

Том 60, Номер 3

ISSN 0044-4529
Май - Июнь 2024



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

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



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 3, 2024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Фрагмент лептина модулирует стимулирующие эффекты хорионического гонадотропина на тестикулярный стероидогенез в модели диета-индуцированного ожирения у крыс
А. А. Бахтюков, И. А. Лебедев, И. Ю. Морина, В. С. Кузнецова, А. О. Шпаков 223
- Содержание ртути и низкомолекулярных антиоксидантов в организме копытных млекопитающих Республики Карелия
С. Н. Калинина, В. А. Илюха, В. Т. Комов, И. А. Зайцева, И. В. Баишникова, Д. В. Панченко, Е. П. Антонова 234
- Самки мышей BALB/c предпочитают запах партнеров, от которых рождается меньше потомков
А. С. Хоцкина, Ю. В. Патрушев, Д. И. Юсупова, Л. А. Герлинская, С. О. Масленникова, Д. В. Петровский, М. П. Мошкин, Е. Л. Завьялов 244
- Влияние гипернатриемии на реабсорбцию белков в проксимальных каналах почки озёрной лягушки *Pelophylax ridibundus*
Н. П. Пруцкова, Е. В. Селивёрстова 254
- Морфология доксорубицин-индуцированных органопатий при разных режимах внутривенного введения никотинамид рибозида
Е. Ю. Подъячева, Н. Ю. Семенова, З. Е. Артюхина, В. А. Цинзерлинг, Я. Г. Торопова 264
- Стимулирующее влияние низких концентраций Eu^{3+} на спонтанные сердечные сокращения
К. В. Соболев, С. М. Коротков, И. В. Шемарова, В. П. Нестеров 282
- Центральные ответы на периферическое воспаление могут включать снижение экспрессии ключевой протеазы апоптоза каспазы-3 в стволе мозга
А. В. Баннова, Г. Т. Шишкина, Н. Н. Дыгало 291
- Особенности распределения системы парвальбумин-иммунопозитивных элементов в спинном мозге новорождённых кошек
А. А. Вещицкий, А. В. Беляев, Н. С. Меркульева 299
- Изменения кровотоков в краниальной и каудальной полых венах у кроликов при постуральных воздействиях в условиях применения пропранолола, бисопролола и метилдофы
В. И. Евлахов, Т. П. Березина, Т. В. Сергеев, М. В. Куропатенко, И. З. Поясов 308
- Митохондриальная динамика и метаболическая перестройка в ксенотрансплантате индуцированных плюрипотентных стволовых клеток продуцированных нейрональных предшественников человека
Д. Н. Воронков, А. В. Егорова, Е. Н. Федорова, А. В. Ставровская, О. С. Лебедева, А. С. Ольшанский, В. В. Подопригора, В. С. Сухоруков 320

