленные в настоящем исследовании, подчеркнуты. АОК — антителообразующие клетки.

ток происходит в субклеточных доменах, где локально высвобождаемый АТФ стимулирует пуриnergические рецепторы, которые регулируют функциональные клеточные ответы [30–32]. Иммуные клетки, например, высвобождают АТФ в ответ на различные стимулы и формируют око-локлеточные горячие точки АТФ, которые активируют соседние пуриnergические рецепторы, и тем самым помогают инициировать и управлять последующими функциональными клеточными реакциями, такими как миграция клеток, распознавание антигена и другие важные задачи, необходимые для защиты организма [33–35]. Такие локализованные пуриnergические сигнальные домены обнаруживаются на поверхности нейтрофилов, Т-клеток и других иммунных клеток [36–38].

Ранее нами были получены данные об участии НА и адренорецепторов в модуляции функции антигенсвязывания [4, 9]. Возможно, что два эти процесса, антигенсвязывание и антителообразование,

по-разному реагируют на со-медиаторы симпатической нервной системы. Нами было показано, что при неглубоком охлаждении, когда повышение концентрации НА в крови значительно меньше, чем при глубоком [5], наблюдается стимуляция антигенсвязывания с участием α -адренорецепторов. При глубоком охлаждении и более значительном выбросе НА в кровь, происходит угнетение антигенсвязывания, но уже с участием β -адренорецепторов [9]. Антителообразование при неглубоком охлаждении также стимулируется, а при глубоком — угнетается, но это угнетение, как показывают результаты настоящей работы, связано уже не с НА, а с АТФ и P2X пуриnergическими рецепторами. Следовательно, можно полагать, что при активации симпатической нервной системы два со-медиатора НА и АТФ преимущественно регулируют разные компоненты иммунного ответа организма.

Интересно также отметить, что в механизмах формирования терморегуляторных реакций, НА и АТФ также регулируют разные составляющие терморегуляторного ответа на холод. НА преимущественно влияет на сосудистую реакцию, несократительный термогенез и первую срочную фазу метаболического ответа, тогда как АТФ ответственна за сократительный мышечный термогенез — дрожь [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов и предыдущих исследований, а также данных литературы можно представить следующую схему развития реакции организма на глубокое охлаждение (рис. 5). Внешнее холодное воздействие активирует периферические кожные терморецепторы через термочувствительные ионные каналы (например, TRPM8, TRPA1). Термосенсоры посылают сигнал в структуры мозга, где формируется эфферентный сигнал, который стимулирует симпатическую нервную систему. Со-трансммиттеры симпатической нервной системы норадреналин (НА) и АТФ действуют на эффекторные органы, вызывая констрикцию кожных кровеносных сосудов через α -адренорецепторы, усиливая активность бурой жировой ткани и повышая эффект теплового сокращения мышц, через β -адренорецепторы, усиливая терморегуляторную активность скелетных мышц (дрожь) и угнетая антителообразование клеток (АОК) селезенки через P2X-рецепторы. В то же время НА и АТФ воздействуют на кожные термочувствительные афференты через P2X и адренорецепторы, изменяя их чувствительность к температуре и осуществляя, таким образом, обратную связь с периферическими афферентами.

Таким образом, и прежние данные, и результаты настоящего исследования демонстрируют наличие разных путей реализации у со-медиаторов симпатической нервной системы, т.е. АТФ и НА, воздействуя на различные компоненты, обуславливают

комплексную регулируемую эффекторную реакцию. Уточнение роли каждого из со-медиаторов симпатической нервной системы в эффекторных реакциях требует дополнительных исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета НИИ нейронаук и медицины, протокол № 3-О от 18 марта 2021 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано за счет бюджетного финансирования фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в отношении публикации данной рукописи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Т.В.К.), постановка эксперимента (Е.С.М.), обработка данных (Т.В.К., Е.С.М.), написание и редактирование манускрипта (Т.В.К., Е.С.М.)

БЛАГОДАРНОСТИ

Галине Михайловне Храмовой за оказанное содействие в постановке экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hu GZ, Yang SJ, Hu WX, Wen Z, He D, Zeng LF, Xiang Q, Wu XM, Zhou WY, Zhu QX (2016) Effect of cold stress on immunity in rats. *Exp Therapeut Med* 11 (1): 33–42. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2854>
2. Vialard F, Olivier M (2020) Thermoneutrality and immunity: how does cold stress affect disease? *Front Immunol* 11: 588387. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588387>
3. Kozyreva TV, Eliseeva LS (2000) Immune response in cold exposures of different types. *J Thermal Biol* 25 (5): 401–404. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(99\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(99)00113-8)
4. Kozyreva TV, Gonsales EV, Eliseeva LS (2004) β -adrenoreceptor participation in the formation of the thermoregulatory and immune responses under the effect of rapid deep cooling. *J Therm Biol* 29 (7–8): 819–824. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.08.077>
5. Kozyreva TV, Tkachenko EY, Kozaruk VP, Latysheva TV, Gilinsky MA (1999) Effects of slow and rapid cooling on catecholamine concentration in arterial plasma and the skin. *Am J Physiol* 276 (6): R1668–72. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1668>
6. Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Mickeviciene D, Steponaviciute R, Skurvydas A (2014) Two Strategies for Response to 14°C Cold-Water Immersion: Is there a Difference in the Response of Motor, Cognitive, Immune and Stress Markers? *PLoS ONE* 9 (10): e109020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109020>
7. Gagnon DD, Gagnon SS, Rintamäki H, Törmäkangas T, Puukka K, Herzig KH, Kyröläinen H (2014) The effects of cold exposure on leukocytes, hormones and cytokines during acute exercise in humans. *PLoS One* 9 (10): e110774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110774>
8. Alba BK, Castellani JW, Charkoudian N (2019) Cold-induced cutaneous vasoconstriction in humans: Function, dysfunction and the distinctly counterproductive. *Exp Physiol* 104 (8): 1202–1214. <https://doi.org/10.1113/EP087718>
9. Eliseeva LS, Chramova GM, Gonsales EB, Kozyreva TV (2009) α 1- and β -Adrenoblockers Effects on Immunogenesis in Rats under Thermoneutral Conditions and after Cooling of Various Extent. *Bull Exp Biol Med* 147: 208–212. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0476-4>
10. Gein SV, Karnaukhova AV (2022) The Role of β -Adrenergic Receptors in the Regulation of the Functions of Innate Immune Cells during Cold Stress In Vivo. *Bull of Exp Biol Med* 173 (1): 72–76. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05496-1>
11. Townsend AD, Wilken GH, Mitchell KK, Martin RS, Macarthur H (2016) Simultaneous analysis of vascular norepinephrine and ATP release using an integrated microfluidic system. *J Neurosci Method* 266: 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.03.015>
12. Burnstock G (2017) Purinergic signaling in the cardiovascular system. *Circul Res* 120 (1): 207–228. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>
13. Burnstock G (2020) Introduction to purinergic signalling in the brain. *Glioma signaling*: 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9_1
14. Kennedy C (2021) ATP as a cotransmitter in sympathetic and parasympathetic nerves-another Burnstock legacy. *Autonom Neurosci* 235: 102860. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102860>
15. Burnstock G (2020) Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol Biol* 2041: 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1
16. Haskó G, Szabó C (1998) Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. *Biochem Pharmacol* 56 (9): 1079–1087. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00153-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00153-1)
17. Pongratz G, Straub RH (2014) The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthrit Res Ther* 16: 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13075-014-0504-2>

18. *Cekic C, Linden J* (2016) Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 16 (3): 177–192. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.4>
19. *Cho JH, Jung KY, Jung Y, Kim MH, Ko H, Park CS, Kim YC* (2013) Design and synthesis of potent and selective P2X₃ receptor antagonists derived from PPADS as potential pain modulators. *Eur J Med Chem* 70: 811–830. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.026>
20. *Huo H, Fryatt AG, Farmer LK, Schmid R, Evans RJ* (2018) Mapping the binding site of the P2X receptor antagonist PPADS reveals the importance of orthosteric site charge and the cysteine-rich head region. *J Biol Chem* 293 (33): 12820–12831. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003737>
21. *Шварцман ЯС* (1966) Изучение синтеза антител одноклеточными клетками к растворимым белкам. *Бюл эксп биол мед* 12: 88–92. [Shvartsman YaS (1966) Study of the synthesis of antibodies by single cells to soluble proteins. *Bull Exp Biol Med* 12: 88–92. (In Russ)].
22. *Козлов ВА, Кудяева ОТ, Наумова ЕН, Елисеева ТВ* (1988) Методическое руководство по применению метода локального гемолиза к статистическому оцениванию результатов. Новосибирск. СО АМН СССР: 15. [Kozlov VA, Kudaeva OT, Naumova EN, Eliseeva TV (1988) Methodological guide to the application of the method for determining hemolysis by a statistical method for evaluating results. Novosibirsk. SO AMS USSR: 15. (In Russ)].
23. *Gein SV, Sharav'eva IL* (2018) Immunomodulating effects of cold stress. *Biol Bull Rev* 8: 482–488. <https://doi.org/10.1134/S207908641806004X>
24. *Patrakeeva VP, Basova EE* (2018) Effects of Low Temperatures on the Formation of Adaptive Reactions: A Review. *Internat J Biomed* 8 (2): 95–101. [https://doi.org/10.21103/Article8\(2\)_RA1](https://doi.org/10.21103/Article8(2)_RA1)
25. *Giniatullin R, Nistri A* (2013). Desensitization properties of P2X₃ receptors shaping pain signaling. *Front Cell Neurosci* 7: 245. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00245>
26. *Fabbretti E* (2019) P2X₃ receptors are transducers of sensory signals. *Brain Res Bull* 151: 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.020>
27. *Davis CJ, Taishi P, Honn KA, Koberstein JN, Krueger JM* (2016) P2X₇ receptors in body temperature, locomotor activity, and brain mRNA and lncRNA responses to sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311 (6): R1004–R1012. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00167.2016>
28. *Di Virgilio F, Sarti AC, Grassi F* (2018) Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. *Curr Opin Immunol* 52: 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.026>
29. *Corriden R, Insel PA* (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3: re1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3104re1>
30. *Bao Y, Chen Y, Ledderose C, Li L, Junger WG* (2013) Pannexin 1 channels link chemoattractant receptor signaling to local excitation and global inhibition responses at the front and back of polarized neutrophils. *J Biol Chem* 288: 22650–22657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476283>
31. *Ledderose C, Bao Y, Zhang J, Junger WG* (2015) Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation. *Acta Physiol (Oxf)* 213: 334–345. <https://doi.org/10.1111/apha.12435>
32. *Ledderose C, Bromberger S, Slubowski CJ, Sueyoshi K, Aytan D, Shen Y, Junger WG* (2020) The purinergic receptor P2Y₁₁ choreographs the polarization, mitochondrial metabolism, and migration of T lymphocytes. *Sci Signal* 13: eaba3300. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aba3300>
33. *Wang X, Chen D* (2018) Purinergic regulation of neutrophil function. *Front Immunol* 9: 399. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00399>
34. *Sáez PJ, Vargas P, Shoji KF, Harcha PA, Lennon-Duménil AM, Sáez JC* (2017) ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X₇ receptors. *Sci Signal* 10: eaah7107. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7107>
35. *Borges da Silva H, Beura LK, Wang H, Hanse EA, Gore R, Scott MC, Walsh DA, Block KE, Fonseca R, Yan Y, Hippen KL, Blazar BR, Masopust D, Kelekar A, Vulchanova L, Hogquist KA, Jameson SC* (2018) The purinergic receptor P2RX₇ directs metabolic fitness of long-lived memory CD8⁺ T cells. *Nature* 559: 264–268. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0282-0>
36. *Bao Y, Ledderose C, Graf AF, Brix B, Birsak T, Lee A, Zhang J, Junger WG* (2015) mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 210: 1153–1164. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503066>
37. *Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ* (2016) Regulation of the T cell response by CD39. *Trends Immunol* 37 (7): 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.009>
38. *Ledderose C, Liu K, Kondo Y, Slubowski CJ, Dertnig T, Denicoló S, Arbab M, Hubner J, Konrad K, Fakhari M, Lederer JA, Robson SC, Visner GA, Junger WG* (2018) Purinergic P2X₄ receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *J Clin Invest* 128: 3583–3594. <https://doi.org/10.1172/JCI120972>
39. *Kozyreva TV, Meyta ES, Khramova GM* (2015) Effect of the sympathetic nervous system co-transmitters ATP and norepinephrine on thermoregulatory response to cooling. *Temperature* 2 (1): 121–128. <https://doi.org/10.1080/23328940.2014.1000705>
40. *Kozyreva TV, Meyta ES, Kozaruk VP* (2017) Participation of Purinergic P2X Receptors in the Thermoregulatory Response to Cooling. *Bull Exp Biol Med* 162 (5): 606–610. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3668-3>

MEDIATORS OF THE SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM ATP AND NORADRENALINE IN THE MODULATION OF ANTIBODY FORMATION DURING DEEP COOLING OF THE ORGANISM

T. V. Kozyreva^{a,#} and E. S. Meyta^{a,##}

^a*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

[#]*e-mail: kozyrevatv@neuronm.ru;*

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

In experiments on rats, the participation of co-mediators of the sympathetic nervous system in the suppressive effect of deep cooling on the antibody-forming function of the spleen was studied. Studied: 1) the effect of deep cooling (decrease in deep temperature by 3–4°C), 2) the introduction of the mediator of the sympathetic nervous system norepinephrine (NE, 1 mg/ml), 3) its co-transmitter ATP (0.01 mg/ml and 10 mg/ml) and 4) P2X-purinergeric receptor blocker PPADS on the number of antibody-forming cells of the spleen in response to immunization with sheep erythrocytes. Deep cooling as well as ATP inhibited, while NE stimulated antibody formation in the spleen. Blockade of P2X-purinergeric receptors by PPADS stimulated antibody formation in the norm. Against the background of blockade of P2X-purinergeric receptors, the inhibitory effect of ATP and deep cooling on antibody formation was not manifested. The results obtained indicate the opposite effects of co-mediators of the sympathetic nervous system on antibody formation in the spleen and suggest that the inhibitory effect of cold on antibody formation in the spleen occurs with the participation of ATP through P2X-purinergeric receptors.

Keywords: cold, norepinephrine, ATP, immune response, P2X purinergeric receptor blocker, PPADS

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА NeuN В СПИНАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ, ОРГАНИЗУЮЩИХ ПРОЕКЦИИ К МОЗЖЕЧКУ

© 2023 г. А. А. Вещицкий¹, Н. В. Павлова¹, П. Ю. Шкорбатова¹,
Н. И. Никитина¹, Н. С. Меркульева^{1,*}

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

*e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принята к публикации 22.10.2023 г.

В настоящей работе были проанализированы особенности иммуномечения антителами NeuN нейронов спинного мозга кошки, расположенных в четырех структурах, организующих проекции к мозжечку: ядре Кларка и пограничных клетках — в сегменте L4, центральном шейном ядре — в сегменте С3, и ядре Штиллинга — в сегменте S2. Проведены морфометрическое и денситометрическое исследования. Показано, что все нейроны интереса обладают яркой особенностью: крайне слабым уровнем NeuN-иммуномечения в цитоплазме, с сохранением высокого уровня NeuN-иммуномечения в ядре. Средний размер сомы нейронов интереса составил 1000–1850 мкм², что сопоставимо с другим типом крупных нейронов на срезах — мотонейронами (1140–1660 мкм²), поэтому мы использовали популяции мотонейронов соответствующих сегментов для сравнения величин оптической плотности. Относительная оптическая плотность нейронов интереса была в несколько раз ниже таковой у мотонейронов (0.060 ± 0.030 vs 0.330 ± 0.127). Достоверных отличий по величине оптической плотности между разными структурами интереса не выявлено. Учитывая морфологическую уникальность и схожесть этих четырех популяций клеток, полагаем, что особенность экспрессии белка NeuN может быть использована в качестве простого метода визуализации клеток, организующих проекции к мозжечку, что представляет собой ценность как при целевом морфологическом исследовании, так и при проведении гистологического контроля после физиологического эксперимента.

Ключевые слова: NeuN, спинно-мозжечковые тракты, ядро Кларка, ядро Штиллинга, центральное шейное ядро, пограничные клетки, кошка

DOI: 10.31857/S0044452923060098, **EDN:** HURKUU

ВВЕДЕНИЕ

Спинно-мозжечковые тракты — одни из важнейших восходящих систем спинного мозга, несущие в мозжечок проприоцептивную информацию от мышечных веретен, сухожильных рецепторов Гольджи, телец Пачини и свободных нервных окончаний [1]. Пути проприоцептивной чувствительности организованы группами нейронов в спинном мозге, организующих проекции к мозжечку. Существует несколько десятков таких групп [2]; при этом основными из них являются четыре [3]:

(1) Нейроны ядер Кларка — симметричных образований, локализованных на уровне пластин V–VI грудного и верхнепоясничного отделов спинного мозга [4–7], впервые описанных Clarke [8] — источник дорзального спинно-мозжечкового тракта.

(2) Так называемые пограничные клетки (BC; в оригинале “border cells”), разбросанные вдоль вентро-латеральной границы серого и белого вещества и инициирующие вентральный спинно-мозжечковый тракт [9–11]. У хищных эти нейроны

выявлены в каудальных грудных и поясничных сегментах, с максимумом в сегментах L2–L6 [6, 12]. Оба тракта принимают участие в контроле моторики задних конечностей и локомоции в целом [13–16].

(3) Центральное шейное ядро, расположенное в пластине VI верхних шейных сегментов, организует так называемый “спинно-мозжечковый тракт центрального шейного ядра” [12, 17] и принимает участие в контроле позы, движений головы и глаз [18, 19].

(4) Ядро Штиллинга, расположенное в крестцовых и копчиковых сегментах [20], посылает в мозжечок проприоцептивные проекции от хвоста [12, 21, 22].

Среди этих четырех групп наиболее легко распознаваемым на гистологических срезах является ядро Кларка: в частности, из-за кольцевых пучков волокон, проходящих по периметру ядра на поперечных срезах [23]. Центральное шейное ядро также можно распознать, благодаря группированию крупных нейронов, его составляющих [24]. Ядро Штиллинга показано у грызунов [7, 25], сумчатых

[26] и приматов [7, 27], но не у кошки [7], хотя нейроны, инициирующие проекции к мозжечку, выявлены у кошки в тех же областях, что и у грызунов, сумчатых и приматов [12]. Что касается пограничных нейронов, то до сих пор их было возможно выявить лишь с помощью прямого трейсирования [12, 20, 28, 29], ретроградной дегенерации [30] и транскриптомого анализа [3, 31], но не с помощью цитоархитектонических или нейрохимических критериев. В настоящем исследовании мы предлагаем простой критерий для выделения нейронов в составе четырех источников спинно-мозжечковых проекций, основываясь на особенностях их иммуногистохимического окрашивания антителами к белку NeuN, который полагается специфическим нейрональным маркером, поскольку отсутствует в не-нейронных клетках, например, глиальных [32]. Полагаем, это станет удобным инструментом для визуализации нейронов, инициирующих спинномозжечковые взаимодействия, как в морфологических, так и в физиологических исследованиях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на поперечных срезах третьего шейного (С3), четвертого поясничного (L4) и второго крестцового (S2) сегментов и горизонтальных срезах сегмента L4 спинного мозга 9 нормально пигментированных взрослых кошек обоего пола (*Felis catus*) массой 2.5–3.5 кг. Согласно целям гуманного использования экспериментальных животных и принципу “3R”, часть образцов спинного мозга была получена от животных, принимавших участие в морфологическом опыте по изучению структур головного мозга [33–35].

Подготовка гистологического материала. Под глубоким наркозом (5%-ным изофлюраном) проводили транскардиальную перфузию. Для предупреждения свертываемости крови и образования тромбов за 10 мин до начала перфузии внутримышечно вводили гепарин (0.5 мл/кг). Промывку сосудов от форменных элементов крови осуществляли физиологическим раствором (0.9%-ный натрия хлорид, 700–800 мл/кг, pH 7.4, 25°C), фиксацию тканей — 4%-ным раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4, 600–700 мл/кг, 25°C). После перфузии спинной мозг извлекали из позвоночного канала и делили на сегменты, ориентируясь на положение дорзальных корешков [36]. Затем, для приготовления замороженных свободно плавающих срезов толщиной 50 мкм, материал проводили по растворам сахарозы 20- и 30%-ной концентрации, а для приготовления парафиновых срезов толщиной 7 мкм — по растворам спиртов восходящей концентрации, хлороформа, после чего заливали в парафин. Изготовление замороженных поперечных и горизонтальных срезов проводили на образцах спинного мозга 6 животных с помощью замораживающего микротомы (Reichert, Ав-

стрия); парафиновых — на образцах спинного мозга 3 животных с помощью ротационного микротомы МПС-2 (Украина).