Contents

Vol. 60, No. 3, 2024

EXPERIMENTAL ARTICLES

Leptin Fragment Modulates the Stimulatory Effects of Chorionic Gonadotropin on Testicular Steroidogenesis in a Model Of Diet-Induced Obesity in Rats <i>A. A. Bakhtyukov, I. A. Lebedev, I. Yu. Morina, V. S. Kuznetsova and A. O. Shpakov</i>	223
The Mercury and Low Molecular-Weight Antioxidants Levels in Ungulates of The Republic of Karelia <i>S. N. Kalinina, V. A. Ilyukha, V. T. Komov, I. A. Zaitseva, I. V. Baishnikova, D. V. Panchenko and E. P. Antonova</i>	234
Female BALB/c Mice Prefer the Odor of Mates Producing Fewer Progeny <i>A. S. Khotskina, Y. V. Patrushev, D. I. Yusupova, L. A. Gerlinskaya, S. O. Maslennikova, D. V. Petrovskii, M. P. Moshkin and E. L. Zavjalov</i>	244
Effect of Hypernatremia on Protein Reabsorption in Renal Proximal Tubules of the Lake Frog <i>Pelophylax ridibundus</i> <i>N. P. Prutskova and E. V. Seliverstova</i>	254
Pathology of Doxorubicin-Induced Organopathies under Different Intravenous Nicotinamide Riboside Administration Modes <i>E. Yu. Podyacheva, N. Yu. Semenova, Z. E. Artyukhina, V. A. Zinserling and Ya. G. Toropova</i>	264
Stimulating Effect of Low Concentrations of Eu^{3+} on Spontaneous Cardiac Contractions <i>K. V. Sobol, S. M. Korotkov, I. V. Shemarova and V. P. Nesterov</i>	282
Central Responses to Peripheral Inflammation May Include Decreased Expression of Key Apoptotic Protease Caspase-3 in Brainstem <i>A. V. Bannova, G. T. Shishkina and N. N. Dygalo</i>	291
A Comparative Distribution of Parvalbumin-Immunopositive Neural Elements in the Spinal Cord of Newborn and Adult Cats <i>A. A. Veshchitskii, A. V. Belyaev and N. S. Merkulyeva</i>	299
Blood Flow Changes in the Rabbit Cranial and Caudal Venae Cavae during Postural Loads after Propranolol, Bisoprolol and Methyldopa Pretreatment <i>V. I. Evlakhov, T. P. Berezina, T. V. Sergeev, M. V. Kuropatenko and I. Z. Poyassov</i>	308
Mitochondrial Dynamics and Metabolic Remodeling in Xenograft of iPSC-Derived Human Neural Precursors <i>D. N. Voronkov, A. V. Egorova, E. N. Fedorova, A. V. Stavrovskaya, O. S. Lebedeva, A. S. Olshanskiy, V. V. Podoprighora and V. S. Sukhorukov</i>	320

ФРАГМЕНТ ЛЕПТИНА МОДУЛИРУЕТ СТИМУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ СТЕРОИДОГЕНЕЗ В МОДЕЛИ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ У КРЫС

© 2024 г. А. А. Бахтюков, И. А. Лебедев, И. Ю. Морина, В. С. Кузнецова, А. О. Шпаков

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

** e-mail: bahtyukov@gmail.com*

Поступила в редакцию 22.02.2024 г.

После доработки 11.03.2024 г.

Принята к публикации 12.03.2024 г.

Лептин, секретируемый жировой тканью, опосредованно стимулирует активность гонадолиберин-продуцирующих нейронов гипоталамуса, регулируя функциональную активность гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной (ГГТ) оси. Как известно, ожирение сопровождается системной гиперлептинемией и нарушением транспорта лептина в ЦНС, что ограничивает использование полноразмерного лептина в качестве лекарственного препарата. Ранее показано, что интраназально вводимый фрагмент лептина MA-[D-Leu4]-OB3 (ФЛ) усиливает стероидогенный эффект хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) у крыс, находящихся на стандартной диете. Еще более актуальной задачей является оценка его влияния на тестикулярный стероидогенез в условиях ожирения, снижающего репродуктивные функции у мужчин. Целью работы было изучить способность ФЛ (200 мкг/кг, интраназально, 3 дня) модулировать эффект ХГЧ (10МЕ/крысу, подкожно, однократно) на тестикулярный стероидогенез у крыс с ожирением, вызванным комбинированной высокожировой/высокоуглеводной диетой (ВЖВУД), а также оценить влияние антагониста рецептора гонадолиберина цетрореликса (АНТ, 75мкг/кг, подкожно, 3 дня) на эффекты ФЛ. Для исследований использовали самцов крыс Вистар, которые получали ВЖВУД в течение 20 недель. У крыс с ожирением снижался уровень рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ) в семенниках и компенсаторно усиливалась экспрессия гена *Cyp11a1*, кодирующего стероидогенный фермент — цитохром P450_{ssc}. Введение ФЛ усиливало эффект ХГЧ на уровень тестостерона в крови и экспрессию гена *Star*, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR, что указывает на способность ФЛ положительно модулировать активность ГГТ оси при ожирении. Совместное введение АНТ и ФЛ, напротив, снижало стимулирующий эффект ХГЧ на уровень тестостерона и экспрессию гена *Star*, что может быть обусловлено периферическими эффектами ФЛ. Полученные нами данные указывают на способность ФЛ влиять на различные компоненты мужской гонадной оси в условиях диета-индуцированного ожирения.