Иммуногистохимия. Выявление нейронального белка NeuN проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода на стекле (для парафиновых срезов) и свободно плавающих (для замороженных срезов) срезов. Парафиновые срезы предварительно депарафинизировали в ксилоле и растворах спиртов нисходящей концентрации. В начале выполнения протокола и между всеми ключевыми этапами срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере 3 раза по 10 мин. Демаскировку антигенов на свободно плавающих срезах проводили в 1%-ном NaBH_4 в течение 15 мин, на парафиновых — нагреванием до 70°C в цитратном буфере в течение 25 мин. Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем полчасовой инкубации в 0.3%-ной H_2O_2 . Неспецифическую реакцию антител подавляли 3% нормальной сывороткой козы (NGS, Vector Labs, Великобритания) в течение 90 мин. Затем, не промывая, свободно плавающие срезы инкубировали в течение 72 ч при +4°C, а парафиновые срезы — в течение 2 ч при +37°C в растворе первичных поликлональных антител мыши к NeuN (Sigma-Aldrich, MAB377, RRID:AB_2298767, разведение 1:5000 — для свободно плавающих и 1:200 — для парафиновых срезов), 3% нормальной сыворотки козы и консерванта 0.1% NaN_3 . Затем срезы инкубировали в растворе биотинилированных вторичных кроличьих антител против сыворотки мыши (Vector Labs, разведение 1:600) в течение 24 ч — для замороженных срезов и в течение 1 ч — для парафиновых срезов. К раствору вторичных антител добавляли 3%-ную нормальную сыворотку козы. Затем срезы инкубировали в авидин-биотин-комплекс с пероксидазой (ABC Elite system, PK-6100, Vector Labs) в течение 1 ч. Визуализацию пероксидазной реакции осуществляли с помощью раствора, содержащего 1% DAB (хромоген 3,3'-диаминобензидин), 10% NiNH_4SO_4 и 0.03% H_2O_2 , для парафиновых срезов NiNH_4SO_4 не использовался. Для парафиновых срезов проводили дополнительную окраску астровым синим. Свободно плавающие срезы после промывки в дистиллированной воде монтировали на желатинизированные предметные стекла и высушивали. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации и просветления в ксилоле срезы заключали в среду для заключения препаратов (Bio Mount HM, Италия).

Цифровая обработка и анализ гистологического материала. Получение цифровых изображений срезов с выявленными антигенами проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония; увеличение объектива $\times 10$), свободно расширяемым программным комплексом digiCam-Control и камерой Nikon (D3200, Nikon Corporation,

Япония). Иммунопозитивные нейроны анализировали в следующих областях интереса: центральном шейном ядре, ядре Кларка, ядре Штиллинга и вблизи границы белого и серого вещества в вентролатеральной области. Подсчет площади сомы и оптической плотности иммунопозитивных нейронов проводили в свободном программном комплексе Fiji ImageJ [37]. Для морфометрического (площадь сечения сомы) и денситометрического (оптическая плотность) анализа использовали только замороженные срезы. Для сравнения также анализировали альфа-мотонейроны как сопоставимые по размеру клетки, расположенные на том же срезе спинного мозга. В анализ было взято по 5 срезов сегментов C3, L4, S2, поскольку сегмент L4 одновременно содержит ядра Кларка, пограничные клетки и соматические мотонейроны [38]; центральное шейное ядро наиболее выражено в сегменте C3 [24], а ядро Штиллинга у грызунов, сумчатых и приматов наиболее выражено в крестцовых сегментах [26, 39], поэтому для его поиска у кошки был выбран срединный крестцовый сегмент S2. Относительную оптическую плотность вычисляли по формуле контраста Майкельсона: $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\max} + L_{\min})$, где $L_{\max}$ и $L_{\min}$ — максимальная и минимальная яркости соответственно [40]. Согласно данной формуле, чем меньше полученное значение, тем меньше разность оптической плотности между клеткой и фоном.

Статистическая обработка. Достоверность отличий оценивали в программе GraphPad (ver 8.0) с помощью парного критерия Вилкоксона (при сравнении двух выборок) или парного критерия Фридмана с поправкой Данна на множественные сравнения (при сравнении трех и более выборок). Для сравнения областей интереса, расположенных в разных сегментах, применяли непарный критерий Краскела—Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как на поперечных, так и на горизонтальных срезах спинного мозга, отчетливо видны нейроны с особым типом мечения: отсутствием интенсивного иммуномечения цитоплазмы, с сохранением интенсивного иммуномечения в области клеточного ядра (рис. 1). При этом для большинства нейронов спинного мозга характерно интенсивное иммуномечение как ядра, так и цитоплазмы [24]. Нейроны со светлой цитоплазмой выявлены во всех исследованных сегментах спинного мозга, при этом для каждой из областей интереса получена выборка индивидуального размера. Наиболее многоклеточными являются ядра Кларка, формирующие сплошную колонну нейронов, проходящую через весь сегмент [41]; это отличает это ядро от прочих ядер и областей интереса, содержащих значительно меньшее число клеток. Более того, для центрального шейного ядра известно неравномерное распределение нейронов вдоль ростокаудальной

оси спинного мозга: чередование небольших скоплений и продолжительных пустых зон [7]; очевидно, это значительно затрудняет поиск этих нейронов на гистологических срезах. Как итог, в ряде случаев нейроны центрального шейного ядра было невозможно визуализировать не на одном из имеющихся срезов; как итог, объем выборки для этих клеток был ниже, чем для прочих ($n = 4$ vs $n = 7$).

Ядра Кларка и пограничные нейроны

В сегменте L4 нейроны со слабым иммуномечением цитоплазмы расположены, главным образом, лишь в пределах узких локусов: на границе дорзальных рогов и промежуточного серого вещества — в области залегания ядер Кларка (по 3–7 клеток на поперечный срез), и вдоль вентролатеральной границы серого и белого вещества — в области предположительной локализации пограничных нейронов (по 1–4 клетки на поперечный срез) (рис. 1b (черные стрелки)). В соответствии с этим у одного из животных анализировали не поперечные, но горизонтальные срезы, охватывающие всю протяженность поясничного сегмента (рис. 1c, d). При использовании такой плоскости резки видно, что пограничные нейроны распределены вдоль оси мозга менее равномерно, чем нейроны ядер Кларка: между отдельными пограничными нейронами или их группами существуют пробелы протяженностью 300–600 мкм.

В области ядер Кларка нейроны со светлой цитоплазмой характеризуются крупной сомой (площадь поперечного сечения: 1245 ± 366 мкм²) полигональной, овальной или треугольной формы (рис. 1b, c). В вентролатеральной области светлые нейроны также имеют крупную сому (площадь поперечного сечения: 1836 ± 457 мкм²); ее форма, главным образом, полигональная (рис. 1c, d). Пограничные нейроны достоверно крупнее клеток ядра Кларка ($p < 0.05$; критерий Фридмана). Размерность нейронов ядер Кларка и пограничных нейронов соответствует данным литературы [2, 38].

Мы сравнили основные особенности иммуномечения крупных нейронов со светлой цитоплазмой с еще одним типом крупных нейронов серого вещества — альфа-мотонейронами (рис. 1e, f). Площадь сечения сомы альфа-мотонейронов сходна с таковой у пограничных клеток и клеток ядер Кларка и составляет 1445 ± 298 мкм² ($p > 0.05$ и $p > 0.05$; критерий Фридмана). Альфа-мотонейроны имеют достоверно большую нормированную оптическую плотность, чем пограничные нейроны (0.051 ± 0.024 vs 0.339 ± 0.139 ; $p < 0.01$) и нейроны ядра Кларка (0.056 ± 0.036 vs 0.339 ± 0.139 ; $p < 0.05$; критерий Фридмана). Отличий в нормированной оптической плотности между крупными клетками ядер Кларка и пограничными нейронами не выявлено ($p > 0.05$; критерий Фридмана).

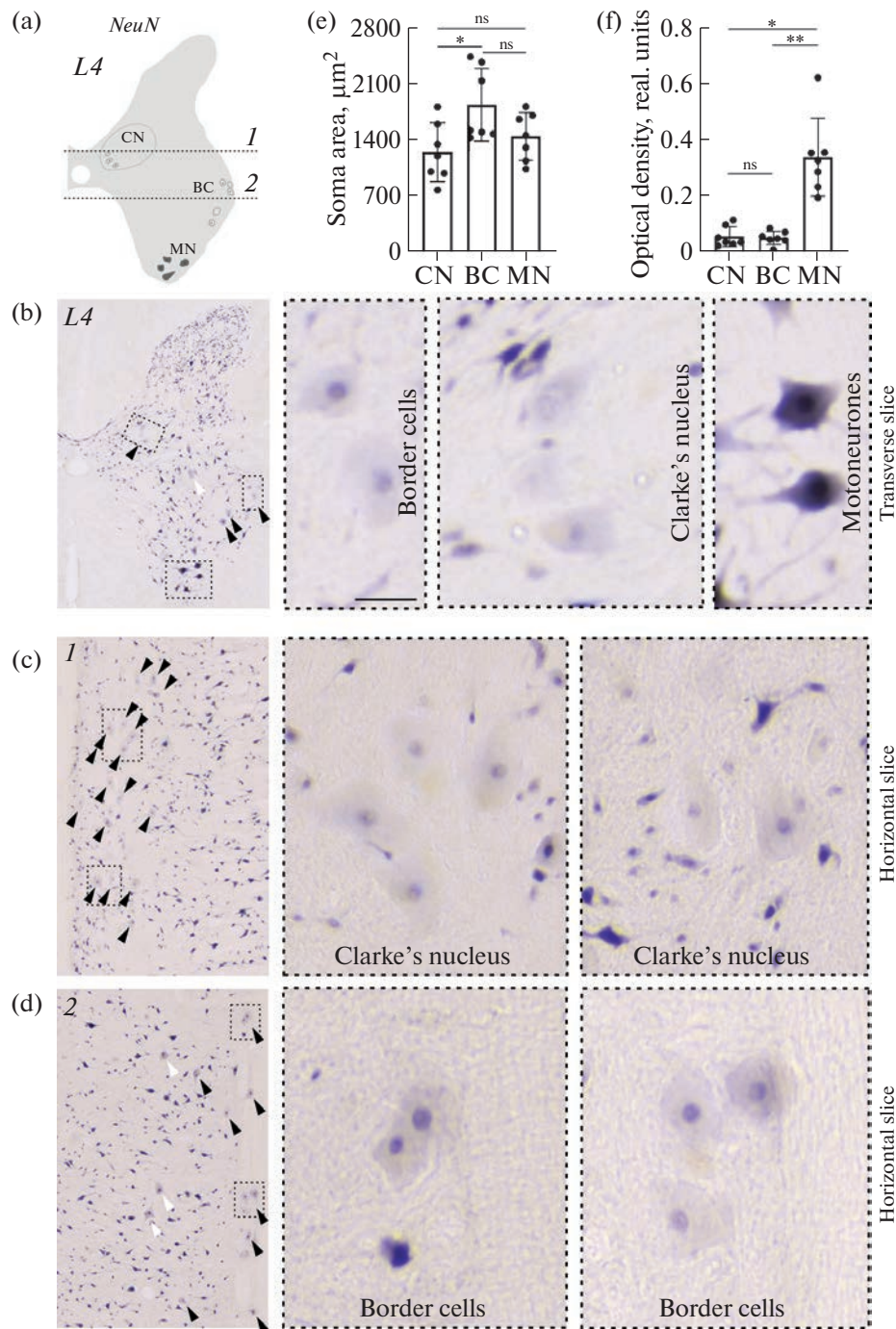


Рис. 1. Распределение нейронов, иммунопозитивных к ядерному белку NeuN, на замороженных срезах поясничного сегмента L4 спинного мозга кошки. (a) — Схема локализации нейронов интереса на поперечном срезе. Пунктирной линией обозначены уровни горизонтальных срезов. (b) — Поперечный срез спинного мозга. (c, d) — Горизонтальные срезы спинного мозга, прошедшие через ядро Кларка (CN; уровень 1; (c)) или область залегания пограничных клеток (BC; уровень 2; (d)). На (b–d) слева — общий вид среза, по центру и справа — увеличенные изображения нейронов, выделенных слева прямоугольниками. Хорошо видны крупные нейроны (помечены стрелками) с бледно окрашенной цитоплазмой и более темным ядром в областях локализации пограничных нейронов и ядер Кларка. (e) — Средняя площадь сечения сомы нейронов интереса. (f) — Относительная оптическая плотность нейронов интереса, вычисленная по формуле контраста Майкельсона. * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; ns — отсутствие достоверных отличий. Калибровочный маркер равен 50 мкм.

Отметим, что, согласно некоторым данным, нейроны, формирующие вентральный спинно-мозжечковый тракт, могут локализоваться и в толще пластины VII, а не только вдоль границы серого и белого ве-

щества [9, 10]. И, действительно, редкие нейроны с морфологией пограничных нейронов отмечены в центральной части пластины VII (рис. 1b, d (белые стрелки)). Эти клетки не были взяты в анализ в силу

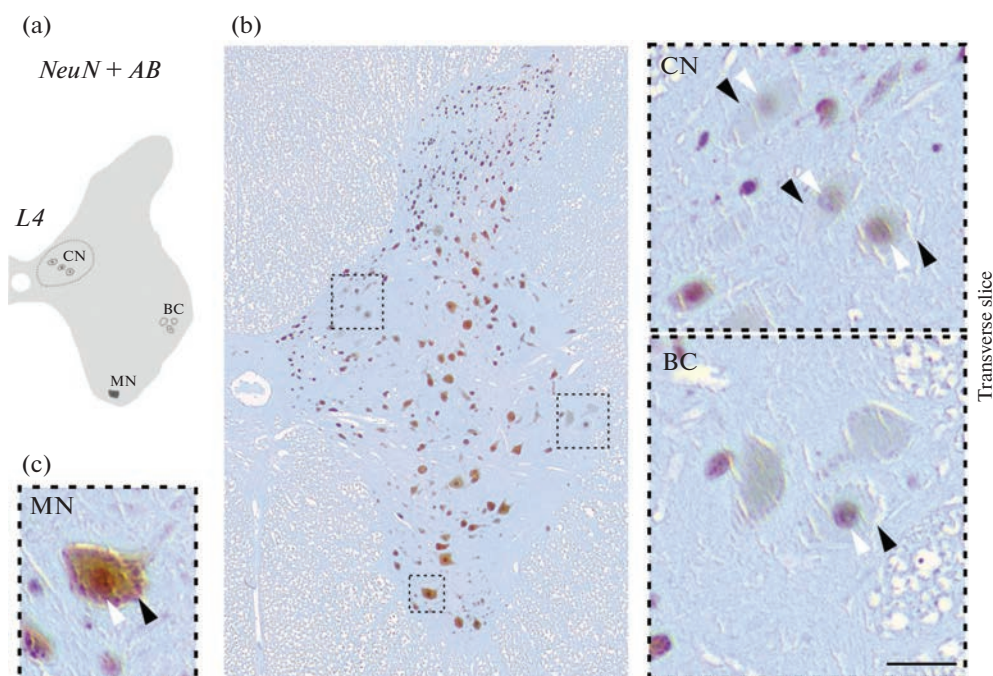


Рис. 2. Распределение нейронов, иммунопозитивных к ядерному белку NeuN, на парафиновых срезах поясничного сегмента L4 спинного мозга кошки. (a) — Схема локализации нейронов интереса на поперечном срезе. (b) и (c) — Парафиновый срез и увеличенные изображения пограничных клеток (BC), клеток ядер Кларка (CN) и мотонейрона (MN). Для пограничных клеток и клеток ядра Кларка хорошо видна разница между интенсивностью иммуногистохимической реакции в цитоплазме (черные стрелки) и ядром (белые стрелки). Срезы дополнительно подкрашены астровым синим (AB). Калибровочный маркер равен 50 мкм.

их малочисленности. Также отметим, что численные данные, полученные на горизонтальных срезах, соответствуют тем, что получены с использованием поперечных срезов.

Для большей достоверности мы также рассмотрели тонкие парафиновые (7 мкм) срезы от трех дополнительных животных (рис. 1a). Как видно на рис. 2, пограничные нейроны и нейроны ядер Кларка на парафиновых срезах имеют те же особенности иммуномечения, что были показаны выше: очень светлую цитоплазму и более интенсивно окрашенное ядро (рис. 2b). Использование парафиновых срезов позволяет убедиться в том, что ядра действительно имеют более высокий уровень иммуномечения, чем окружающая цитоплазма, поскольку продукты реакции в цитоплазме и ядре не взаимно накладываются, как это может произойти при использовании толстых замороженных срезов. Парафиновые срезы также позволяют убедиться в том, что доминирующая форма сомы пограничных нейронов — полигональная, сомы нейронов ядер Кларка — овальная.

Прочие нейроны (рис. 2b), в том числе и мотонейроны (рис. 2c), имеют интенсивное иммуномечение как ядра, так и цитоплазмы. Таким образом, представленные выше данные не являются артефактом иммуномечения на толстых замороженных срезах.

Центральное шейное ядро

Как и в поясничном отделе, в шейном сегменте С3 визуализируются нейроны со светлой цитоплазмой и более темным ядром; их локализация — граница пластин VI и VII промежуточного серого вещества, что соответствует положению центрального шейного ядра (рис. 3a). Нейроны распределены от среза к срезу неравномерно: их число варьирует от 0 до 5 на срез, что соответствует литературным данным [7]. Нейроны с бледной цитоплазмой имеют сому крупного размера (площадь поперечного сечения: $902 \pm 287 \text{ мкм}^2$), главным образом, треугольной формы (рис. 3b). В ряде случаев также видны проксимальные части дендритов (рис. 3b). Площадь сечения сомы альфа-мотонейронов сегмента С3 несколько больше и составляет $1143 \pm 203 \text{ мкм}^2$; но отличия между этими типами клеток не достоверны ($p > 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3c). Нормированная оптическая плотность нейронов центрального шейного ядра очевидно ниже, чем у альфа-мотонейронов (0.102 ± 0.039 vs 0.414 ± 0.173), однако, в силу малочисленности выборки, эти отличия являются недостоверными ($p > 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3d).

Ядро Штиллинга

Крестцовый сегмент S2 также содержит нейроны со светлой цитоплазмой и более темным ядром:

в локальной области на границе пластин VI и VII промежуточного серого вещества, что соответствует локализации нейронов, организующих проекции к мозжечку из каудальных сегментов спинного мозга [7], т.е. клеточной популяции, аналогичной ядру Штиллинга у грызунов, сумчатых и приматов (рис. 3е). Нейроны со светлой цитоплазмой имеют сомю крупного размера (площадь поперечного сечения: $1034 \pm 307 \text{ мкм}^2$) полигональной или треугольной формы (рис. 3ф). Площадь сечения сомы альфа-мотонейронов сегмента S2 составляет $1662 \pm 154 \text{ мкм}^2$; отличия между этими типами клеток являются достоверными ($p < 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3г). Нормированная оптическая плотность нейронов ядра Штиллинга достоверно ниже, чем у альфа-мотонейронов (0.0941 ± 0.090 vs 0.281 ± 0.140 ; $p < 0.05$; критерий Вилкоксона) (рис. 3h).

Площади сомы пограничных нейронов, клеток центрального шейного ядра, ядра Кларка и ядра Штиллинга сходны, однако площадь пограничных нейронов достоверно выше, чем площадь нейронов центрального шейного ядра ($p < 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса). Площади сомы мотонейронов разных сегментов также сходны, однако отличия между сегментами C3 и S2 являются достоверными ($p < 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса). Нормированная оптическая плотность разных нейронов интереса достоверно не различается ($p > 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса), как и нормированная оптическая плотность мотонейронов разных сегментов ($p > 0.05$; критерий Краскела–Уоллиса).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом является обнаружение особого типа иммуномечения к общему нейрональному маркеру — белку NeuN, у крупных нейронов в составе ядер Кларка, ядер Штиллинга, центральных шейных ядер и крупных нейронов, расположенных на вентролатеральной границе серого и белого вещества поясничного отдела.

Данный феномен мог быть связан с особенностями иммуномечения клеток с крупной сомой. В первую очередь мы сопоставили уровень и паттерн NeuN-иммуномечения между нейронами интереса и альфа-мотонейронами, поскольку, согласно ряду данных, морфологические характеристики нейронов, иницирующих спинномозжечковые проекции (на примере пограничных нейронов), и альфа-мотонейронов имеют значительное сходство [9, 30, 42, 43]. Однако, как видно из результатов, светлое окрашивание цитоплазмы крупных нейронов не связано с размером их сомы.

Второе предположение: выявленный паттерн иммуномечения отражает особенности нейрхимии нейронов, организующих проекции к мозжечку. В проведенном исследовании мы не проводили

прямого сопоставления паттерна крупных нейронов со светлой цитоплазмой и клеток, меченых в результате трейсирования, но на принадлежность анализируемых популяций к клеткам, организующим спинно-мозжечковые проекции, указывает, в первую очередь, их пространственное расположение. При этом идентификация таких клеток в пределах ядра Кларка и центрального шейного ядра не вызывает сомнения в силу наличия четких анатомических границ данных ядер. Поскольку крупные нейроны этих ядер не отличаются по общему паттерну NeuN-иммуномечения от крупных нейронов, выявленных в вентролатеральной области сегмента L4 (пограничные нейроны) и в зоне, аналогичной положению ядра Штиллинга, в сегменте S2, полагаем, что критерий выделения спинно-мозжечковых нейронов ядер Кларка и центрального шейного ядра в равной мере подходит и для них.

В литературе имеются данные о существовании ряда различий между ядрами, организующими связи с мозжечком. Например, (1) ядра Кларка проецируются, главным образом, на ипсилатеральную, а не на контралатеральную сторону мозжечка, что свойственно для остальных прецереbellярных ядер [2, 7]; (2) ядра Кларка получают входы от кортикоспинальных нейронов [44]; (3) центральное шейное ядро получает вестибулярные входы [45] и организует проекции к вестибулярным ядрам [46]. В ряде недавних молекулярных исследований спинного мозга мыши были получены индивидуальные транскриптомные профили для разных нейрональных популяций, организующих проекции к мозжечку [3, 31]. Однако, несмотря на эти отличия, клеточные источники спинно-мозжечковых трактов имеют сходство в типе NeuN иммуномечения. Белок NeuN является продуктом гена *fox-3* и полагается клеточным фактором, определяющим нейрон-специфический альтернативный сплайсинг [47]. Показано, что начало экспрессии NeuN соответствует переходу нейрона в пост-митотическую фазу и началу его функционирования [32, 48, 49]. При этом у взрослых животных, как в головном (см. обзор [50]), так и спинном мозге [51–53], выявлены структуры с отличным от прочих уровнем экспрессии NeuN в цитоплазме и/или ядре нейронов, вплоть до полного ее отсутствия. Возможно, тип иммуномечения к NeuN позволяет делить нейроны на крупные гетерогенные популяции, объединенные некими базовыми особенностями функционирования. Тогда наличие определенных структурно-функциональных различий между клетками, иницирующими связи к мозжечку, не будет влиять на общий паттерн экспрессии в них белка NeuN. Эта картина может быть сходна с существованием единых маркеров спинальных альфа-мотонейронов (например, холинацетилтрансфераза [51] или SMI-32 [54]), несмотря на то, что они различаются по набору экспрессируемых генов [55], характеристикам аксонов [56], особенностям иннервируемых ими мышц [57].

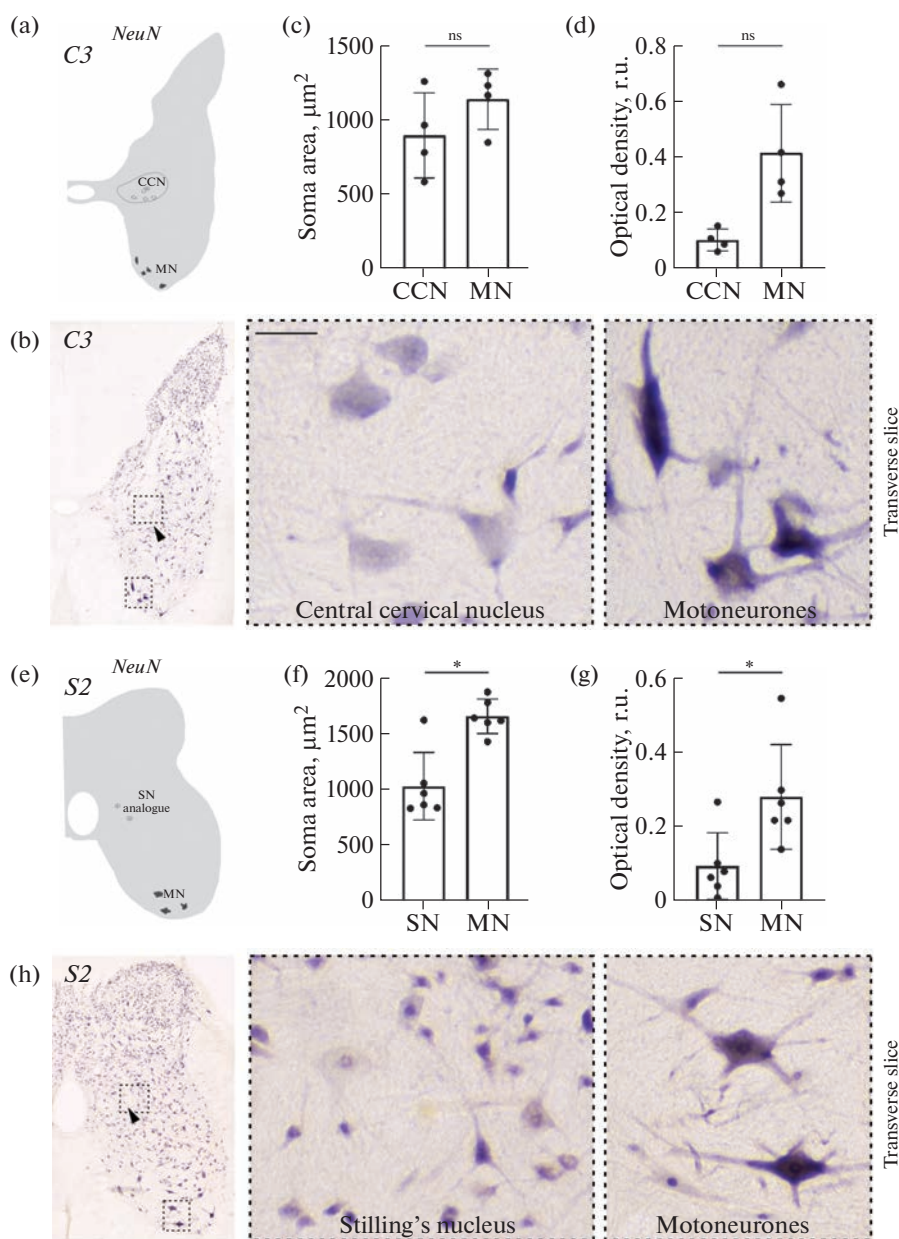


Рис. 3. Распределение нейронов, иммунопозитивных к ядерному белку NeuN, в сером веществе шейного сегмента C3 (a–d) и крестцового сегмента S2 (e–h) спинного мозга кошки. (a, e) – Схемы локализации нейронов интереса на поперечных срезах. (b, f) – Поперечные срезы спинного мозга. На (b, f) слева – общий вид среза, по центру – увеличенные изображения нейронов, выделенных слева прямоугольниками. Видны крупные нейроны (помечены стрелками) с бледно окрашенной цитоплазмой и более темным ядром. Справа – увеличенные изображения мотонейронов. (c, g) – Средняя площадь сечения сомы нейронов интереса. (d, h) – Относительная оптическая плотность нейронов интереса, вычисленная по формуле контраста Майкельсона. CCN – центральное шейное ядро, SN – проекционные клетки области, соответствующей локализации ядра Шиллинга у других видов, MN – мотонейроны. * – $p < 0.05$; ns – отсутствие достоверных отличий. Калибровочный маркер равен 50 мкм.

Не можем не добавить, что анатомии и морфологии нейронов, инициирующих спинно-мозжечковые тракты, посвящены, главным образом, работы 50-летней давности, тогда как функции самих трактов являются объектом интереса современных исследования [58–60]. Очевидно, что обнаружение метода упрощенной идентификации нейронов, организующих эти тракты, будет способствовать реализации ком-

плексных физиолого-морфологических исследований взаимодействия спинного мозга и мозжечка.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

полненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 09/11/2015).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №21-15-00235).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Н.С.М.; подготовка гистологического материала: А.А.В., П.Ю.Ш., Н.И.Н., Н.В.П.; сбор и обработка данных: Н.С.М., А.А.В., П.Ю.Ш., Н.В.П.; написание и редактирование манускрипта: Н.С.М., А.А.В., П.Ю.Ш., Н.В.П.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны П.Е. Мусиенко за помощь в работе с частью животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bosco G, Poppele RE* (2001) Proprioception from a spinocerebellar perspective. *Physiol Rev* 81: 539–568. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.539>
2. *Matsushita M, Hosoya Y* (1979) Cells of origin of the spinocerebellar tract in the rat, studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res* 173: 185–200. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90620-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90620-6)
3. *Baek M, Menon V, Jessell TM, Hantman AW, Dasen JS* (2019) Molecular logic of spinocerebellar tract neuron diversity and connectivity. *Cell Rep* 27: 2620–2635.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.113>
4. *Boehme CC* (1968) The neural structure of Clarke's nucleus of the spinal cord. *J Comp Neurol* 132: 445–461. <https://doi.org/10.1002/cne.901320306>
5. *Mann MD* (1973) Clarke's column and the dorsal spinocerebellar tract: a review. *Brain Behav Evol* 7: 34–83. <https://doi.org/10.1159/000124397>
6. *Petras JM, Cummings JF* (1977) The origin of spinocerebellar pathways. II. The nucleus centrobasis of the cervical enlargement and the nucleus dorsalis of the thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 173. <https://doi.org/10.1002/cne.901730405>
7. *Snyder RL, Faull RL, Mehler WR* (1978) A comparative study of the neurons of origin of the spinocerebellar afferents in the rat, cat and squirrel monkey based on the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181: 833–852. <https://doi.org/10.1002/cne.901810409>
8. *Clarke JAL* (1859) Further researches on the grey substance of the spinal cord. *Philos Trans R Soc Lond* 149: 437–467. <https://doi.org/10.1098/rstl.1859.0022>
9. *Ha H, Liu CN* (1968) Cell origin of the ventral spinocerebellar tract. *J Comp Neurol* 133: 185–206. <https://doi.org/10.1002/cne.901330204>
10. *Shrestha SS, Bannatyne BA, Jankowska E, Hammar I, Nilsson E, Maxwell DJ* (2012) Inhibitory inputs to four types of spinocerebellar tract neurons in the cat spinal cord. *Neuroscience* 226: 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.015>
11. *Xu Q, Grant G* (1988) Collateral projections of neurons from the lower part of the spinal cord to anterior and posterior cerebellar termination areas. A retrograde fluorescent double labeling study in the cat. *Exp Brain Res* 72: 562–576. <https://doi.org/10.1007/BF00250601>
12. *Matsushita M, Hosoya Y, Ikeda M* (1979) Anatomical organization of the spinocerebellar system in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 184: 81–106. <https://doi.org/10.1002/cne.901840106>
13. *Arshavsky YI, Berkinblit MB, Fukson OI, Gelfand IM, Orlovsky GN* (1972) Origin of modulation in neurones of the ventral spinocerebellar tract during locomotion. *Brain Res* 43: 276–279. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90296-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90296-X)
14. *Edgley SA, Jankowska E* (1988) Information processed by dorsal horn spinocerebellar tract neurones in the cat. *J Physiol* 397: 81–97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016989>
15. *Jankowska E, Nilsson E, Hammar I* (2011) Processing information related to centrally initiated locomotor and voluntary movements by feline spinocerebellar neurones. *J Physiol* 589: 5709–5725. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.213678>
16. *Pop IV, Espinosa F, Blevins CJ, Okafor PC, Ogujiofor OW, Goyal M, Mona B, Landy MA, Dean KM, Gurumurthy CB, Lai HC* (2022) Structure of long-range direct and indirect spinocerebellar pathways as well as local spinal circuits mediating proprioception. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 42: 581–600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2157-20.2021>
17. *Hirai N, Hongo T, Sasaki S, Yoshida K* (1979) The neck and labyrinthine influences on cervical spinocerebellar tract neurones of the central cervical nucleus in the cat. *Prog Brain Res* 50: 529–536. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60851-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60851-1)
18. *Matsushita M, Tanami T* (1987) Spinocerebellar projections from the central cervical nucleus in the cat, as studied by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 266: 376–397. <https://doi.org/10.1002/cne.902660306>
19. *Neuhuber WL, Zenker W* (1989) Central distribution of cervical primary afferents in the rat, with emphasis on proprioceptive projections to vestibular, perihypoglossal, and upper thoracic spinal nuclei. *J Comp Neurol* 280: 231–253. <https://doi.org/10.1002/cne.902800206>
20. *Sengul G, Fu Y, Yu Y, Paxinos G* (2015) Spinal cord projections to the cerebellum in the mouse. *Brain Struct*

- Funct 220: 2997–3009.
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0840-7>
21. *Edgley SA, Grant GM* (1991) Inputs to spinocerebellar tract neurones located in Stilling's nucleus in the sacral segments of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 305: 130–138.
<https://doi.org/10.1002/cne.903050112>
 22. *Luo Y, Onozato T, Wu X, Sasamura K, Sakimura K, Sugihara I* (2020) Dense projection of Stilling's nucleus spinocerebellar axons that convey tail proprioception to the midline area in lobule VIII of the mouse cerebellum. *Brain Struct Funct* 225: 621–638.
<https://doi.org/10.1007/s00429-020-02025-6>
 23. *Merkulyeva NS, Veshchitskii AA, Shkorbatova PYu, Shenkman BS, Musienko PE, Makarov FN* (2017) Morphometric characteristics of the dorsal nuclei of Clarke in the rostral segments of the lumbar part of the spinal cord on cats. *Neurosci Behav Physiol* 47: 851–856.
<https://doi.org/10.1007/s11055-017-0481-4>
 24. *Veshchitskii A, Shkorbatova P, Merkulyeva N* (2022) Neurochemical atlas of the cat spinal cord. *Front Neuroanat* 16: 1034395.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1034395>
 25. *Olude MA, Idowu AO, Mustapha OA, Olopade JO, Akinloye AK* (2015) Spinal cord studies in the african giant rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Niger J Physiol Sci Off Publ Physiol Soc Niger* 30: 25–32.
 26. *Terman JR, Wang XM, Martin GF* (1998) Origin, course, and laterality of spinocerebellar axons in the North American opossum, *Didelphis virginiana*. *Anat Rec* 251: 528–547.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199808\)251:4<528::AID-AR9>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199808)251:4<528::AID-AR9>3.0.CO;2-N)
 27. *Watson C, Sengul G, Tanaka I, Rusznak Z, Tokuno H* (2015) The spinal cord of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Res* 93: 164–175.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.12.012>
 28. *Grant G, Wiksten B, Berkley KJ, Aldskogius H* (1982) The location of cerebellar-projecting neurons within the lumbosacral spinal cord in the cat. An anatomical study with HRP and retrograde chromatolysis. *J Comp Neurol* 204: 336–348.
<https://doi.org/10.1002/cne.902040405>
 29. *Fu Y, Sengul G, Paxinos G, Watson C* (2012) The spinal precerebellar nuclei: calcium binding proteins and gene expression profile in the mouse. *Neurosci Lett* 518: 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.002>
 30. *Cooper S, Sherrington CS* (1940) Gower's tract and spinal border cells. *Brain* 63: 123–134.
<https://doi.org/10.1093/brain/63.2.123>
 31. *Coughlan E, Garside VC, Wong SFL, Liang H, Kraus D, Karmakar K, Maheshwari U, Rijli FM, Bourne J, McGlinn E* (2019) A hox dode defines spinocerebellar neuron subtype regionalization. *Cell Rep* 29: 2408–2421.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.048>
 32. *Mullen RJ, Buck CR, Smith AM* (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Dev Camb Engl* 116: 201–211.
<https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
 33. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Zykin P* (2018) Early postnatal development of the lamination in the lateral geniculate nucleus A-layers in cats. *Cell Mol Neurobiol* 38: 1137–1143.
<https://doi.org/10.1007/s10571-018-0585-6>
 34. *Merkulyeva NS, Mikhalkin AA, Nikitina NI* (2020) Characteristics of the neurochemical state of neurons in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in cats. *Neurosci Behav Physiol* 50: 511–515.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00927-w>
 35. *Mikhalkin AA, Merkulyeva NS* (2021) Peculiarities of age-related dynamics of neurons in the cat lateral geniculate nucleus as revealed in frontal versus sagittal slices. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1001–1007.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021050021>
 36. *Shkorbatova PY, Lyakhovetskii VA, Merkulyeva NS, Veshchitskii AA, Bazhenova EY, Laurens J, Pavlova NV, Musienko PE* (2019) Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae. *Anat Rec* 302: 1628–1637.
<https://doi.org/10.1002/ar.24054>
 37. *Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 38. *Edgley SA, Gallimore CM* (1988) The morphology and projections of dorsal horn spinocerebellar tract neurones in the cat. *J Physiol* 397: 99–111.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016990>
 39. *Sengul G, Watson C, Tanaka I, Paxinos G* (2012) Atlas of the spinal cord: mouse, rat, rhesus, marmoset, and human. Elsevier Science 360.
 40. *Shapley R, Enroth-Cugell C* (1984) Visual adaptation and retinal gain controls. *Prog Retin Res* 3: 263–346.
[https://doi.org/10.1016/0278-4327\(84\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0278-4327(84)90011-7)
 41. *Cummings JF, Petras JM* (1977) The origin of spinocerebellar pathways. I. The nucleus cervicalis centralis of the cranial cervical spinal cord. *J Comp Neurol* 173: 655–692.
<https://doi.org/10.1002/cne.901730404>
 42. *Morin F, Schwartz HG, O'leary JL* (1951) Experimental study of the spinothalamic and related tracts. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 26: 371–396.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1951.tb09681.x>
 43. *Sprague JM* (1953) Spinal border cells and their role in postural mechanism (Schiff-Sherrington phenomenon). *J Neurophysiol* 16: 464–474.
<https://doi.org/10.1152/jn.1953.16.5.464>
 44. *Hantman AW, Jessell TM* (2010) Clarke's column neurons as the focus of a corticospinal corollary circuit. *Nat Neurosci* 13: 1233–1239.
<https://doi.org/10.1038/nn.2637>
 45. *Thomson DB, Isu N, Wilson VJ* (1996) Responses of neurons of the cat central cervical nucleus to natural neck and vestibular stimulation. *J Neurophysiol* 76: 2786–2789.
<https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.4.2786>
 46. *Xiong G, Matsushita M* (2001) Ipsilateral and contralateral projections from upper cervical segments to the vestibular nuclei in the rat. *Exp Brain Res* 141: 204–217.
<https://doi.org/10.1007/s002210100867>

47. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009) Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284: 31052–31061.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>
48. Weyer A, Schilling K (2003) Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73: 400–409.
<https://doi.org/10.1002/jnr.10655>
49. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447–452.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
50. Alekseeva OS, Gusel'nikova VV, Beznin GV, Korzhevskii DE (2015) Prospects for the application of neuron nuclear protein as a marker of the functional state of nerve cells in vertebrates. *J Evol Biochem Physiol* 51: 357–369.
<https://doi.org/10.1134/S0022093015050014>
51. Friese A, Kaltschmidt JA, Ladle DR, Sigris M, Jessell TM, Arber S (2009) Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13588–13593.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906809106>
52. Shneider NA, Brown MN, Smith CA, Pickel J, Alvarez FJ (2009) Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Develop* 4: 42.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-42>
53. Veshchitskii AA, Kirik OV, Korzhevskii DE, Merkulyeva N (2023) Development of neurochemical labeling in the intermediolateral nucleus of cats' spinal cord. *Anat Rec* 306: 2400–2410.
<https://doi.org/10.1002/ar.24943>
54. Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C (2000) Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res* 861: 45–58.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)01954-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)01954-5)
55. Liao ES, Jin S, Chen Y-C, Liu W-S, Calon M, Nedelec S, Nie Q, Chen J-A (2023) Single-cell transcriptomic analysis reveals diversity within mammalian spinal motor neurons. *Nat Commun* 14: 46.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35574-x>
56. Balbi P, Martinoia S, Massobrio P (2015) Axon-somatic back-propagation in detailed models of spinal alpha motoneurons. *Front Comput Neurosci* 9: 15.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2015.00015>
57. Vanderhorst VG, Holstege G (1997) Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46–76.
58. Fedirchuk B, Stecina K, Kristensen KK, Zhang M, Meehan CF, Bennett DJ, Hultborn H (2013) Rhythmic activity of feline dorsal and ventral spinocerebellar tract neurons during fictive motor actions. *J Neurophysiol* 109: 375–388.
<https://doi.org/10.1152/jn.00649.2012>
59. Jankowska E, Hammar I (2013) Interactions between spinal interneurons and ventral spinocerebellar tract neurons. *J Physiol* 591: 5445–5451.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248740>
60. Chalif JJ, Martínez-Silva M de L, Pagiazitis JG, Murray AJ, Mentis GZ (2022) Control of mammalian locomotion by ventral spinocerebellar tract neurons. *Cell* 185: 328–344.e26.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.014>

NEUN EXPRESSION IN SPINAL NEURONS ORGANIZING PROJECTIONS TO THE CEREBELLUM

A. A. Veshchitskii^a, N. V. Pavlova^a, P. Y. Shkorbatova^a, N. I. Nikitina^a, and N. S. Merkulyeva^{a,*}

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

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

We analyzed the peculiarities of the NeuN immunostaining of the cat spinal cord neurons located in four structures organizing projections to the cerebellum: the Clarke's nucleus and border cells – in the L4 segment, the central cervical nucleus – in the C3 segment, and the Stilling's nucleus – in the S2 segment. Morphometric and densitometric studies were carried out. It was shown that all neurons of interest have a striking feature: an extremely weak level of the cytoplasmic NeuN-staining, while maintaining a high level of the nuclear NeuN-staining. The soma size of neurons of interest was 1000–1850 μm^2 , which is comparable to the size of another type of large neurons at slices – motoneurons (1140–1660 μm^2). Thus, we used a motoneuronal population of the corresponding segments to compare the values of optical density. The relative optical density of neurons of interest was several times lower than for the motoneurons (0.060 ± 0.030 vs 0.330 ± 0.127). There were no significant differences in optical density between different structures of interest. Given the morphological uniqueness and similarity of these four cell populations, we believe that the feature of NeuN protein expression can be used as a simple tool for the visualization of cells organizing projections to the cerebellum. It can be valuable both for targeted morphological examination and for histological control after a physiological experiment.