Ключевые слова: фрагмент лептина, ожирение, гонадотропин, тестикулярный стероидогенез, антагонист рецептора гонадолиберина, тестостерон, интраназальное введение

DOI: 10.31857/S0044452924030016, **EDN:** YXXLKU

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Факторы, сопровождающие ожирение, такие как избыточная масса тела, гиперинсулинемия и гиперлептинемия, наряду со значительным повышением продукции провоспалительных факторов в крови и тканях негативно влияют на функции гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси (ГГТ). Гонадолиберин (GnRH)-экспрессирующие нейроны гипоталамуса регулируют синтез и секрецию лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормонов клетками передней доли гипофиза, которые, в свою очередь стимулируют процессы синтеза тестостерона

и сперматогенеза в семенниках. Информация о метаболическом состоянии организма, которая аккумулируется и перерабатывается нейромедиаторными системами гипоталамуса, в значительной степени влияет на функциональную активность GnRH-нейронов и работу ГГТ оси [1, 2].

Лептин, пептидный гормон, секретируемый белой жировой тканью, в гипоталамусе стимулирует секрецию α -меланоцитстимулирующего гормона (α -МСГ) и кисспептина (Kiss) соответственно проопиомеланокортин (POMC)- и Kiss-экспрессирующими нейронами, и подавляет экспрессию орексигенных факторов — нейропептида Y (NPY) и агути-подобного пептида (AgRP) NPY/AgRP-экспрессирующими нейронами, снижая тем самым

потребление пищи и активируя катаболические процессы. Не менее важной функцией лептина является регуляция активности гипоталамических GnRH-экспрессирующих нейронов, опосредованная стимуляцией POMC- и Kiss-нейронов и ингибированием NPY/AgRP нейронов [3, 4]. Способность лептина регулировать и модулировать секрецию GnRH обеспечивается наличием функционально активных, полноразмерных лептиновых рецепторов ObRb и других компонентов лептиновой сигнальной системы в POMC-, Kiss- и NPY/AgRP-экспрессирующих нейронах, проекции которых направлены к GnRH-нейронам. Взаимодействие лептина с рецепторами ObRb приводит к запуску внутриклеточных каскадов, результатом чего является изменение экспрессии и секреции нейропептидов, воздействующих на GnRH-нейроны [4]. Недавно было установлено, что рецептор лептина ObRb и компоненты лептиновой системы присутствуют и в других звеньях ГГТ оси: гонадотропоцитах аденогипофиза и в тестикулярных клетках Лейдига. Однако, на уровне семенников, влияние лептина имеет разнонаправленный характер, в отличие от более однозначного стимулирующего эффекта на уровне гипоталамуса [5]. Ряд других подтипов рецептора лептина участвуют в транспорте гормона через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который носит, как предполагают, рецептор-опосредованный характер [6]. Одним из событий, сопровождающих развитие ожирения и сахарного диабета 2-го типа является развитие системной лептиновой резистентности, которая возникает на фоне значительного повышения уровня лептина в крови. Следствием ее является снижение рецептор-опосредованного транспорта лептина через ГЭБ, в результате чего возникает дефицит лептина в структурах головного мозга, включая гипоталамус [6]. Предполагается, что развитие лептиновой резистентности не только вызывает нарушение баланса анорексигенных и орексигенных процессов на уровне гипоталамуса, но и может привести к функциональным изменениям активности центрального, гипоталамического, звена ГГТ оси.