Keywords: NeuN, spinocerebellar tracts, Clarke's nucleus, Stilling's nucleus, central cervical nucleus, border cells, cat

ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И АДЕНИЛАТНАЯ СИСТЕМА ТКАНЕЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARCK, 1819) В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОЙ ГИПОКСИИ

© 2023 г. А. С. Кохан¹, А. А. Солдатов^{1,2,*}, И. В. Головина¹,
Ю. В. Богданович¹, Н. Е. Шалагина¹, В. Н. Рычкова¹

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

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

Исследовали влияние режима умеренной гипоксии на процессы энергетического обмена в тканях (жабры, гепатопанкреас) средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819). Контрольная группа моллюсков содержалась при $6.8\text{--}6.9\text{ мг О}_2\text{ л}^{-1}$, опытная при $1.9\text{--}2.0\text{ мг О}_2\text{ л}^{-1}$. В обоих случаях температура воды составляла $22 \pm 1^\circ\text{C}$, соленость — $17\text{--}18\text{‰}$. Экспозиция — 72 ч. В условиях умеренной гипоксии в организме средиземноморской мидии развивался комплекс реакций, направленных на поддержание энергетического статуса тканей. Аэробные процессы явно ограничивались, о чем свидетельствовало снижение активности сукцинатдегидрогеназы. Одновременно усиливались анаэробные процессы в тканях. Повышалась активность альдолазы, малатдегидрогеназы, увеличивалось содержание пирувата. При этом глюкозо-лактатное направление метаболизма подавлялось. Это нашло отражение в отсутствии роста активности лактатдегидрогеназы и содержания лактата в тканях. Допускается переключение метаболизма на глюкозо-опиное направление, свойственное представителям рода *Mytilus*. В работе дается развернутая характеристика состояния аденилатной системы моллюска. Показано, что содержание фракции АТФ в тканях в условиях гипоксии оставалось на уровне контрольных значений, что отражало адаптивную направленность реорганизации тканевого метаболизма. Впервые отмечена способность гепатопанкреаса аккумулировать фракции АДФ и АМФ из систем циркуляции в условиях гипоксической нагрузки. Полагаем, что это может быть основной причиной роста пула аденилатов и понижения значений АЭЗ в данном органе. Из представленных результатов следует, что реорганизация процессов углеводного обмена в тканевых структурах средиземноморской мидии в условиях умеренной гипоксии позволяет сохранять энергетический статус ее тканей. Это является одним из основных условий, позволяющих моллюску осваивать проблемные гипоксические акватории.

Ключевые слова: умеренная гипоксия, аденилатная система, сукцинатдегидрогеназа, ферменты гликолиза, *Mytilus galloprovincialis*

DOI: 10.31857/S0044452923060050, **EDN:** GIUCWX

ВВЕДЕНИЕ

Двустворчатые моллюски (сем. Bivalvia) широко представлены в шельфовой зоне Мирового океана. Большинство из них ведет малоподвижный или прикрепленный образ жизни [1]. Некоторые населяют контурные биотопы, для которых характерны значительные градиенты температуры, содержания кислорода, солености [2], а также зоны внешнего экстремума: гиперсоленые водоемы, гипоксические акватории с элементами сероводородного заражения [3, 4] и др. Функциональные основы толерантности к данным условиям среды представляют интерес, так как предполагают специфику адаптивной реорганизации метаболических про-

цессов, уникальной по отношению к другим формам жизни.

Значительное число работ посвящено биоэнергетическим аспектам существования моллюсков в условиях внешнего дефицита кислорода. Показана способность двустворок легко переходить к суббазальным скоростям метаболизма [5] посредством обратимого фосфорилирования ряда гликолитических ферментов [6] при участии цАМФ (цГМФ) протеинкиназ [7]. Отмечены существенные модификации терминальных реакций анаэробного гликолиза, которые исключают образование лактата и развитие тканевого ацидоза. К ним относится реакция трансаминирования пирувата с дезаминированием аспартата, которая приводит к образова-

нию аланина и оксалоацетата [7]. Последний в серии процессов превращается в сукцинат, что позволяет получать дополнительный ресурс АТФ [7, 8]. Определенные изменения выявлены и на уровне клеточных систем [9].

Особый интерес представляют начальные этапы перестройки тканевого метаболизма моллюсков при адаптации к условиям дефицита кислорода. Это можно исследовать только в условиях умеренной гипоксии. По общему признанию первые признаки развития гипоксического состояния у бентосных организмов наблюдаются при концентрации кислорода $2 \text{ мг О}_2 \text{ л}^{-1}$ [10]. В настоящей работе в условиях эксперимента исследуется именно этот режим.

В качестве объекта исследования выбрана средиземноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Представители рода *Mytilus* широко распространены по побережью Мирового океана и являются одной из самых массовых групп двусторчатых моллюсков [11]. Они являются общепризнанным объектом биоиндикации качества морских акваторий [12]. Поэтому информация, полученная на представителях данного рода, может иметь не только теоретическое, но и практическое значение.

Цель работы — в условиях эксперимента исследовать влияние режима умеренной гипоксии на активность ряда маркерных ферментов энергетического обмена, содержание метаболитов и состояние аденилатной системы тканей средиземноморской мидии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

Исследование проводили на взрослых особях средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), собранных с коллекторных установок “Дон-Комп” (Стрелецкая бухта, Севастополь) в июне (период минимальной нерестовой активности) 2022 г. Размеры раковины составляли 65–85 мм в длину и 28–40 мм в высоту. Использовали экземпляры исключительно с черной окраской раковины. Установлено, что цветовые морфы мидии обладают различной интенсивностью тканевого метаболизма и отличаются активностью некоторых ферментов [13]. Транспортировку осуществляли в пластиковых контейнерах без воды в течение 1 ч с момента сбора. После транспортировки мидии содержались в 30-литровых стеклянных аквариумах, оборудованных системой проточной морской воды, в течение 3 дней для снятия стресса. Считается, что этого времени достаточно для восстановления функциональной нормы [14].

Моделирование умеренной гипоксии

Контрольную группу мидий ($n = 12$) содержали при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, концентрации кислорода в воде $6.8\text{--}6.9 \text{ мг О}_2 \text{ л}^{-1}$ и солености $17\text{--}18\text{‰}$. Опытную ($n =$

$= 12$): при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $17\text{--}18\text{‰}$ и $1.9\text{--}2.0 \text{ мг О}_2 \text{ л}^{-1}$. Экспозиция составляла 72 ч. Фотопериод — 12 ч (день): 12 ч (ночь). Содержание кислорода в воде понижали путем барботажа газообразным азотом в течение 4–5 ч. Контроль за уровнем кислорода в воде проводили при помощи оксиметра “Ohaus Starter 300 D” (США). Ежедневно меняли воду в аквариумах для удаления метаболитов с сохранением заданной концентрации кислорода в воде.

Препарирование тканей

Для лабораторного анализа были выбраны жабры и гепатопанкреас. Жабры являются наиболее чувствительной структурой по отношению к условиям водной среды и определяют кислородный режим большинства тканей моллюска [15, 16]. Гепатопанкреас — орган, координирующий течение метаболических процессов на организменном уровне. Ткани препарировали при температуре $0\text{--}4^\circ\text{C}$. Полученные образцы хранили в морозильной камере “Farma 900 Series” (TermoScientific, США) при -80°C . Гомогенаты готовили непосредственно в день эксперимента на льду ($0\text{--}4^\circ\text{C}$). Для получения супернатанта их центрифугировали при $10\,000 \text{ об мин}^{-1}$ в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением “Eppendorf 5424 F” (Германия).

Биохимические исследования

Активность альдолазы (4.1.2.13) определяли по методу Товарниченко—Валуйской [17]. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 540 нм по скорости расщепления фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ). В качестве среды выделения использовали 1.15%-ный р-р KCl, как описано ранее [18]. Активность выражали в мкмоль ФДФ $\text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Активность малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27) измеряли при длине волны 340 нм по скорости окисления НАД H_2 , используя в качестве среды выделения 0.2 М Трис-HCl буфер, pH 7.5 [19]. Субстратом для определения активности ЛДГ служил пируват, а для МДГ — оксалоацетат. Активность выражали в мкмоль НАД $\text{H}_2 \text{ мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ, 1.3.99.1) определяли при длине волны 420 нм по скорости восстановления феррицианида калия [20]. В качестве трансформирующей среды использовали 0.1 М калий — фосфатный буфер. Активность выражали в нмоль сукцината $\text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Содержание белка в пробах контролировали микробиуретовым методом [21]. В качестве стандарта использовали кристаллический сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich A8806). Все измерения выполняли на двухлучевом

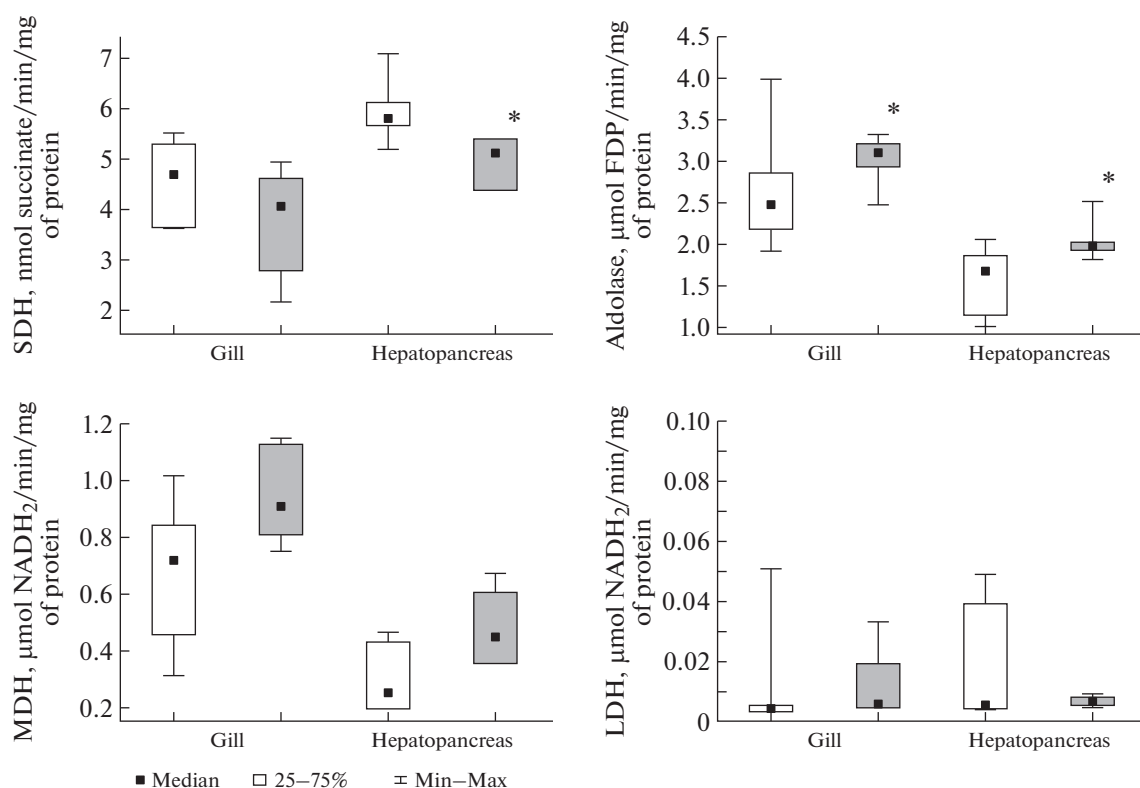


Рис. 1. Активность ферментов энергетического обмена жабр и гепатопанкреаса мидий в условиях нормоксии и умеренной гипоксии. SDH – сукцинатдегидрогеназа, MDH – малатдегидрогеназа, LDH – лактатдегидрогеназа, белый – нормоксия, серый – гипоксия, * – $p \leq 0.05$.

спектрофотометре “SPECS SSP-715” (Россия), при температуре 20°C.

Концентрацию глюкозы (моносахаридов) определяли с помощью лабораторного набора “ГЛЮКОЗА-4-ОЛЬВЕКС” при длине волны 500 нм. Лактата – с использованием набора “МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА-ОЛЬВЕКС” при длине волны 500 нм. Пирувата – с использованием набора “ПИРУВАТ UV-АБРИС+” при длине волны 340 нм. Концентрацию выражали в нмоль мг^{-1} ткани.

Содержание адениловых нуклеотидов в тканях мидии регистрировали хемилюминесцентным методом [22]. Результаты выражали в мкмоль г^{-1} ткани. Средняя масса навески жабр составляла 4.8 мг. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.1 М трис-ацетатном буфере, pH 7.75, на холоде (0–4°C). Аденилатный комплекс экстрагировали в кипящем буфере на водяной бане в течение 5 мин. Полученные экстракты замораживали до дальнейшего анализа (–80°C). Определение АТФ проводили по световой эмиссии с добавлением люциферин-люциферазы на приборе “TP-Luminometer 1250” (ЛКВ, Швеция). АДФ и АМФ восстанавливали до АТФ с применением пируваткиназы и аденилаткиназы. Аденилатный энергетический заряд (АЭЗ)

рассчитывали, используя концентрацию (C) нуклеотидов по формуле [23]:

$$\text{АЭЗ} = \frac{C_{\text{АТФ}} + \frac{1}{2}C_{\text{АДП}}}{C_{\text{АТФ}} + C_{\text{АДП}} + C_{\text{АМФ}}}.$$

Статистический анализ

При проведении сравнительного анализа применен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) PAST Version 4.09. Нормальность распределения выборочных совокупностей проверяли по Shapiro–Wilk (W -test). Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического критерия U-критерия Манна–Уитни. Минимальный уровень значимости составлял $p \leq 0.05$. Объем выборочных совокупностей: 12 особей (контроль), 12 особей (опыт).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Жабры

В условиях умеренной гипоксии в данном органе отмечали снижение активности СДГ на 19–20% (рис. 1). Это происходило на фоне роста активности ряда гликолитических ферментов – альдолазы и

МДГ, на 17% ($p \leq 0.05$) и 38% ($p \leq 0.05$) соответственно. Следует отметить крайне низкую активность ЛДГ в данной структуре (0.010 ± 0.008 мкмоль НАД Н₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка), величина которой не изменялась в условиях экспериментальной нагрузки.

Дефицит кислорода сопровождался существенным повышением содержания в органе глюкозы (рис. 2). В сравнении с контролем различия составляли более 55% ($p \leq 0.01$). Еще более значительные изменения претерпело содержание пирувата. Уровень данного соединения увеличился в 2.5–2.6 раза ($p \leq 0.01$). При этом содержание лактата в ткани жабр не изменялось.

Состояние аденилатной системы жабр моллюска в целом совпадало с контрольными величинами. Различия в уровне АТФ, АДФ, АМФ, пуле аденилатов не были статистически значимы (рис. 3). То же наблюдалось и в отношении АЭЗ (рис. 4).

Гепатопанкреас

Характер изменения активности ферментов в данном органе был близок к отмеченному в отношении жабр (рис. 1). Активность СДГ понижалась на 16–17%, при этом альдолазы увеличивалась на 31–32% ($p \leq 0.05$). Отмечали также рост активности МДГ, однако различия в сравнении с контрольными величинами не были значимы. Активность ЛДГ также была слабо выражена и не изменялась на протяжении эксперимента.

Гепатопанкреас отличался высоким содержанием глюкозы. В сравнении с жабрами уровень данного соединения был в почти в 5 раз выше ($p \leq 0.001$) (рис. 2). Гипоксия не оказывала значимого влияния на содержание глюкозы в данном органе. При этом уровень пирувата относительно контрольных значений увеличивался более, чем в 2 раза ($p \leq 0.05$), а содержание лактата уменьшалось в 4 раза ($p \leq 0.01$).

Определенные изменения отмечали и в состоянии аденилатной системы (рис. 3). Уровень АДФ и АМФ повышался почти в 2 раза ($p \leq 0.05$ – 0.01). При этом содержание фракции АТФ совпадало с контрольными величинами. Это приводило к увеличению пула аденилатов и снижению АЭЗ на 32 и 26% соответственно ($p \leq 0.05$) (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из эффектов, зарегистрированных в настоящей работе, явилось снижение активности СДГ в жабрах и гепатопанкреасе в ответ на условия умеренной гипоксии. Известно, что данный фермент принимает участие в реакциях цикла трикарбоновых кислот и одновременно входит в структуру дыхательной цепи переноса электронов (комплекс II) [24]. Это позволяет констатировать факт ограничения аэробных процессов в обоих органах. Показано также участие СДГ в перераспределении

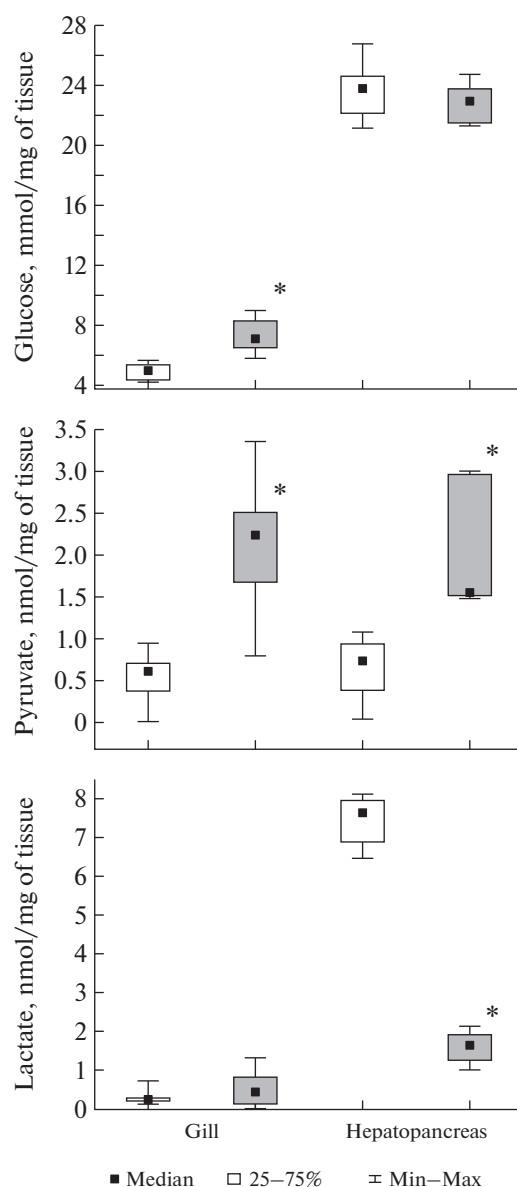


Рис. 2. Содержание глюкозы, пирувата и лактата в жабрах и гепатопанкреасе мидий в условиях нормоксии (белый) и умеренной гипоксии (серый). * – $p \leq 0.05$.

гликолитических метаболитов в направлении образования сукцината в условиях анаэробноза. Это позволяет митохондриям сохранять функциональную активность в условиях острой нехватки кислорода [25]. Подобные эффекты показаны для многих видов двустворок [7].

В настоящей работе об усилении анаэробных процессов в тканях моллюска косвенно свидетельствовали увеличение активности альдолазы, МДГ и повышение содержания пирувата. При этом роста содержания лактата не наблюдали (жабры). В гепатопанкреасе, напротив, уровень данного соединения существенно понижался. Отсутствие роста содержания лактата в тканях в условиях острой

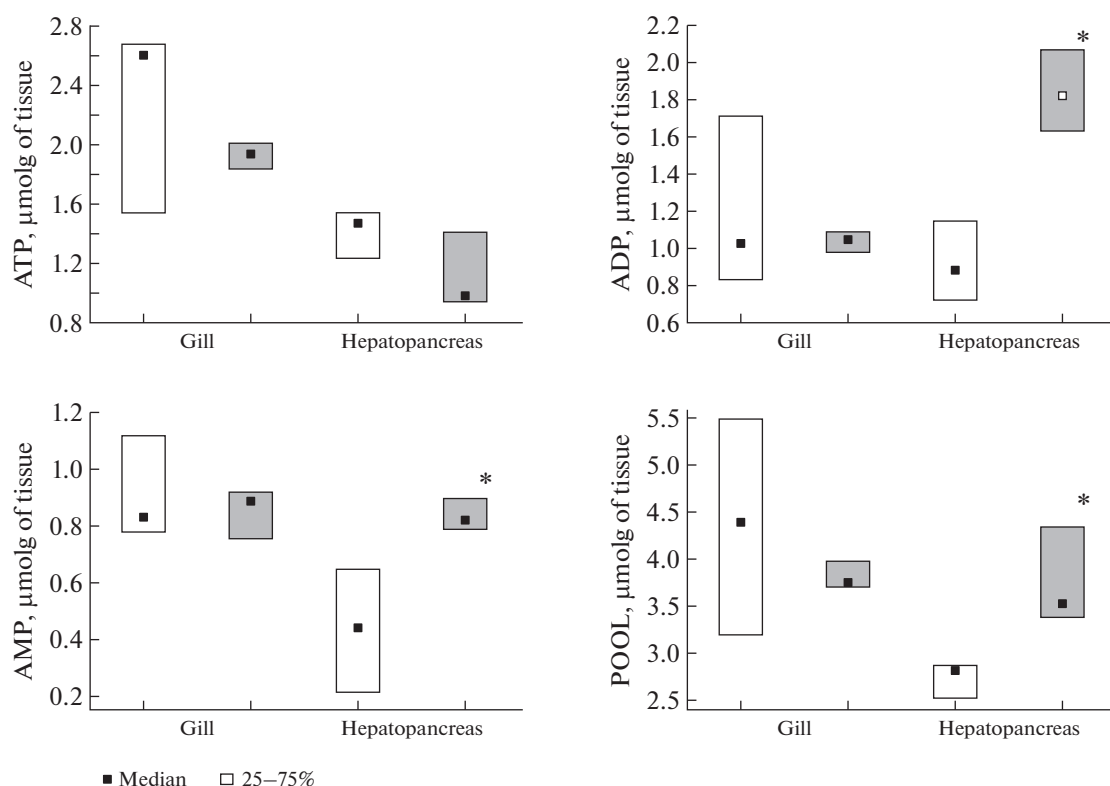


Рис. 3. Состояние аденилатной системы жабр и гепатопанкреаса мидий в условиях нормоксии и умеренной гипоксии. POOL — пул аденилатов, белый — нормоксия, серый — гипоксия, * — $p \leq 0.05$.