В настоящее время активно исследуется способность фрагментов лептина активировать лептиновые сигнальные пути, заменяя полноразмерную молекулу этого гормона. Одним из наиболее перспективных аналогов является миристилированный N-концевой фрагмент лептина 116–122 MA-[D-Leu4]-OB3 (ФЛ), который продемонстрировал выраженный анорексигенный эффект в моделях диета-индуцированного ожирения (ДИО) у мышей. У животных с ожирением было показано снижение потребления пищи, массы тела, отмечалось частичное восстановление толерантности к глюкозе. В отличие от полноразмерной молекулы лептина, ФЛ характеризуется большей стабильностью в кровотоке

и не вызывает развития лептиновой резистентности при длительном применении [7, 8]. Наиболее впечатляющие результаты были показаны при интраназальном способе введения ФЛ. Показано, что интраназально вводимый ФЛ накапливается в аркуатном ядре гипоталамуса, проникая в него, используя для этого наиболее проницаемые участки ГЭБ, что является преимуществом перед другими способами введения, особенно в условиях лептиновой резистентности при ожирении и диабете 2-го типа [9, 10].

Ранее на самцах крыс, которые находились на стандартной диете, нами была продемонстрирована способность ФЛ модулировать эффекты хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на уровень тестостерона в крови и на экспрессию гена *Star*, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR, ключевой компонент системы тестикулярного стероидогенеза [11]. Было установлено, что влияние ФЛ на тестикулярный стероидогенез обусловлено в первую очередь его эффектами на гипоталамо-гипофизарном уровне, так как на фоне введения цетрореликса, антагониста рецептора GnRH (АНТ), его эффекты на тестикулярный стероидогенез исчезали [11].

В настоящем исследовании мы использовали аналогичную схему эксперимента для изучения влияния ФЛ на тестикулярный стероидогенез у крыс с ДИО. Ожирение вызывали длительной комбинированной высокожировой и высокоуглеводной диетой (ВЖВУД). Поскольку ожирение, с одной стороны, характеризуется гиперлептинемией и лептиновой резистентностью и, с другой стороны, может сопровождаться изменениями тестикулярного стероидогенеза, то изучение влияния ФЛ на компоненты ГГТ оси представляет значительный интерес для эндокринологии и репродуктивной медицины.

Целью работы является изучение способности ФЛ модулировать стимулирующие эффекты ХГЧ на уровень тестостерона в крови, на экспрессию генов, контролирующих тестикулярный стероидогенез и на уровень рецептора ЛГ в семенниках у крыс на фоне ВЖВУД, а также исследование мишеней ФЛ в ГГТ оси с помощью АНТ, блокирующего GnRH-опосредуемую стимуляцию секреции ЛГ аденогипофизом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов использовали 75 половозрелых самцов крыс линии Wistar, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде (или раствору сахарозы) и корму. Животные содержались в пластиковых клетках по пять особей в каждой с нормальным циклом день/ночь (12 ч/12 ч, свет включается в 9.00 утра) и комнатной температуре ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). В возрасте двух месяцев животные были разделены на две группы. Первая (65 животных) получала в течение 20 недель ВЖВУД, включающую корм с долей жира (свиное

сало) не менее 60 % и 30 %-ный раствор сахарозы вместо питьевой воды. Вторая группа (10 животных) находилась на нормальной диете, получая стандартный корм и обычную воду. По истечении 20 недель потребления ВЖВУД у крыс оценивали толерантность к глюкозе, для чего использовали интраперитонеальный глюкозотолерантный тест (ИГТТ), как описано ранее [12]. До и через 120 мин после в/б введения глюкозы (2 г/кг) оценивали уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови. До начала и в течение диеты измеряли массу тела животных. Далее отбирали 48 самцов крыс с уровнем глюкозы через 120 мин после ГТТ выше 7.0 мМ и с массой тела на 7 % выше таковой в контроле, рассматриваемых в дальнейшем, как животные с ДИО, после чего формировали 8 групп (в каждой $n = 6$).