гипоксии показано ранее и для других видов моллюсков [26]. При этом отмечалась крайне низкая эффективность ЛДГ, что совпадает с результатами настоящей работы. Это означает, что глюкозо-лактатное направление метаболизма [27], свойственное большинству организмов, у моллюсков в условиях умеренной гипоксии явно подавлялось.

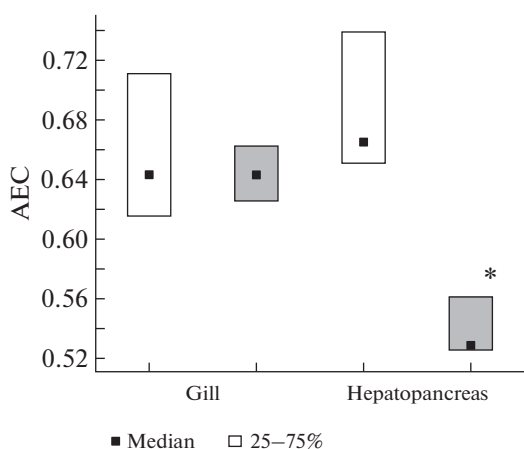
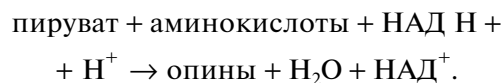


Рис. 4. Величина АЭЗ жабр и гепатопанкреаса мидий в условиях нормоксии и умеренной гипоксии. AES — аденилатный энергетический заряд, белый — нормоксия, серый — гипоксия, * — $p \leq 0.05$.

Считается, что у многих беспозвоночных терминальными гликолитическими ферментами являются опиндегидрогеназы [25]. Они сопрягают реакцию взаимодействия пирувата с аминокислотами с образованием опинов [28]:



Опины не оказывают столь выраженного влияния на величину тканевого pH, как лактат, что имеет адаптивное значение [29]. Среди опиндегидрогеназ выделяют октопиндегидрогеназу (*OcDH*) (EC 1.5.1.11), проявляющую выраженное сродство к L-аргинину [30]. Показан рост ее активности в условиях дефицита кислорода [31]. Активность данного фермента была идентифицирована в тканях представителей рода *Mytilus* [31], в том числе *Mytilus galloprovincialis* [32]. Можно допустить, что глюкозо-опинное направление метаболизма [27] в условиях дефицита кислорода начинает доминировать над процессами классического анаэробного гликолиза. В этом, по-видимому, следует искать объяснение низкой эффективности ЛДГ и отсутствию изменения содержания лактата в тканях, показанную в настоящей работе.

Значительное число работ посвящено участию митохондрий морских организмов в адаптации к

условиям дефицита кислорода. Особое внимание уделяется организмам, толерантным к условиям острой гипоксии [33]. Отмечается их способность переходить к суббазальным скоростям метаболизма, с сохранением тканевого ресурса АТФ и быстрым восстановлением процессов окислительного фосфорилирования в условиях реоксигенации [34]. О состоянии аденилатной системы в основном судят по содержанию фракции АТФ [33, 34]. Особенность настоящей работы состоит в том, в ней дается развернутая характеристика аденилатного комплекса. Ранее подобная информация приводилась нами в только в отношении другого двусторчатого моллюска — анадары (*Anadara kagoshimensis*, Tokunaga, 1906) [26].

Анализ состояния аденилатного комплекса в жабрах средиземноморской мидии позволяет констатировать факт отсутствия каких-либо значимых изменений в системе в условиях умеренной гипоксии. Содержание АТФ, АДФ, АМФ сохранялось на уровне контрольных величин. То же можно сказать в отношении пула аденилатов и АЭЗ. Это свидетельствует о том, что реорганизация углеводного метаболизма, отмеченная выше в данном органе моллюска, позволяет сохранять ее энергетический статус.

В гепатопанкреасе ситуация была иной. При сохранении содержания АТФ в органе повышался ресурс АДФ и АМФ, что определяло увеличение пула аденилатов и снижение АЭЗ. Такая ситуация возможна только в случае поступления АДФ и АМФ в гепатопанкреас извне. Можно допустить участие в этом процессе системы циркуляции гемолимфы, которая насыщается фракциями АДФ и АМФ в условиях гипоксии со стороны других органов и тканей. Способность гепатопанкреаса моллюсков избирательно накапливать фракции АДФ и АМФ ранее не обсуждалась. Эта информация является новой.

Следствием роста содержания АМФ в гепатопанкреасе может быть образование повышенных количеств цАМФ. Последний является аллостерическим регулятором протеинкиназы А (ПКА) [35]. Протеинкиназа А зарегистрирована в тканях двусторчатых моллюсков и часто используется в качестве маркера в экодиагностике [36]. Показано ее активное участие в адаптации моллюсков к условиям внешней гипоксии [37, 38]. Данный фермент является триггером катаболических путей, направленных на активную продукцию АТФ [35]. Как показали наблюдения, действие протеинкиназы А направлено на поддержание окислительных процессов в тканях в условиях внешнего дефицита кислорода [38]. Установлено, что активация ПКА индуцируется ростом отношения АМФ/АТФ [39, 40]. В нашем случае действительно происходит рост индекса АМФ/АТФ в гепатопанкреасе за счет поступления АМФ из систем циркуляции, о чем говорилось выше. Этот факт позволяет допустить рост активности

ПКА и у средиземноморской мидии в условиях внешнего дефицита кислорода.

Одним из результатов настоящей работы явилось существенное повышение содержания глюкозы в жабрах моллюска, что также свидетельствует об усилении анаэробных процессов [7]. Процесс, по-видимому, контролируется со стороны гепатопанкреаса. Данный орган располагает организменным ресурсом гликогена [41] и имеет повышенный уровень глюкозы, которая распределяется в организме моллюска при участии системы циркуляции гемолимфы. В настоящей работе различия в содержании глюкозы между жабрами и гепатопанкреасом превышали 5 раз. Прямое участие в этом процессе может также принимать ПКА, активность которой в условиях повышенных значений индекса АМФ/АТФ в гепатопанкреасе должна быть высокой. Данный фермент принимает непосредственное участие в обмене углеводов, в частности гидролизе молекул гликогена в условиях энергетического дефицита [42], что имеет прямое отношение к процессам, наблюдаемым в гепатопанкреасе моллюска. Действие ПКА на углеводный обмен может быть опосредовано и через увеличение экспрессии генов глюкозного транспортера (GLUT-4) и гексокиназы [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленной информации следует, что в условиях умеренной гипоксии в организме средиземноморской мидии развивался комплекс реакций, направленных на поддержание энергетического статуса тканей. Аэробные процессы явно ограничивались, о чем свидетельствовало снижение активности СДГ. Одновременно усиливались анаэробные процессы в тканях. Повышалась активность альдолазы, МДГ, увеличивалось содержание пирувата. При этом глюкозо-лактатное направление метаболизма явно подавлялось. Об этом свидетельствовало отсутствие роста активности ЛДГ и содержания лактата в тканях. Допускается переключение метаболизма на глюкозо-опинное направление, свойственное представителям рода *Mytilus*. Развернутая характеристика состояния аденилатной системы позволяет констатировать, что ткани моллюска сохраняли исходный энергетический статус. Содержание фракции АТФ оставалось на уровне контрольных значений, что отражало адаптивную направленность реорганизации тканевого метаболизма. Впервые отмечена способность гепатопанкреаса аккумулировать фракции АДФ и АМФ из систем циркуляции в условиях гипоксической нагрузки. Полагаем, что это может быть основной причиной роста пула аденилатов и понижения значений АЭЗ в данном органе. Из представленных результатов следует, что реорганизация процессов углеводного обмена в тканевых структурах средиземноморской мидии в усло-

виях умеренной гипоксии позволяет сохранять энергетический статус ее тканей. Это является одним из основных условий, позволяющих моллюску осваивать проблемные гипоксические акватории.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания: “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (№ 121041400077-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента — А.А.С., К.А.С.; сбор данных — К.А.С., Г.И.В., Б.Ю.В., Ш.Н.Е.; обработка данных — А.А.С., К.А.С., Г.И.В., Б.Ю.В., Ш.Н.Е.; написание и редактирование манускрипта — А.А.С., К.А.С.; постановка эксперимента — Р.В.Н.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность с.н.с., к.б.н. И.Н. Сысоевой, и н.с. А.А. Сысоеву за методическую помощь в определении параметров состояния аденилатной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haszprunar G, Wanninger A* (2012) Molluscs. *Current Biol* 22 (13): R510–514. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.039>
2. *Zaitsev YP* (1986) Contourionts in ocean monitoring. *Environ Monit Assess* 7 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1007/BF00398026>
3. *Berger VJ, Kharazova AD* (1997) Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia* 355: 115–126.
4. *Miyamoto Y, Iwanaga C* (2017) Effects of sulphide on anoxia-driven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell *Anadara kagoshimensi*. *J Mar Biol Assoc UK* 97 (2): 329–336. <https://doi.org/10.1017/S0025315416000412>
5. *Storey KB, Storey JM* (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev* 79: 207–233. <https://doi.org/10.1017/s1464793103006195>
6. *Storey KB* (2004) Gene regulation in physiological stress. *Inter Congress Ser* 1275: 1–13.
7. *Larade K, Storey KB* (2002) A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. *Cell and molecular responses to stress*. Vol. 3. Sensing, signaling and cell adaptation. 2002.
8. *Tielens A, Van Hellemond J* (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1365: 71–78. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00045-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00045-0)
9. *Kladchenko ES, Andreyeva AY, Kukhareva TA, Soldatov AA* (2020) Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 98: 1030–1032.
10. *Rosenberg R, Nilsson HC, Diaz RJ* (2001) Response of benthic fauna and changing sediment redox profiles over a hypoxic gradient. *Estuar Coast Shelf S* 53 (3): 343–350.
11. *Hilbish TJ, Mullinax A, Dolven SI, Meyer A, Koehn RK, Rawson P* (2000) Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus spp.*): routes and timing of transequatorial migration. *Mar Biol* 136: 69–77. <https://doi.org/10.1007/s002270050010>
12. *Benali I, Boutiba Z, Merabet A, Chèvre N* (2015) Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Marine Pollution Bull* 95: 385–394.
13. *Kulikova AD, Soldatov AA, Andreenko TI* (2015) Tissue transaminase activities in the black-sea mollusc *Mytilus galloprovincialis* Lam. with different shell color. *J Evol Biochem Physiol* 51 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1134/S0022093015010044>
14. *Ribera D, Narbonne JF, Michel X, Livingstone DR, O'Hara S* (1991) Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp Biochem Physiol* 100C: 177–181. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90149-n](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90149-n)
15. *Soldatov AA, Gostyukhina OL, Golovina IV* (2008) State of the antioxidant enzyme complex in tissues of the Black Sea mollusc *Mytilus galloprovincialis* under natural oxidative stress. *J Evol Biochem Physiol* 44 (2): 175–182. <https://doi.org/10.1134/S0022093008020047>
16. *Soldatov AA, Gostyukhina OL, Golovina IV* (2014) Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress. *J Evol Biochem Physiol* 50 (3): 206–214.
17. *Kamyshnikov VS* (2004) Handbook of Clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics. M. MEDpress-inform. 494 p.
18. *Lantushenko AO, Vodiasova EA, Kokhan AS, Meger YaV, Soldatov AA* (2023) Aldolase of *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819: Gene structure, tissue specificity of expression level and activity. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Molecular Biol* 267: Art. no. 110862 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110862>
19. *Kolesnikova EE, Golovina IV* (2020) Oxidoreductase Activities in Oxyphilic Tissues of the Black Sea Ruff *Scorpaena porcus* under Short-term Hydrogen Sulfide Loading. *J Evol Biochem Physiol* 56 (5): 459–470. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050099>
20. *Rezyapkin VI, Slyshenkov VS, Zavodnik IB, Burd VN, Sushko LI, Romanchuk EI, Karaedova LM* (2009) Laboratory workshop on biochemistry and biophysics. Grodno. GrSU.

21. *Itzhaki RF, Gill DM* (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry* 9 (4): 401–410.
22. *Holm-Hansen O, Booth CR* (1966) The measurement of adenosine triphosphate in the Ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr* 11 (4): 510–519. <https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.4.0510>
23. *Atkinson DE* (1968) The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7 (11): 4030–4034. <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>
24. *Iverson TM* (2013) Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827 (5): 648–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2012.09.008>
25. *Bacchiocchi S, Principato G* (2000) Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis. *J Exp Zool* 286: 107–113.
26. *Soldatov AA, Andreenko TI, Sysoeva IV, Sysoev AA* (2009) Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. under conditions of experimental anoxia. *J Evol Biochem Physiol* 45 (3): 349–355. <https://doi.org/10.1134/S002209300903003X>
27. *Harcet M, Perina D, Pleše B* (2013) Opine dehydrogenases in marine invertebrates. *Biochem Genet* 51 (9): 666–676. <https://doi.org/10.1007/s10528-013-9596-7>
28. *Vázquez-Dorado S, De Carlos A, Comesaña AS, Sanjuán A* (2013) Phylogenetic comparison of opine dehydrogenase sequences from marine invertebrates. *Biochem Genet* 51 (1–2): 54–65. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9551-z>
29. *Zammit VA* (1978) Possible relationship between energy metabolism of muscle and oxygen binding characteristics of haemocyanin of cephalopods. *J Mar Biol Assoc UK* 58:421–424. <https://doi.org/10.1017/S0025315400028083>
30. *Vázquez-Dorado SSanjuán A, Comesaña AS, Carlos A* (2011) Identification of octopine dehydrogenase from *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol Part B* 160: 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.003>
31. *Storey KB, Dando PR* (1982) Substrate specificities of octopine dehydrogenases from marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 73: 521–528. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90069-4)
32. *Gosling E* (1981) Ecological genetics of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on Irish coasts. *Marine Ecology Progress Series* 4 (2): 221–227. <https://doi.org/10.3354/meps004221>
33. *Sokolova IM, Sokolov EP, Fouzia Haider F* (2019) Mitochondrial Mechanisms Underlying Tolerance to Fluctuating Oxygen Conditions: Lessons from Hypoxia-Tolerant Organisms. *Integr Comp Biol* 59 (4): 938–952. <https://doi.org/10.1093/icb/icz047>
34. *Ivanina AV, Irina Nesmelova I, Leamy L, Sokolov EP, Sokolova IM* (2016) Intermittent hypoxia leads to functional reorganization of mitochondria and affects cellular bioenergetics in marine molluscs. *J Exp Biol* 219 (Pt 11): 1659–1674. <https://doi.org/10.1242/jeb.134700>
35. *Hardie DG* (2003) Minireview. The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179–5183. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0982>
36. *Goodchild CG, Frederich M, Zeeman SI* (2015) AMP-activated protein kinase is a biomarker of energetic status in freshwater mussels exposed to municipal effluents. *Sci Total Environ* 512–513: 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.065>
37. *Guévelou E, Huvet A, Sussarellu R, Milan M, Guo X, Li L, Zhang G, Quillien V, Daniel JY, Quére C, Boudry P, Corporeau C* (2013) Regulation of a truncated isoform of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Comp Physiol B* 183 (5): 597–611. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0743-6>
38. *Sokolov EP, Markert S, Hinzke T, Hirschfeld C, Becher D, Ponsuksili S, Sokolova IM* (2019) Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *J Proteomics* 194: 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>
39. *Longnus SL, Wambolt RB, Parsons HL, Brownsey RW, Allard MF* (2003) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R936–R944. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00319.2002>
40. *Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA* (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280: 29060–29066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503824200>
41. *Vodáková B, Douda K* (2019) Variation in Glycogen Distribution among Freshwater Bivalve Tissues: Simplified Protocol and Implications. *J Aquat Anim Health* 31 (1): 107–111. Epub 2019 Feb 4. <https://doi.org/10.1002/aah.10057>
42. *Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen Z-P, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, van Denderen B, Jennings IG, Iseli T, Michell BJ, Witters LA* (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 31: 162–168. <https://doi.org/10.1042/bst0310162>
43. *Barnes BR, Marklund S, Steiler TL, Walter M, Hjälm G, Amarger V, Mahlapuu M, Leng Y, Johansson C, Galuska D, Lindgren K, Abrink M, Stapleton D, Zierath JR, Andersson L* (2004) The 5'-AMP-activated protein kinase 3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem* 279: 38441–38447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405533200>

PARAMETERS OF ENERGY METABOLISM AND ADENYLATE SYSTEM OF MYTILUS GALLOPROVINCIALIS TISSUES (LAMARCK. 1819) IN CONDITIONS OF MODERATE HYPOXIA

A. S. Kokhan^a, A. A. Soldatov^{a,b,#}, I. V. Golovina^a, Yu. V. Bogdanovich^a,
N. E. Shalagina^a, and V. N. Rychkova^a

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

^b*Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

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

The effect of moderate hypoxia on the processes of energy metabolism in the tissues (gills, hepatopancreas) of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) was studied experimentally. The control group of mollusks contained $6.8\text{--}6.9\text{ mgO}_2\text{ l}^{-1}$, the experimental group at $1.9\text{--}2.0\text{ mgO}_2\text{ l}^{-1}$. In both cases, the water temperature was $22 \pm 1^\circ\text{C}$, the salinity was 17–18‰. The exposition – 72 hours. The oxygen content in the water was lowered by bubbling with nitrogen gas for 4–5 hours. In conditions of moderate hypoxia, a complex of reactions aimed at maintaining the energy status of tissues developed in the body of the Mediterranean mussel. Aerobic processes were clearly limited, as evidenced by a decrease in succinate dehydrogenase (SDH) activity. At the same time, the processes of anaerobic glycolysis intensified. The activity of aldolase, malate dehydrogenase (MDH) increased, the content of pyruvate in tissues increased. This was not accompanied by an increase in lactate dehydrogenase (LDH) activity and an increase in lactate content. The tissues retained their original energy status. The content of the ATP fraction remained at the level of control values, which reflected the adaptive orientation of the reorganization of tissue metabolism. The ability of hepatopancreas to accumulate ADP and AMP fractions from circulation systems under experimental hypoxic load was noted.

Keywords: moderate hypoxia, adenylate system, succinate dehydrogenase, glycolysis enzymes, glycolytic metabolites, gills, hepatopancreas, *Mytilus galloprovincialis*

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И ПЕЧЕНИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) ЗАВИСЯТ ОТ ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ЛОКАЦИИ ЕЕ В ПОПУЛЯЦИИ

© 2023 г. З. Г. Рабаданова^{1,*}, А. М. Джафарова¹

¹Дагестанский государственный университет, Махачкала, Республика Дагестан, Россия

*e-mail r.zukhra@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.05.2023 г.

После доработки 30.10.2023 г.

Принята к публикации 30.10.2023 г.

Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) имеет обширный ареал распространения, что обусловлено множеством приспособлений, способствующих развитию толерантности к широкому диапазону физико-химических факторов окружающей среды. Особый интерес представляют адаптации этих животных к различному уровню кислорода в условиях средне- и высокогорья. В данной работе проведен сравнительный анализ кинетических параметров лактатдегидрогеназы (ЛДГ) печени озерных лягушек, обитающих в горных и равнинных районах Дагестана. Отловленных в местах обитания животных декапитировали, выделяли печень и икроножные мышцы, которые помещали в жидкий азот. В лаборатории отобранные ткани гомогенизировали и методом дифференциального центрифугирования получали безмитохондриальный цитозоль, в котором определяли активность ЛДГ. Обнаружено, что активность ЛДГ значительно выше в тканях лягушек из горных районов: на 42.4% в мышцах и в 2.38 раза в печени ($p < 0.05$). Высокая эффективность катализа обеспечивается за счет существенных изменений каталитических параметров фермента: увеличения $V_{\max}$ (50.9% в мышцах и на 70% в печени, $p < 0.05$) и снижения K_m (на 45.9% в мышцах и на 69% в печени, $p < 0.05$). Более выраженная, по сравнению с мышцами, разница между активностью ЛДГ в печени предгорных и низинных популяций лягушек позволяет предположить, что чувствительность ЛДГ печени к изменениям напряженности кислорода выше. Вектор ряда других кинетических параметров ЛДГ (K_i , S_{opt} , Δ) в печени животных из горных ландшафтов абсолютно противоположен таковому скелетных мышц. Высокая активность и модификации каталитических свойств ЛДГ в тканях озерных лягушек, обитающих в среднегорье, могут играть важную роль в адаптации этих животных к условиям дефицита кислорода.