Самцы крыс из групп “ВЖВУД+АНТ”, “ВЖВУД+АНТ+ФЛ”, “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ” в течение трех дней получали инъекции цетрореликса ацетата (“Xingtai Yuanao Technology Co.”, КНР), антагониста GnRH рецептора (АНТ), который растворяли в физиологическом растворе и вводили крысам п/к в суточной дозе 75 мкг/кг. Самцам крыс из групп “ВЖВУД+ФЛ”, “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”, “ВЖВУД+АНТ+ФЛ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ” в течение трехднев интраназально вводили фрагмент лептина миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амид (ФЛ) в суточной дозе 200 мкг/крысу. Самцы крыс из остальных групп вместо АНТ и ФЛ в течении 3 дней получали физиологический раствор (ФР). Самцы крыс из групп “ВЖВУД+ХГЧ”, “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”, “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ” на третий день эксперимента были обработаны с помощью ХГЧ (“Московский эндокринный завод”, Россия) в дозе 10 МЕ/крысу (п/к) через 90 мин после последней инъекции АНТ и/или ФЛ или ФР. Животные, находящиеся на стандартной диете, из которых сформировали группу “Контроль”, вместо препаратов получали ФР. Дозы и продолжительность введения препаратов ФЛ, АНТ и ХГЧ были подобраны в предварительных сериях экспериментов и были апробированы нами в ранее опубликованных работах [11, 12].

Уровень тестостерона в крови определяли: (1) до введения препаратов в 1-й день эксперимента, а также на третий день эксперимента – (2) через 90 мин после введения ФЛ и(или) АНТ, (3) через 180 мин после введения ФЛ и(или) АНТ и через 90 мин после введения ХГЧ, (4) через 270 мин после введения ФЛ и(или) АНТ и через 180 мин после введения ХГЧ.

Образцы ткани семенников забирали в последний день эксперимента, через 270 мин после введения ФЛ и/или АНТ или через 180 мин после введения ХГЧ. Декапитация животных осуществлялась под общей анестезией (хлоралгидрат, 400 мг/кг). Уровень тестостерона в крови определяли с помощью наборов “ИФА-Тестостерон” (“Алкор-Био”, Россия). Уровень лептина и инсулина в крови определяли с помощью наборов “ELISA Kit for Leptin” и “ELISA Kit for Insulin” (“Cloud-Clone Corp.”, США). Для анализа уровней мРНК генов тесткулярного стероидогенеза из семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента “ExtractRNA” (“Евроген”, Россия). Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия), для которой брали 1мкг тотальной РНК на реакцию. ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора “Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System” (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) в смеси, содержащей кДНК, 0.4 мкМ прямого и обратного специфичных праймеров, реагент “qPCR-HS SYBR+Low ROX” (“Евроген”, Россия). Для контроля выхода продукта реакции и отсутствия образования димеров праймеров использовали анализ кривой плавления в соответствии с функцией “ABI Melt Curve program”. В работе использовали ранее описанные и апробированные последовательности комплементарных прямого и обратного праймеров для генов крысы – гена *Star*, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR, *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450_{ssc}, а также для гена *Actb*, кодирующего белок Actin-B и используемого в качестве референсного (табл. 1) [12].

Для иммуногистохимических исследований семенники фиксировали погружением в 4 %-ный раствор параформальдегида в течение 48 ч (4 °С). Далее промывали в холодном 0.9 %-ном натрий-фосфат-

Таблица 1. Последовательности праймеров к генам крысы, использованных в исследовании

Название	Последовательность праймера	Т отжига, °С	NCBI Reference Sequence
<i>Star Forward</i>	AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC	55	NM_031558.3
<i>Star Reverse</i>	CACCTGGCACCACCTTACTT		
<i>Cyp11a1 Forward</i>	TATTCCGCTTTGCCTTTGAG	55	NM_017286.3
<i>Cyp11a1 Reverse</i>	CACGATCTCCTCCAACATCC		
<i>Actb Forward</i>	CTGGCACCACACCTTCTACA	55	NM_031144.3
<i>Actb Reverse</i>	AGGTCTCAAACATGATCTGGGT		