Ключевые слова: озерная лягушка, низинные и горные популяции, печень, мышцы, кинетические характеристики лактатдегидрогеназы, пойкилотермия

DOI: 10.31857/S0044452923060074, EDN: GWWEWL

ВВЕДЕНИЕ

Понимание биохимических основ адаптации является одной из ключевых задач современной эволюционной биологии, и организмы, живущие в различных эколого-географических и климатических условиях, представляют собой одни из лучших систем для изучения.

Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) имеет обширный ареал распространения и относится к фоновым видам, обладающим наибольшим инвазивным потенциалом и миграционными способностями среди других представителей *R. Esculenta complex*. Ее популяции достаточно многочисленны и способны приспосабливаться к самым экстремальным условиям обитания, в том числе, и к условиям низкого содержания кислорода в среде обитания и

резких перепадов температур. Так, на территории Дагестана, которая характеризуется большим разнообразием природных зон, озерные лягушки были обнаружены в самых различных эколого-географических ландшафтах [1].

Столь широкое распространение данного вида, скорее всего, обусловлено множеством приспособлений, способствующих развитию толерантности к широкому диапазону температур, содержанию кислорода, атмосферному давлению. Особый интерес для эволюционной биохимии и физиологии представляют высотные градиенты, которые включают в себя существенные экологические переходы на относительно коротких линейных расстояниях.

Реакции пойкилотермных позвоночных в условиях среднегорья (800–2500 м над уровнем моря,

$pO_2 \approx 132$ мм рт.ст.) и высокогорья (более 2500 м над уровнем моря, $pO_2 < 111$ мм рт.ст.) гораздо более вариабельны, чем у гомойотермных животных, а механизмы менее изучены. Организмы, обитающие в них, находятся в условиях более низкого уровня кислорода и значительных суточных перепадов температуры. Адаптивные реакции животных в такой ситуации могут быть направлены на снижение уровня метаболизма и физиологической активности животных, реакции со стороны системы эритрона (повышение содержания эритроцитов, гемоглобина, сродства кислорода к гемоглобину) или на активацию анаэробного метаболизма [2–4].

Ранее было показано, что у различных пойкилотермных животных при обитании в условиях дефицита кислорода происходят значительные изменения активности ферментов гликолиза, направленные на повышение количества оборотов данного метаболического пути, с целью компенсации возникшего при снижении напряженности кислорода энергодефицита [5].

Из всех ферментов наиболее изучены различные адаптивные изменения на уровне важнейшего фермента анаэробного гликолиза – лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) [6]. Интерес к данному ферменту обусловлен тем, что он стоит на стыке аэробного и анаэробного метаболизма и определяет направление и скорость гликолитического потока. Известно, что высокая каталитическая эффективность ЛДГ является основным условием рециркуляции гликолитического потока в условиях недостатка кислорода [7]. Причем роль ЛДГ не ограничивается только лишь восстановлением пирувата или окислением лактата. Множество новых исследователей указывают на то, что основная функция ЛДГ заключается в регуляции соотношения $НАД^+/НАДН$, которое влияет на скорость многих каталитических реакций и транскрипцию генов, связанных с метаболизмом, циркадианными ритмами [8]. Кроме того, ЛДГ может выполнять и множество других неклассических функций. Предполагается, что ЛДГ принимает участие в клеточном цикле и регуляции активности АТФ-зависимого K^+ канала [9, 10].

Несмотря на большое количество работ по изучению активности фермента у широко-ареальных пойкилотермных животных, обитающих в условиях различной напряженности кислорода, механизмы изменения скорости катализа ЛДГ и ее регуляции недостаточно раскрыты. Более того, открытыми остаются вопросы о том, как изменения происходят в ферментах энергетических путей, локализованных в различных органах, существенно отличающихся по уровню аэробного метаболизма. Одним из методов оценки молекулярных механизмов изменений активности ферментов является исследование их каталитических характеристик.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование кинетических параметров ЛДГ печени и скелетных мышц озерных лягушек, популяции которых заселяют низинные и горные ландшафты Дагестана.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Исследования были выполнены на низинных озерных лягушках, отловленных в начале июня в окрестностях города Махачкала ($42^\circ 58'S$, $47^\circ 30'W$, высота над уровнем моря 10 м, $pO_2 \sim 151$ мм рт.ст., среднесуточная температура $+23^\circ C$) и горных, отловленных в Казбековском районе Республики Дагестан ($42^\circ 59'S$ $46^\circ 44'W$, 1400–1500 м, $pO_2 \sim 122$ мм рт.ст., среднесуточная температура $+18^\circ C$). Масса тела животных составляла 28–50 г. В условиях обитания животных, после наркотизации (эфир) и последующего разрушения спинного мозга, декапитировали, выделяли икроножные мышцы и печень, которые помещали в жидкий азот.

Получение безмитохондриального цитозоля. В условиях лаборатории икроножные мышцы и печень измельчали и гомогенизировали в 4 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4). Гомогенат центрифугировали при 600 g (10 мин). Полученный супернатант повторно центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин.

Определение активности ЛДГ. Активность ЛДГ определяли по убыли содержания $НАДН_2$ в реакционной смеси в результате энзиматического восстановления пирувата в лактат, что регистрировалось спектрофотометрически (при длине волны 340 нм в течение 1 мин). Реакционная смесь содержала 2.4 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4), 0.3 мл раствора пирувата натрия (“Sigma”, США), 0.3 мл 1 мМ раствора $НАДН_2$ (“Sigma”, США) и 0.05 мл тканевого экстракта, содержащего 25 мкг белка. Экстракт с заданной концентрацией белка в пробе получали путем предварительного разведения фосфатным буфером исходного безмитохондриального цитозоля. Исследование активности ЛДГ проводили в диапазоне концентраций пирувата от 0.003125 до 12.8 мМ. По результатам строили графики концентрационной зависимости. Активность ЛДГ выражали в наномолях $НАДН$, окисленного в результате ферментативной реакции за 1 мин на 1 мг белка (нмоль/мин*мг белка).

Определение белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

Определение кинетических характеристик. Для определения кинетических характеристик (максимальной скорости (V_{max}), константы Михаэлиса (K_m) по концентрационной зависимости скорости окисления $НАДН$ методом наименьших квадратов, использовали пакет СТАТИСТИКА.

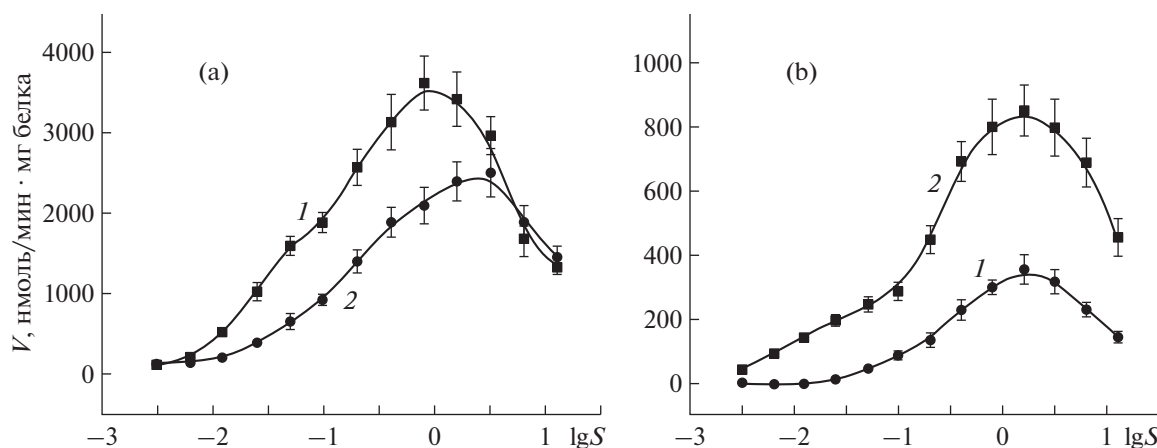


Рис. 1. Концентрационная зависимость ЛДГ скелетных мышц (а) и печени (б) озерных лягушек из низинных (1) и горных (2) районов Дагестана ($n = 11$).

В опции “нелинейное оценивание” использовали уравнение Холдейна.

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m^{PYR} + [S] + \frac{[S]^2}{K_i^{PYR}}},$$

где $V_{\max}$ — максимальная скорость, K_m^{PYR} — константа Михаэлиса для пирувата, K_i^{PYR} — константа ингибирования для пирувата, V — скорость реакции; $[S]$ — концентрация субстрата.

Оптимальное значение концентраций субстрата (S_{opt}) вычисляли по формуле

$$S_{\text{opt}} = \sqrt{K_m \cdot K_i}.$$

Статистическая обработка результатов. Обработка данных произведена с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 22 (IBM, США). Однородность дисперсий экспериментальных данных оценивали с помощью критериев Левина и Уэлча. Для сравнения экспериментальных данных использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0.05$. Данные на рисунках и таблицах представлены в виде $M \pm m$. Каждая кривая на графиках концентрационной зависимости скорости катализа ЛДГ — среднее 11 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены концентрационные зависимости активности ЛДГ в тканях озерных лягушек, обитающих в условиях низинных и горных районов Дагестана. Все графики концентрационных зависимостей имеют колоколообразный характер, что свидетельствует о наличии у данного фермента феномена субстратного ингибирования.

Ранее субстратное ингибирование ЛДГ было обнаружено при исследовании кинетики данного фермента как у пойкилотермных [6], так и у гомойотермных животных [12].

Следует отметить то, что характер концентрационной зависимости и активности ЛДГ в печени и мышцах лягушек существенно отличается. Так, у низинных популяций лягушек активность ЛДГ в мышцах при концентрации пирувата 1.6 мМ выше в 6.7 раза по сравнению с таковой печени (скорость катализа ЛДГ в мышцах — 2401.1 ± 225.4 , в печени — 356.2 ± 25.5 ; $p < 0.05$) (рис. 1).

Как видно из рис. 1а, активность ЛДГ в скелетных мышцах горных лягушек выше таковой низинных в широком диапазоне исследованных концентраций пирувата (за исключением самых низких и высоких). Например, при концентрации 1.6 мМ активность ЛДГ у горных лягушек выше таковой низинных на 42.4% (у низинных — 3420.89 ± 334.0 , у горных — 2401.1 ± 225.4 , $p < 0.05$). При этом происходят значительные изменения характера концентрационной зависимости: смещение точки максимума, соответствующей оптимальной концентрации субстрата в сторону более низких концентраций. Следует отметить, что на кинетической кривой ЛДГ низинных лягушек, в отличие от горных, ясно прослеживается сигмоидный характер концентрационной зависимости.

Поскольку концентрационная зависимость ЛДГ четко демонстрирует феномен субстратного ингибирования, то для описания кинетики и нахождения кинетических параметров фермента при насыщающих и фиксированных концентрациях кофактора (НАДН) целесообразно использовать модель Холдейна. Применяя данную математическую модель кинетики ферментативной реакции, были вычислены кинетические характеристики ЛДГ (K_m , $V_{\max}$, K_i) (табл. 1).

Таблица 1. Кинетические характеристики ЛДГ скелетных мышц озерных лягушек из низинных и горных районов Дагестана ($n=11$)

Локация озерных лягушек	Кинетические характеристики					
	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}/K_m$	K_i	S_{opt}	$\Delta(K_i-K_m)$
низинные	3010.15 ± 138.69	0.220 ± 0.018	13681.8 ± 927.5	12.87 ± 0.77	1.68 ± 0.12	12.65 ± 1.31
горные	$4544.52 \pm 306.3^*$	$0.119 \pm 0.008^*$	$38189.1 \pm 4225.7^*$	$5.17 \pm 0.61^*$	$0.615 \pm 0.05^*$	$5.05 \pm 0.33^*$

* — изменения достоверны относительно низинных локаций ($p < 0.05$).

Таблица 2. Кинетические характеристики ЛДГ печени озерных лягушек из низинных и горных районов Дагестана ($n = 11$)

Локация озерных лягушек	Кинетические характеристики					
	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}/K_m$	K_i	S_{opt}	$\Delta(K_i-K_m)$
низинность	654.66 ± 59.00	0.715 ± 0.048	915.60 ± 53.80	3.801 ± 0.36	1.64 ± 0.11	3.085 ± 0.24
среднегорье	$1086.77 \pm 113.21^*$	$0.222 \pm 0.015^*$	$4895.3 \pm 154.64^*$	$10.472 \pm 1.30^*$	1.52 ± 0.09	$10.24 \pm 1.28^*$

* — $p < 0.05$ относительно низинных локаций.

На табл. 1 видно, что значение $V_{\max}$ для ЛДГ скелетных мышц у горных лягушек выше таковой низинных на 50.9%. При этом значения K_m , напротив, ниже на 45.9%. Вследствие таких разнонаправленных изменений кинетических параметров отношение $V_{\max}/K_m$, которое отражает эффективность катализа фермента при физиологических концентрациях субстрата, у горных лягушек в 2.8 раза выше таковой низинных.

Условия обитания оказывают существенный эффект на константу ингибирования (K_i) ЛДГ в условиях избыточной концентрации пирувата. У лягушек, обитающих в условиях среднегорья, K_i снижается в 2.5 раза. Это способствует существенно (на 63.4%) смещению в область низких концентраций точки оптимума S_{opt} . Поскольку значения K_m и K_i для ЛДГ скелетных мышц у горных лягушек снижаются, это, в совокупности, способствует значительному (на 60.1%) сужению для этого фермента показателя диапазона эффективных концентраций пирувата ($\Delta = K_i - K_m$).

Из рис. 1б видно, что характер различий активности и концентрационной зависимости ЛДГ из печени особей горных и низинных локаций такой же, как и в скелетной мышце. При этом активность ЛДГ у горных лягушек значительно выше таковой низинных во всем диапазоне исследованных концентраций субстрата. В частности, при концентрации 1.6 мМ активность фермента у горных выше в 2.38 раза (у горных — 850.0 ± 75.4 , у низинных — 356.2 ± 25.5 , $p < 0.05$). Интересно то, что на графиках концентрационной зависимости ЛДГ печени имеется более выраженная, по сравнению со ске-

летными мышцами, сигмоидность. Она особенно отчетливо видна на кинетической кривой ЛДГ горных лягушек (рис. 1б), из которой следует, что при концентрации 0.1 мМ происходит триггерное изменение характера концентрационной зависимости, указывающее на существенные изменения в механизмах катализа ЛДГ в области данной концентрации пирувата.

Исследование кинетических параметров ЛДГ в печени лягушек показало, что у горных особей $V_{\max}$ увеличивается на 70% относительно низинных (табл. 2).

При этом K_m (рис. 1б), напротив, снижается (на 69%). В результате таких разнонаправленных изменений значений K_m и $V_{\max}$ эффективность катализа ЛДГ в печени горных особей становится выше таковой низинных в 5.3 раза. При этом значение K_i , напротив, существенно (на 64%) увеличивается (табл. 2). Поскольку снижение K_m полностью компенсируется повышением K_i , то теоретические значения S_{opt} для данного фермента у животных, обитающих в двух разных ландшафтах, статистически не отличаются. Вместе с тем как у горных популяций происходит существенное (в 3.32 раза) повышение диапазона эффективных концентраций субстрата (табл. 2).

Таким образом, вектор изменений некоторых кинетических параметров (K_i , S_{opt} и Δ) ЛДГ печени животных, локализованных в горных ландшафтах, абсолютно противоположен таковому в скелетных мышцах. При этом изменения ряда других каталитических характеристик ($V_{\max}$ и K_m , эффективно-

сти катализа) фермента печени лягушек среднегорных локаций имеют тот же характер, что и в мышцах. Интересно то, что различия между двумя обитающими в разных эколого-географических нишах животными в печени более ярко выражены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адаптация к гипоксии содержит ряд компенсаторных реакций, направленных на поддержание нормального снабжения тканей кислородом в условиях его затрудненного поступления в кровь. Причем они связаны не только с изменениями в системе эритрона (высоким уровнем эритроцитов, гемоглобина, смещением кривой диссоциации гемоглобина), но и с изменением активности ферментных систем, а именно, с усилением анаэробного гликолиза, позволяющего осуществлять энергетические процессы при недостаточном поступлении кислорода к тканям [13]. Данное исследование было направлено на выяснение механизмов компенсаторно-приспособительных реакций на уровне важнейшего фермента анаэробного метаболизма к условиям более низкого уровня кислорода у озерных лягушек, обладающих широким спектром возможных локаций.

Результаты исследования показали, что активность и эффективность катализа ЛДГ существенно выше в тканях лягушек, обитающих в условиях среднегорья. Причем изменения эффективности катализа происходят за счет повышения $V_{\max}$ на фоне снижения K_m . Таким образом, вклад в изменение активности ЛДГ могут вносить оба кинетических параметра. $V_{\max}$ — это параметр, который зависит от двух величин: концентрации фермента и числа его оборотов (k_{cat}). Концентрация фермента в клетке может увеличиваться, главным образом, за счет повышения его биосинтеза. Возможно, что постоянное обитание горных озерных лягушек в условиях более низкой напряженности кислорода обуславливает более высокий уровень экспрессии данного фермента.

Было обнаружено, что ключевую роль в активации анаэробного метаболизма играет HIF-1 фактор (фактор, индуцируемый гипоксией) — гетеродимерный транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию множества генов, играющих важную роль в формировании толерантности к гипоксии и ишемии. HIF увеличивает экспрессию переносчиков глюкозы GLUT1 и GLUT3, что приводит к повышению скорости поглощения глюкозы. Более того, HIF-1 индуцирует сверхэкспрессию специфических гликолитических изоформ для каждого фермента, участвующего в гликолизе [14]. Показано, что HIF-1 повышает экспрессию 11 гликолитических ферментов (альдолазы А, альдолазы С, энолазы 1, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы 1,

гексокиназы 2, лактатдегидрогеназы А, фосфофруктокиназы L, фосфоглицераткиназы 1, пируваткиназы М и триозофосфатизомеразы), способствующие повышению гликолитической способности клеток. Кроме того, HIF-1 подавляет окислительный метаболизм, ограничивая поступление пирувата в цикл трикарбоновых кислот посредством индукции биосинтеза киназы пируватдегидрогеназы [15].

Интересно то, что исследование транскриптома азиатской жабы (*Bufo gargarizans*), обитающей в условиях высокогорья (≥ 2500 м), показало наличие различных генетических механизмов адаптации к гипоксии. Причем модификации генов были направлены в основном на снижение уровня метаболизма и соответственно потребления кислорода, а не на экспрессию белков, непосредственно отвечающих за адаптацию к гипоксии [16].

Особое внимание следует уделить тому, что повышение эффективности катализа ЛДГ может быть обусловлено существенным снижением K_m фермента. Оно может быть связано с перестройками в третичной структуре фермента и конфигурации активного центра таким образом, что аффинность сайта связывания ЛДГ к пирувату становится значительно выше.

Изменения K_m фермента могут быть обусловлены сдвигами в его изоферментном спектре или различными посттрансляционными модификациями. У млекопитающих известны 5 изоформ ЛДГ, обусловленных сочетанием в тетрамере двух типов субъединиц — сердечной (Н) и мышечной (М). Изоферменты ЛДГ имеют дифференциальную экспрессию в разных тканях. Изофермент ЛДГ-1 состоит из четырех Н (4Н) и является основным изоферментом, присутствующим в ткани сердца. Изофермент ЛДГ-2 состоит из трех Н и одной М субъединицы (3Н1М) и является основным изоферментом ретикулоэндотелиальной системы и эритроцитов. Изофермент ЛДГ-3 состоит из двух Н и двух мышечных субъединиц (2Н2М) и является основным изоферментом легких. Изофермент ЛДГ-4 имеет одну Н и три М субъединицы (1Н3М) и является основным изоферментом, присутствующим в почках и печени. Изофермент ЛДГ-5 состоит из четырех М субъединиц (4М) и в значительной степени экспрессируется, главным образом, в скелетных мышцах, а также в печени [17, 18].

Имеются ли у амфибий какие-либо существенные отличия в тканевом распределении изоформ ЛДГ? Известно, что ЛДГ является достаточно консервативным в эволюционном отношении ферментом. Аминокислотный состав мономеров ЛДГ у биологических объектов, находящихся на различных таксономических уровнях, не претерпевает существенных изменений [19]. Точно так же, вероятнее всего, консервативны четвертичная структура ЛДГ и распределение изоформ этого фермента в

тканях. Тем не менее для различных видов животных могут иметь место незначительные отличия в паттернах тканевого распределения молекулярных форм данного фермента [20]. Так, в тканях различных видов лягушек рода *Rana* были обнаружены незначительные сдвиги в спектре изоформ ЛДГ [21, 22], которые зависели от условий их обитания.

Известно, что изоформы ЛДГ отличаются не только строением, но и своими каталитическими свойствами. Так, ЛДГ1 преимущественно катализирует обратную реакцию – превращение лактата в пируват, а ЛДГ5 прямую реакцию – превращение пирувата в лактат.

Следует отметить, что такое представительство различных форм ЛДГ в тканях не является абсолютным. В различных органах могут присутствовать одновременно несколько изоформ ЛДГ, однако содержание одной из изоформ может доминировать. Возможно, что у лягушек, обитающих в условиях более низкой напряженности кислорода, происходят изменения в уровне экспрессии различных субъединиц, что оказывает влияние на спектр имеющихся в данной ткани ортологов фермента и суммарную каталитическую активность.

Сравнительный анализ ЛДГ мышц и печени лягушек показал, что в скелетных мышцах активность фермента значительно выше. Это свидетельствует о том, что скелетные мышцы, являясь эволюционно более древним органом, представляющим в совокупности с кожей так называемую “оболочку” организма первыми подвергающимися воздействию различных неблагоприятных условий среды, и должны иметь механизмы устойчивости к такому фактору, как гипоксия. Следует обратить внимание, что исследование активности ЛДГ в печени демонстрирует более ярко выраженную разницу в активности фермента у горных и низинных популяций лягушек по сравнению с мышцами. Отсюда следует, что печень озерной лягушки, являясь органом с высоким уровнем аэробного метаболизма, более чувствительна к изменениям уровня кислорода в крови.

В печени преобладает ЛДГ 4 (1H3M), которая так же, как и мышечная ЛДГ5, преимущественно катализирует прямую реакцию – превращение пирувата в лактат. Высокая активность ЛДГ в печени горных лягушек может быть обусловлена высоким уровнем экспрессии генов, ответственных за биосинтез субъединиц М. Безусловно, возникает необходимость в проведении дополнительных исследований, посвященных изучению изоферментного спектра и уровня экспрессии различных субъединиц ЛДГ в органах лягушек, отличающихся своей географической локацией в высотном градиенте. Дополнительную информацию о механизмах изменения активности ЛДГ и биологической роли таких изменений позволило бы дать исследование

кинетических свойств ЛДГ при катализе обратной реакции (превращения лактата в пируват).

Одним из наиболее распространенных механизмов изменения активности ферментов является посттрансляционная модификация. Ранее исследования способов модуляции активности гликолитических ферментов в условиях аноксии выявили три таких механизма: 1) ковалентная модификация регуляторных ферментов обратимым фосфорилированием, 2) ассоциация-диссоциация ферментов с субклеточными частицами и 3) регуляция фосфофруктокиназы фруктозо-2,6-дифосфатом для контроля анаболического использования запасов углеводов [18].

Гликолитические ферменты образуют надмолекулярный комплекс, объединяющей якорной субъединицей которого служит F-актин. Такая интеграция гликолитических ферментов позволяет не только быстро туннелировать субстрат, но и осуществлять регуляцию гликолитического потока [23]. Таким образом, модуляции активности ЛДГ могут быть обусловлены изменениями силы взаимодействия фермента с F-актином или другими структурными компонентами клетки.

Показано, что ЛДГ из печени млекопитающих может обратимо связываться с митохондриями *in vitro*, изменяя при этом свою каталитическую активность. Такое связывание, возможно, играет важную регуляторную роль в клетке [24].

Учитывая то, что структура ЛДГ, как и многих компонентов гликолитического метаболизма, достаточно консервативна в эволюционном отношении, механизмы регуляции данного фермента у пойкилотермных животных и гомеотермных животных могут быть схожими.

Показано, что функционирование ЛДГ может быть модифицировано взаимодействиями между различными типами субъединиц [25] или пептидами, которые влияют на взаимодействия между разными типами субъединиц и определяют, таким образом, ее кинетические свойства [26].

Обнаружено, что у рыб при акклимации к низким температурам ЛДГ может переходить из одного конформера (высокотемпературного) к другому (низкотемпературному) [27]. Возможность формирования таких конформеров, скорее всего, обусловлена участием шаперонов.

У пойкилотермов было обнаружено большое разнообразие механизмов химической модификации ЛДГ: фосфорилирование, аденилирование, ацетилирование, убиквитирование и т.д. [28, 29]. У черепах, в условиях аноксии, обнаружено фосфорилирование ЛДГ, приводящее к повышению активности V_{max} , снижению K_m и повышению толерантности фермента к субстратному ингибированию. Shahriri и соавт. [28], Abboud и соавт. [29] предполагают, что у черепах фосфорилирование ЛДГ является обратимым, что связано с активаци-

ей эндогенных протеинкиназ и протеинфосфатаз. Кроме того, была обнаружена другая ковалентная модификация ЛДГ — ацетилирование по остаткам лизина. Показано, что при аноксии у черепах степень ацетилирования ЛДГ не выше, чем в аэробных условиях [27]. Оказалось, что ацетилирование подавляет активность ЛДГ, а деацетилирование, напротив, увеличивает до уровня контроля [21]. Предполагается, что дифференциальное ацетилирование метаболических ферментов играет ключевую роль в адаптивной регуляции ферментов к стрессу окружающей среды [28, 29].

Существенную роль в саморегуляции активности ЛДГ играет обнаруженное у этого фермента ингибирование избытком субстрата (пирувата), которое тоже может быть подвержено внешним регуляторным воздействиям. Результаты исследования показали, что значения K_i ЛДГ в мышцах и печени у лягушек, обитающих в горах, изменяются в противоположных направлениях. Так, в мышцах K_i у горных лягушек снижается, следовательно, в условиях низкой напряженности кислорода ковалентный аддукт между пируватом и ЛДГ образуется в области более низких концентраций пирувата, что усиливает эффект субстратного ингибирования фермента. Это на фоне снижения K_m приводит к тому, что у горных лягушек уменьшается диапазон эффективных концентраций субстрата. Напротив, в печени K_i увеличивается, следовательно, снижается ингибирующий эффект пирувата, в связи с чем, диапазон эффективных концентраций становится шире.

Следует отметить, что определение K_m позволяет определить не только константу диссоциации фермент-субстратного комплекса, но и оценить физиологические концентрации субстрата в компартментах локализации фермента. Исходя из наших данных, у низинных лягушек K_m в печени равно 0.715 ± 0.048 мМ, а в мышцах 0.220 ± 0.018 мМ (т.е. концентрации пирувата в печени лягушек $\approx$ в 3 раза выше ($p < 0.05$), чем в мышцах). При этом у горных лягушек разница в значениях K_m между печенью (0.222 ± 0.015) и мышцами (0.119 ± 0.008) выражена в меньшей степени (т.е. физиологические концентрации пирувата в печени горных лягушек в 1.9 раз выше ($p < 0.05$), чем в мышцах). Весьма примечателен тот факт, что диапазон эффективных концентраций пирувата для ЛДГ печени горных лягушек значительно больше по сравнению с низинными, а для ЛДГ мышц, напротив — существенно меньше. Отсюда следует, что *in vivo* в печени горных лягушек содержание и амплитуда колебания концентрации пирувата значительно выше, чем в мышцах.

Таким образом, кинетические характеристики ЛДГ в органах с разным уровнем метаболизма и интенсивностью аэробных процессов значительно отличаются. Соответственно отличаются и механизмы модуляции активности фермента при

адаптации к обитанию в условиях низкого парциального давления кислорода. При этом все они направлены на компенсаторное повышение эффективности катализа ЛДГ, позволяющее повысить число оборотов гликолиза. В условиях более низких концентраций кислорода на высоте выше 1500 м анаэробный гликолитический путь может вносить существенный вклад в энергоснабжение клеток различных тканей.

Возникает вопрос о целесообразности такой активации анаэробного метаболизма. Известно, что реакции многих представителей земноводных, обитающих на значительных (более 2500 м) высотах, направлены преимущественно на снижение уровня метаболизма и физиологической активности животных, компенсаторные реакции со стороны системы эритрона [2–4], а не на активацию гликолиза. Можно предположить, что повышение активности ЛДГ в тканях горных лягушек может быть связано не столько с ее участием в рециркуляции аэробного метаболизма, сколько с важной ролью данного фермента в регуляции соотношения окисленных и восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов, влияющего на скорости многих каталитических реакций [8], или же с участием продукта ЛДГ реакции — лактата в модуляции активности АТФ-зависимого K^+ канала, роль которого в адаптации животных к гипоксии уже доказана [9, 10].

При этом следует отметить, что высокая активность ЛДГ может способствовать избыточному накоплению лактата и развитию лактат-ацидоза. Образовавшийся в анаэробном гликолизе лактат — это своеобразный “метаболический тупик”, который в клетке может превратиться только в пируват. Обратимая реакция (превращения лактата в пируват) катализируется ЛДГ-1, содержание которой в мышцах достаточно мало. Другой путь метаболизации лактата — это превращение его в глюкозу (глюконеогенез). Между мышцами и печенью происходит обмен лактата и глюкозы, который известен как цикл Кори или глюкозо-лактатный цикл. Помимо механизма метаболического клиренса, лактат также может экскретироваться почками при преодолении так называемого почечного порога (~ 5 ммоль/л) [30] или окисляться в сердечной мышце. Таким образом, можно предположить, что у лягушек, обитающих в условиях более низких уровней кислорода, активны механизмы, способствующие быстрому удалению лактата и предотвращению, тем самым, развития лактат-ацидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе новые данные указывают на значительные различия в активности и кинетических параметрах ЛДГ у озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*), занимающих разные эколого-географические ландшафты: низинные (высота над уровнем моря 10 м) и горные (1400–1500 м).

Обнаружено, что активность ЛДГ существенно выше у лягушек горных локаций, где парциальное давление кислорода составляет в среднем 122 мм рт.ст. Сравнительные исследования активности ЛДГ в различных тканях показали, что ЛДГ печени более чувствительна к изменениям напряженности кислорода по сравнению с мышцами. Анализ кинетических параметров ЛДГ печени и мышц позволил выявить, что высокая эффективность катализа ЛДГ в данных тканях обеспечивается за счет существенного повышения $V_{\max}$ на фоне снижения K_m . Вектор изменений других кинетических параметров ЛДГ (K_i , S_{opt} , Δ) в печени животных горных локаций ландшафтов абсолютно противоположен таковому в скелетных мышцах. Высокая активность и модификации каталитических свойств ЛДГ в тканях озерных лягушек, обитающих в среднегорье, могут играть важную роль в адаптации этих животных к условиям дефицита кислорода.

Таким образом, у горных популяций озерной лягушки компенсаторно-приспособительные реакции к относительно низкому парциальному давлению кислорода на высоте 1400–1500 м связаны не только с изменениями в системе эритрона, но и с модуляцией каталитических свойств фермента, играющего важнейшую роль в рециркуляции гликолитического потока.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлялось в рамках программы исследований, запланированных кафедрой зоологии и физиологии Дагестанского государственного университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.М.Д., З.Г.Р.), сбор данных (З.Г.Р.), обработка данных (А.М.Д., З.Г.Р.), написание и редактирование манускрипта (А.М.Д.).

СООТВЕТСТВИЕ НОРМАМ ЭТИКИ

При выполнении настоящего исследования были соблюдены все нормы и правила проведения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазаньева ЛФ, Туниев БС (2011) Зоогеографический анализ герпетофауны Дагестана. Современный герпетолог 11 (1/2): 55–76. [Mazanaeva LF, Tuniev BS (2011) Zoogeographic analysis of the herpetofauna of Dagestan. Modern herpetol 11 (1/2): 55–76. (In Russ)].
2. Niu Y, Zhang X, Xu X, Li I, Zhang H, Wu, Storey BK, Chen Q (2022) Physiological and Biochemical Adaptations to High Altitude in Tibetan Frogs *Nanorana parkeri*. Front Physiol 13: 942037. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.942037>
3. Yang W, Qi Y, Bi K, Fu J (2012) Toward understanding the genetic basis of adaptation to high-elevation life in poikilothermic species: A comparative transcriptomic analysis of two ranid frogs, *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. BMC Genomics 13: 588. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-588>
4. Ma M, Pu P, Niu Z, Zhang T, Wu J, Tang X, Chen Q (2023) A novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of black-spotted frog (*Pelophylax nigromaculatus*). Front Ecol Evol 11. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1103406>
5. Kierans S, Taylor C (2020) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. J Physiol 599: 23–37. <https://doi.org/10.1113/jp280572>
6. Zakhartsev M, Johansen T, Pörtner HO, Blust R (2004) Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. J Exp Biol 207 (1): 95–112. <https://doi.org/10.1242/jeb.00708>
7. Qiu L, Gulotta M, Callender R (2007) Lactate dehydrogenase undergoes a substantial structural change to bind its substrate. Biophys J 93: 1677–1686. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109397>
8. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. Nature 458 (7241): 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
9. Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W (2013) Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. Tumor Biol 34: 1523–1530. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0679-1>
10. Crawford R, Budas G, Jovanovic S, Ranki H, Wilson T, Davies A, Jovanovic A (2002) M-LDH serves as a sarcolemmal KATP channel subunit essential for cell protection against ischemia. EMBO J 15: 3936–3948. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf388>
11. Lowry D, Rosembrough H, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin Phenol Reagent. J Biol Chem 193 (1): 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
12. Халилов РА, Джафарова АМ, Джабраилова РН, Хизриева СИ (2016) Кинетические характеристики лактатдегидрогеназы мозга крыс при гипотермии. Нейрохимия 33 (2): 169–179. [Khalilov RA, Jafarova AM,

- Dzhabrailova RN, Khizrieva SI* (2016) Kinetic characteristics of rat brain lactate dehydrogenase during hypothermia. *Neurochemistry* 33 (2): 169–179. (In Russ)].
13. *Webster K* (2003) Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Biol* 206 (17): 2911–2922.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00516>
 14. *Spinicci K, Jacquet P, Powathil G, Stéphanou A* (2022) Modeling the role of HIF in the regulation of metabolic key genes LDH and PDH: Emergence of Warburg phenotype. *Comp Sys Onco* 2: e1040.
<https://doi.org/10.1002/cso2.1040>
 15. *Bagnall J, Leedale J, Taylor S, Spiller D, White M, Sharkey K, Séé V* (2014) Tight Control of Hypoxia-inducible Factor- α Transient Dynamics Is Essential for Cell Survival in Hypoxia. *J Biol Chem* 289 (9): 5549–5564.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m113.500405>
 16. *Yang W, Qi Y, Lu B* (2017) Gene expression variations in high-altitude adaptation: a case study of the Asiatic toad (*Bufo gargarizans*). *BMC Genet* 18 (62).
<https://doi.org/10.1186/s12863-017-0529-z>
 17. *Read J, Winter V, Eszes C, Sessions R, Brady R* (2001) Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins* 43 (2): 175–185.
[https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<175::aid-prot1029>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<175::aid-prot1029>3.0.co;2-#)
 18. *Brooks S, Storey K* (1989) Regulation of glycolytic enzymes during anoxia in the turtle *Pseudemys scripta*. *Am J Physiol* 257(2):278–283.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.2.R278>
 19. *Peng H, Deng H, Dyer R, Callender R* (2014) Energy Landscape of the Michaelis Complex of Lactate Dehydrogenase: Relationship Catalytic Mech *Biochem* 53 (11): 1849–1857.
<https://doi.org/10.1021/bi500215a>
 20. *Унжаков А, Илюха В, Мацук Н, Белкин В* (2007) Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптациях млекопитающих Карелии. *Труды КарНЦ РАН* 11: 118–126. [*Unzhakov A, Ilyukha V, Matsuk N, Belkin V* (2007) The role of lactate dehydrogenase isoenzymes in adaptations of mammals in Karelia. *Proc of KarRC RAS* 11: 118–126. (In Russ)].
 21. *Moyer F, Speaker C, Wright D* (1968) Characteristics of lactate dehydrogenase isozymes in amphibians. *N Y Acad Sci* 151 (1): 650–669.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb11925.x>
 22. *Enig M, Ramsay J, Eby D* (1976) Effect of temperature on pyruvate metabolism in the frog: the role of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Comp Biochem Physiol. B. Comp Biochem* 53 (2): 145–148.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90025-0)
 23. *Puchulu-Campanella E, Chu H, Anstee D, Galan J, Tao W, Low P* (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J Biol Chem* 288 (2): 848–858.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428573>
 24. *Place S, Hofmann G* (2005) Comparison of Hsc70 orthologs from polar and temperate notothenioid fishes: differences in prevention of aggregation and refolding of denatured proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 1195–1202.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00660.2004>
 25. *Yamamoto S, Storey KB* (1988) Dissociation-association of lactate dehydrogenase isozymes: influences on the formation of tetramers versus dimers of M4-LDH and H4-LDH. *Internat J Biochem* 20 (11): 1261–1265.
[https://doi.org/10.1016/0020-711x\(88\)90229-7](https://doi.org/10.1016/0020-711x(88)90229-7)
 26. *Döbeli H, Schoenenberger G* (1983) Regulation of lactate dehydrogenase activity: reversible and isoenzyme-specific inhibition of the tetramerization process by peptides. *Cell Mol Life Sci* 39: 281–282.
<https://doi.org/10.1007/BF01955304>
 27. *Pörtner H* (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol. A Mol Integrat Physiol* 132 (4): 739–761.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00045-4)
 28. *Shahriari A, Dawson NJ, Bell RA, Storey KB* (2013) Stable suppression of lactate dehydrogenase activity during anoxia in the foot muscle of littorina littorea and the potential role of acetylation as a novel postranslational regulatory mechanism. *Enzyme Res* 461374.
<https://doi.org/10.1155/2013/461374>
 29. *Abboud J, Storey KB* (2013) Novel control of lactate dehydrogenase from the freeze tolerant wood frog: role of posttranslational modifications. *Peer J* 1 (12).
<https://doi.org/10.7717/peerj.12>
 30. *Lehninger A, Nelson D, Cox M* (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman: 1119.

THE CATALYTIC PROPERTIES OF LACTATE DEHYDROGENASE IN SKELETAL MUSCLES AND LIVER OF THE MARSH FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) DEPEND ON ITS ECOLOGICAL AND GEOGRAPHICAL LOCATION

Z. G. Rabadanova^{a,*} and A. M. Dzharfarova^a

^aDagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

*e-mail: r.zukhra@yandex.ru

The marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) has a widespread distribution range, which is due to a variety of adaptations that contribute to the development of tolerance to a wide range of physicochemical environmental factors. Of particular interest are the adaptations of these animals to different levels of oxygen in mid- and high-altitude conditions. In this work, a comparative analysis of the kinetic parameters of lactate dehydrogenase (LDH) in the liver of marsh frogs living in the mountainous and lowland regions of Dagestan was carried out. Animals caught

in their habitats were decapitated, the liver and calf muscles were isolated, and they were placed in liquid nitrogen. In the laboratory, the selected tissues were homogenized and mitochondria-free cytosol was obtained by differential centrifugation, in which LDH activity was determined. It was found that LDH activity is significantly higher in the tissues of frogs from mountainous regions: by 42.4% in the muscles and 2.38 times in the liver ($p < 0.05$). The high efficiency of catalysis is ensured due to significant changes in the catalytic parameters of the enzyme: an increase in V_{max} (50.9% in muscles and 70% in the liver ($p < 0.05$)) and a decrease in K_m (45.9% in muscles and 69% in liver, ($p < 0.05$)). A more pronounced difference, compared to muscles, between LDH activity in the liver of foothill and lowland populations of frogs suggests that the sensitivity of liver LDH to changes in oxygen tension is higher. The vector of a number of other kinetic parameters of LDH (K_i , S_{opt} , Δ) in the liver of animals from mountainous landscapes is absolutely opposite to that of skeletal muscles. High activity and modifications of the catalytic properties of LDH in the tissues of marsh frogs living in mid-mountain areas may play an important role in the adaptation of these animals to conditions of oxygen deficiency.

Keywords: lake frog, lowland and mountain populations, liver, muscles, lactate dehydrogenase, poikilothermia, kinetic characteristics

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0044452923980012, EDN: CXILHG

Журнал эволюционной биохимии и физиологии издается Российской академией наук. Журнал публикует результаты исследований в области сравнительной и эволюционной физиологии и биохимии, а также смежных наук на русском языке. Материалы могут быть представлены в виде экспериментальных, методических или обзорных статей в рамках тематики журнала. Рецензентами выступают ведущие исследователи в соответствующих областях науки.

Все статьи переводятся на английский язык и одновременно публикуются в Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology (ISSNp: 0022-0930, ISSNе: 1608-3202) издательством Pleiades Publishing. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology индексируется в базе Web of Science, импакт фактор 0.6 (2022 г).

Правила для авторов составлены с учетом “Единых требований к рукописям для биомедицинских журналов” (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors), а также на основе руководства ARRIVE по разработке, анализу и представлению научных исследований, выполненных на животных.

Подача статей производится в электронном виде на сайте журнала (<https://rusjphysiol.org/index.php/jebph>):

При подаче статьи авторы гарантируют следующее:

- материалы не были опубликованы ранее и не рассматриваются в других изданиях.
- авторы знают и соблюдают этические нормы, предписанные международными соглашениями о публикациях научных статей;
- при выполнении работ авторы соблюдали международные правила проведения исследований с участием человека и/или животных;
- текст статьи одобрен всеми авторами перед подачей в редакцию, каждый соавтор согласен на авторство в данной статье, вклад каждого соавтора в статью указан;
- авторами представлена полная информация о потенциальных конфликтах интересов.

СТРУКТУРА РУКОПИСИ

Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) заглавие; 2) инициалы и фамилии авторов; 3) полные названия учреждений, город, страна; 4) электронная почта автора для переписки; 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) текст статьи, включающий таблицы, рисунки и подписи к рисункам в нужных местах; 8) источники финансирования; 9) соблюдение этических стандартов; 10) конфликт интересов; 11) вклад авторов; 12) список цитированной литературы, 13) информация об авторах, 14) раздел для переводчика.

При написании рукописи редакция рекомендует использовать файл-шаблон статьи, который можно скачать с сайта журнала из раздела для авторов.

ОСНОВНЫЕ РАЗДЕЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАТЬИ

Резюме (рекомендуемый объем 200–250 слов). Резюме должно отражать основное содержание статьи и следовать логике описания результатов в статье. По желанию авторов резюме может быть разбито на те же разделы, что и статья (введение, методы, результаты, обсуждение). Обязательно должны быть приведены латинские названия видов исследованных животных (за исключением лабораторных животных). Если изучался один вид животных, то его латинское или русское название указывается в заголовке статьи.

Ключевые слова (обычно не более 5–7 слов или словосочетаний в единственном числе).

Введение содержит постановку и актуальность проблемы, краткое изложение истории проблемы с обязательным обзором работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились. Следует избегать ссылок на общеизвестные закономерности (учебники) и множественных ссылок на один тезис. Завершается введение четкой формулировкой цели и задач исследования, из которых читателю будет понятна научная новизна исследований.

Методы исследования должны быть описаны таким образом, чтобы можно было воспроизвести эксперименты. В этом разделе должна быть информация об испытуемых или использованных в работе животных, материалах, реактивах и приборах с указанием фирм и стран-производителей.

Необходимо также описать методы статистической обработки результатов. При использовании множественных сравнений предпочтение следует отдавать дисперсионному анализу перед попарным сравнением с помощью критерия Стьюдента.

При публикации результатов исследований с участием людей следует указать “Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие”. Желательно привести номер и дату протокола (био)этического комитета организации, в котором было одобрено проведение данного исследования.

Работы, в которых не гарантируется соблюдение биоэтических принципов, не принимаются к рассмотрению. В некоторых случаях редакция может запросить авторов или организацию, в которой выполнялось исследование, предоставить копию протокола этического комитета.

Результаты исследования должны давать полное представление о полученных фактических данных и содержать материалы, характеризующие их достоверность. Этот раздел должен быть иллюстрирован рисунками и/или таблицами. Не следует дублировать информацию, содержащуюся в тексте, таблицах и рисунках. Следует отдавать предпочтение графическому представлению данных перед табличным. Результаты должны быть статистически обработаны, содержать информацию о числе наблюдений, средних значениях показателей и их вариативности, использованных статистических критериях.

В тексте статьи и таблицах приводите только необходимое число значащих цифр для полученных результатов (обычно это 2 или 3 цифры в зависимости от величины погрешности; число разрядов

должно совпадать у среднего и погрешности). Избегайте чисел с большим количеством разрядов, для этого переводите миллисекунды в секунды, микрограммы в миллиграммы и т.п. В числах десятичные знаки надо отделять точкой, а не запятой.

Уровень вероятности указывайте, исходя из следующих правил:

- При $0.01 \leq p \leq 1.00$ — указывайте p с точностью до сотых (допустимо писать $p > 0.05$; $p < 0.05$);
- При $0.001 \leq p < 0.01$ — пишите $p < 0.01$;
- При любых $p < 0.001$ — пишите $p < 0.001$.

Для облегчения рецензирования рисунки и таблицы со всеми подписями следует размещать непосредственно в тексте статьи в необходимых местах.

Раздел **Обсуждение результатов** должен содержать интерпретацию результатов, объяснение физиологической значимости выявленных механизмов. При обсуждении собственных результатов основной акцент необходимо делать на релевантные работы, вышедшие за последние 5–10 лет. Основные результаты работы могут быть проиллюстрированы обобщающей схемой, которая будет дополнительно помещена на сайте журнала.

В разделе **Финансирование работы (FUNDING)** указываются гранты или иные финансовые источники, при поддержке которых было выполнено исследование. Примеры: “Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № XX-XX-XXXX-a)”. “Работа выполнялась в рамках программы исследований XXXX, запланированных в Университете XXXX”. “Автор Х.Х.Х. поддержан грантом XXXX Министерства XXXX”. В разделе не допускается использование сокращенных названий институтов и спонсирующих организаций.

Если финансовая поддержка отсутствовала в оригинале раздел **ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ FUNDING** следует оформить со следующей формулировкой: Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (учреждения, организации). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было. (This work was supported by ongoing institutional funding. No additional grants to carry out or direct this particular research were obtained.)

Соблюдение этических стандартов (ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE) **обязательный** раздел для журналов и статей биологической тематики (независимо от того, были ли вовлечены животные и люди в эксперименты в какой-либо конкретной статье) и в отдельных статьях других журналов, где проводились исследования животных или человек, а в том числе, забор крови, тканей, любых видов анализов, опросы людей, любые эксперименты с животными или людьми.

<i>Неправильно:</i>	<i>Правильно:</i>
5.437 ± 0.502	5.4 ± 0.5
3523.1 ± 365.7 мс	3.5 ± 0.4 с
0.12345 ± 0.01274	0.123 ± 0.013

Значение p , рассчитанное статистической программой	Как привести значение p в статье
$p = 0.13725$	$p = 0.14$
$p = 0.0312$	$p = 0.03$ или $p < 0.05$
$p = 0.0014782$	$p < 0.01$
$p = 0.0000478$	$p < 0.001$

Если исследования человека или животных проводились, должна быть конкретная формулировка с номером и датой разрешения, а также с названием комитета по биоэтике, который выдал разрешение. Необходимо также утверждение о получении письменного информированного согласия от каждого испытуемого, если проводилась работа со взрослыми людьми, или от каждого родителя (или опекуна) испытуемого, если испытуемые были несовершеннолетними.

Пример оформления раздела (если проводились исследования с людьми):

“Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по этике Нижегородского государственного университета (Нижегород), протокол № 46 от 11 февраля 2021 года.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.”

(All studies were conducted in accordance with the principles of biomedical ethics as outlined in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. They were also approved by the Ethics Committee of Nizhny Novgorod State University (Nizhny Novgorod), protocol No. 46 dated February 11, 2021.

Each participant in the study provided a voluntary written informed consent after receiving an explanation of the potential risks and benefits, as well as the nature of the upcoming study.)

Пример оформления раздела (если проводились исследования с животными):

“Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены Административным комитетом по экспериментам с животным и Наньтунского университета, провинция Цзянсу, Китай (идентификатор одобрения: SYXK SU) 20200711 001 от 30 января 2021 года. (Animal-related experiments were conducted in accordance with the NIH Guidelines for the care and use of laboratory animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Animal protocols were approved by the Administration Committee of Experimental Animals of Nantong University, Jiangsu Province, China (Approval ID: SYXK(SU) 20200711–001 of January 30, 2021)).”

Если исследования человека и животных не проводились, раздел должен быть оформлен так: “В данной работе отсутствуют исследования человека и ли животных. (This work does not contain any studies involving human and animal subjects)”.

Примечание:

– Просим не включать соответствующую информацию в основной текст статьи, а переносить именно в раздел ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

– Просим принимать во внимание, что к миру животных относятся не только млекопитающие, а исследования могут проводиться и за пределами лаборатории;

В разделе **Конфликт интересов** авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Конфликт интересов – это ситуация, когда личная заинтересованность (прямая или косвенная) влияет или может повлиять на надлежащее, объективное и беспристрастное изложение результатов работы автором. Автору следует раскрыть любые отношения или сферы интересов, которые могли бы прямо или косвенно повлиять на представленную работу или сделать ее предвзятой. В том числе финансовые отношения с организациями, спонсировавшими исследование или компенсации, полученные за консультационную работу. Подлежат раскрытию следующие интересы за последние 3 года до начала работы (проведение исследования и подготовка работы):

– **финансирование** (исследовательские гранты от финансирующих организаций или поддержка исследования);

– **занятость** (во время участия в исследовательском проекте, работа в любом учреждении, которое может получить прибыль или понести убытки в результате публикации данной рукописи);

– **финансовые интересы** (акции или доли в компаниях, включая активы супруга и/или детей);

– **нефинансовые интересы** (профессиональные интересы, управленческие и наставнические)

Подробнее на сайте Pleiades Publishing: <https://www.pleiades.online/ru/authors/guidelines/ethics-statements/>

Примеры заявлений, которые следует использовать при наличии интересов, требующих раскрытия:

– “Автор А.А.А. получил поддержку своего исследования от Компании А. Автор Б.Б.Б. получил гонорар за выступление от Компании Z и владеет акциями Компании X. Автор В.В.В. является консультантом компании Y”.

– “Автор С.С.С. является членом комитета Z без вознаграждения”.

– “Автор А.А.А. входит в совет директоров Y и не получает вознаграждения как член совета директоров”.

– “Автор Б.Б.Б. работал в консультативных советах компаний M, N и O”.

Пример оформления, которые следует использовать, когда автору нечего декларировать:

“Автор/ы данной работы заявляет/ют, что у него/них нет конфликта интересов. (The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.)”

Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Напротив, выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи. В случае отсутствия конфликта интересов авторы могут использовать следующий текст “Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи”.

В **обязательном** разделе **Вклад авторов** указываются конкретные этапы работ, осуществленные каждым автором (например, “Идея работы и планирование эксперимента (Авторы А.А.А. и Б.Б.Б.), сбор данных (Б.Б.Б., В.В.В., Г.Г.Г.), обработка данных (Б.Б.Б., В.В.В.), написание и редактирование манускрипта (А.А.А., Б.Б.Б., В.В.В., Г.Г.Г.)”.

В статье может быть выделен раздел **Благодарности**, где приводятся сведения о лицах, способствовавших проведению работы.

Список литературы. Список литературы составляется только по цитированным в тексте работам. Правила цитирования и оформления списка литературы даны в специальном разделе.

Информация об авторах. Полностью указываются фамилии, имена и отчества всех соавторов, ученые степени и звания, места работы, электронные адреса, ORCID.

В разделе для переводчика на английском языке должны быть представлены: 1) заглавие; 2) инициалы и фамилии авторов; 3) полные названия учреждений, город, страна; 4) служебный адрес и электронная почта автора для переписки; 5) резюме; 6) ключевые слова; 7) список используемых специальных терминов, химической и биохимической номенклатуры, реактивов, используемых аббревиатур по-русски и по-английски; 8) подписи к рисункам и таблицы на английском языке.

Требования к обзорной статье

В обзорной статье не выделяют в самостоятельные разделы Методы исследования, Результаты исследования, Обсуждение результатов. Все остальные разделы те же, что и для экспериментальной статьи. Текст обзора подразделяется на основе смысловых блоков. Во введении авторы должны сформулировать, в чем новизна представленного обзора и какие задачи они ставят в рамках данного обзора. Основной акцент в статье должен быть сделан на критическом рассмотрении экспериментальных работ, опубликованных в последнее

десятилетие. Избыточные исторические экскурсы, пересказ ранее опубликованных обзоров не приветствуются. Следует приводить только необходимые ссылки. В обзорной статье должно присутствовать заключение, содержащее авторскую оценку ближайших перспективах изучения данной проблемы.

Обзоры авторов, не имеющих экспериментальных работ в данной области, редакцией не рассматриваются.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ИЛЛЮСТРАЦИЙ И ТАБЛИЦ

При подаче статьи для облегчения рецензирования редакция рекомендует авторам размещать все таблицы и рисунки с подписями в тексте статьи в нужных местах. В статье должна использоваться последовательная нумерация рисунков (таблиц) по ходу упоминания, на каждый рисунок или таблицу обязательно должна быть ссылка в тексте.

Технические требования к подготовке электронных файлов иллюстраций подробно изложены на сайте издательства Pleiades Publishing.

Рисунки. Все обозначения на рисунках должны приводиться на английском языке в едином стиле. Независимо от типа графики, рисунок должен обладать высоким реальным разрешением. Линии на рисунках/графиках должны быть не менее 0.3 пунктов (point) в толщину. Следует избегать слишком мелких обозначений (букв, цифр, значков). Подписи к рисункам приводятся на русском языке. Там, где необходимо дается перевод обозначений, используемых на самом рисунке

Все графики должны содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единицы измерения), а также кривых и других деталей на английском языке. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Times New Roman с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Stimulation current, μA). Части рисунков обозначаются латинскими строчными буквами курсивом (*a*, *b*, *c*).

Составные иллюстрации следует вставлять в текст как единый рисунок (из файлов jpeg или tiff), а не переносить составные части из приложений (Excel, Origin и др.). Подпись к рисунку должна содержать номер рисунка, название рисунка, подписи ко всем составным частям и расшифровку буквенных, цифровых и графических обозначений на нем. Необходимо загрузить на сайт рисунки с разрешением от 300 dpi отдельными файлами (Fig1.tiff; Fig2.jpeg).

Цветные иллюстрации рекомендуется использовать только там, где это необходимо для полноценной передачи информации, например, для гисто-

логических микрофотографий. Необходимые цветные иллюстрации печатаются бесплатно.

Таблицы. Заголовок таблицы должен иметь номер и название, все строки и столбцы должны быть озаглавлены. Сноски должны располагаться в строке примечания внизу таблицы. Таблицы готовятся с использованием средств редактирования таблиц MS Word, вставлять таблицы как рисунок нельзя. В тексте статьи таблицы приводятся на русском языке, в конце статьи в разделе для переводчика дается англоязычный вариант таблиц.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ССЫЛОК И СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

Редакция *настоятельно рекомендует* ссылаться на англоязычные работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в основных международных базах данных (Pubmed, Web of Science, Scopus). При цитировании переводных источников рекомендуется ссылаться на англоязычную версию. При цитировании публикаций в российских журналах, имеющих переводную версию, следует ссылаться исключительно на англоязычную версию.

Редакция *не рекомендует* ссылаться на локальные журналы и вестники, диссертации, авторефераты диссертаций, тезисы докладов, учебники, статьи в печати, устные сообщения. Редакция также *не приветствует* избыточное самоцитирование.

Для правильного оформления ссылок редакция советует использовать программы Mendeley, End-Note или их аналоги. Ссылки на литературу оформляются согласно стилю Springer – Basic (numeric, brackets, no “et al.”). Стилизованный файл для Mendeley можно скачать с сайта по ссылке (<https://csl.mendeley.com/styleInfo/?styleId=http%3A%2F%2Fwww.zotero.org%2Fstyles%2Fspringer-basic-brackets-no-et-al>).

В тексте ссылки даются в квадратных скобках. Например: [1], [2–4], [1, 3–5]. Приводите только самые необходимые ссылки, множественных ссылок по типу [1–7] следует избегать.

В списке литературы ссылки приводятся в порядке цитирования.

1. Ying C, Ying L, Yanxia L, Le W, Lili C (2020) High mobility group box 1 antibody represses autophagy and alleviates hippocampus damage in pilocarpine-induced mouse epilepsy model. *Acta Histochem* 122: 151485. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151485>

2. Evans CE, Thomas RS, Freeman TJ, Hvoslef-Eide M, Good MA, Kidd EJ (2019) Selective reduction of APP-BACE1 activity improves memory via NMDA-NR2B receptor-mediated mechanisms in aged PDAPP mice. *Neurobiol Aging* 75: 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.11.011>

3. Löscher W (2020) The holy grail of epilepsy prevention: Preclinical approaches to antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* 167: 107605. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.011>

4. Peng L, Zhu M, Yang Y, Weng Y, Zou W, Zhu X, Guo Q, Zhong T (2019) Neonatal Lipopolysaccharide Challenge Induces Long-lasting Spatial Cognitive Impairment and Dysregulation of Hippocampal Histone Acetylation in Mice. *Neuroscience* 398: 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.001>

При оформлении ссылок на русскоязычные источники, не имеющие полного перевода, информация должна быть дублирована на английский язык.

Пример оформления ссылок на российские издания:

1. Рубина КА, Ткачук ВА (2017) Молекулярные и клеточные механизмы физиологического и опухолевого роста кровеносных сосудов. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 103: 121–137. [Rubina KA, Tkachuk VA (2017) Molecular and cellular mechanisms of angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Russ J Physiol* 103: 121–137. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0869813918090010>

2. Крылов ВВ (ред) (2019) Хирургия сложных аневризм головного мозга. М. АБВ-пресс. [Krylov VV (ed) (2019) *Khirurgiya slozhnykh anevrizm golovnogo mozga* [Surgery of complex brain aneurysms]. М. ABV-press. (In Russ)].

ЛИЦЕНЗИОННЫЙ ДОГОВОР

К рассмотрению принимаются только статьи, к которым приложен лицензионный договор. Шаблон договора можно скачать на сайте журнала в разделе для авторов. Договор, подписанный и заполненный всеми авторами, необходимо загрузить как pdf-файлы при подаче статьи. Для публикации перевода статьи в *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* редакция попросит Вас заполнить дополнительный лицензионный договор.

ПОДАЧА МАТЕРИАЛОВ НА САЙТЕ

Подача рукописи осуществляется только в электронном виде на сайте журнала. Справочный файл-помощник работы на сайте можно скачать в разделе для авторов. Перед подачей статьи Вам надо подготовить следующие файлы:

1. Текст рукописи вместе с рисунками и таблицами (Manuscript.doc или docx).

2. Подписанные всеми авторами лицензионные договоры (в формате *.pdf)

3. Файлы рисунков (Fig1.tiff; Fig2.jpeg) с разрешением не менее 300 dpi.

4. Сопроводительное письмо редактору, в котором можно порекомендовать (или отклонить) 2–4 возможных рецензентов для своей статьи, избе-

гая конфликта интересов. Потенциальный рецензент не должен работать в том же учреждении, что и авторы статьи, у авторов и рецензента не должно быть совместных работ за последние 3 года. У рецензента должны быть опубликованные статьи в ведущих международных журналах в данной области. Следует указать фамилию, имя, отчество возможного рецензента, его место работы и электронный адрес, ссылку на его профиль в Scopus или другой базе. Статья не будет послана отклоненным рецензентам, однако выбор конкретных рецензентов для статьи остается за редактором.

Автору, осуществляющему подачу рукописи, необходимо будет заполнить на сайте основные сведения о статье и всех соавторах, внести их действующие адреса электронной почты.

ПОРЯДОК РАССМОТРЕНИЯ СТАТЬИ

После подачи рукописи через сайт автор получит автоматическое письмо на указанный при регистрации электронный адрес с уведомлением о получении редакцией статьи. Сначала сотрудник редакции проверит статью на предмет соблюдения правил оформления рукописей и выполнения этических требований. Рукопись может быть проверена программой Антиплагиат. Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам на доработку без рецензирования.

На следующем этапе рукописи будут оценены редактором на предмет соответствия тематике журнала и качества представленных материалов. При несоответствии рукописи тематике журнала или ее недостаточном качестве редактор может отклонить рукопись без рецензирования.

После прохождения первичного скрининга рукопись будет направлена на рецензирование как минимум двум рецензентам. При получении противоречивых комментариев от рецензентов статья по решению редактора может быть отправлена на дополнительное рецензирование. Комментарии рецензентов и решение редактора по поводу статьи будут посланы автору через сайт и по электронной почте, поэтому важно указывать электронную по-

чту, которую автор регулярно проверяет. Комментарии рецензентов будут также доступны через сайт в личном кабинете автора.

По результатам рецензирования редактор принимает одно из четырех решений:

- 1) принять статью к публикации в настоящем виде;
- 2) принять статью с учетом устранения небольших замечаний;
- 3) отправить статью на доработку и повторное рецензирование;
- 4) отклонить статью.

Для доработки статьи авторам дается до двух месяцев, для устранения небольших замечаний до двух недель. При необходимости выполнения дополнительных экспериментов авторы вправе попросить редактора увеличить срок доработки статьи.

Ответы на вопросы рецензентов (отдельным файлом) и исправленная версия статьи с выделенными в тексте изменениями подаются через сайт в разделе рецензирование/версии. Если ответы авторов не поступают в установленный срок, то статья считается снятой с рассмотрения по инициативе авторов.

Доработанная версия статьи после исправления существенных замечаний посылается тем же рецензентам. Если к доработанной авторами версии статьи у рецензентов остаются обоснованные существенные замечания, то статья на этом этапе отклоняется редактором. В случае позитивных рецензий статья принимается к публикации. О принятии (или отклонении) статьи к публикации автор сразу же информируется по электронной почте.

После принятия статьи в печать в ней не допускается изменений в составе авторского коллектива, изменений рисунков ли текста, кроме исправления грамматических ошибок и стилистических неточностей. Если необходимы существенные изменения в корректуре, то статья должна быть отозвана авторами.