ном буфере (PBS) и помещали в 30 % раствор сахарозы, растворенный на PBS (при +4 °C). После криопротекции ткани семенников замораживали на сухом льду с использованием среды Tissue-Tek (“Sacura Finetek Europe”, Нидерланды). Серии поперечных срезов (толщина 6 мкм) готовили с помощью криостата Leica CM-1520 (“Leica Biosystems”, Германия) и монтировали на стеклах SuperFrost/plus (“Menzel”, Германия). Срезы из разных экспериментальных групп помещали на одно и то же стекло и сушили при комнатной температуре в течение ночи. Иммуногистохимическую реакцию проводили согласно протоколу, который был подробно описан ранее [12]. Для реакций были использованы первичные поликлональные кроличьи антитела к рецептору ЛГ (“LSBio”, США) в разведении 1:1000, вторичные антикроличьи IgG-антитела козы (“VectorLabs”, Великобритания) в разведении 1:600, конъюгированные с биотином (VectorLabs., Великобритания) и раствор стрептовидин–пероксидазы (BioLegend, США), разведенной 1:1000. Срезы обрабатывали 0.05 %-ным диаминобензидином (“Sigma-Aldrich”, США) и 0.03 %-ной перекисью водорода в PBS. Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, затем срезы помещали под покровное стекло с глицерином. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли с использованием отрицательного контроля (образцы без первичных или вторичных антител). Микрофотографии (по 10 для каждого животного) с разных уровней семенников получали с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1, объектив $\times 20$ (“Carl Zeiss”, Германия). Оптическую плотность иммунопозитивного к рецептору ЛГ материала оценивали с помощью программы Image J (NIH, США). Результаты представлены в арбитражных единицах.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ GraphPad Prism (версия 8.0.1). Уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови оценивали с помощью дисперсионного анализа ANOVA. Уровни тестостерона в крови, значения AUC_{0-270} для концентрационных кривых для тестостерона, мРНК исследуемых генов, а также изменения оптической плотности при иммуноокрашивании рецептора ЛГ в семенниках анализировали с помощью критерия Краскела–Уоллиса (с попарным сравнением критерием Данна).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ВЖВУД на метаболические показатели и тестикулярный стероидогенез у самцов крыс

Длительная ВЖВУД привела к значительному изменению метаболических показателей у самцов крыс. Масса абдоминального и эпидидимального жира, а также масса тела были повышены на 169,

80 и 16 % соответственно. При проведении глюкозотолерантного теста через 120 мин после глюкозной нагрузки уровни глюкозы, инсулина и лептина были повышены на 43, 25 и 60 % соответственно (табл. 2). Таким образом, самцы крыс, получавшие ВЖВУД, характеризовались выраженным ожирением (ДИО), нарушенной толерантностью к глюкозе, сниженной чувствительностью к инсулину и лептину.

Таблица 2. Изменение уровней глюкозы, инсулина и лептина в крови, а также массы тела и жировой ткани у самцов крыс, находящихся на стандартной диете или на ВЖВУД

Параметр	Контроль	ВЖВУД
Уровень глюкозы в крови натощак, мМ	5.17 $\pm$ 0.57	5.71 $\pm$ 0.61
Уровень глюкозы в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки, мМ	6.12 $\pm$ 0.74	8.18 $\pm$ 1.20*
Уровень инсулина в крови натощак, нг/мл	2.33 $\pm$ 0.46	2.67 $\pm$ 0.46
Уровень инсулина в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки, нг/мл	2.62 $\pm$ 0.95	3.33 $\pm$ 0.63*
Уровень лептина в крови натощак, нг/мл	2.63 $\pm$ 0.93	3.87 $\pm$ 1.50
Уровень лептина в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки, нг/мл	2.77 $\pm$ 1.08	6.19 $\pm$ 1.98*
Масса тела, г	362 $\pm$ 43	420 $\pm$ 41 [#]
Масса абдоминального жира, г	3.6 $\pm$ 1.1	9.7 $\pm$ 2.4 [#]
Масса эпидидимального жира, г	4.5 $\pm$ 1.0	8.1 $\pm$ 2.5 [#]

Данные представлены как $M \pm SD$, $n=24$. [#] — отличия между группами “Контроль” и ВЖВУД, * — отличия между временными точками 0 и 120 мин статистически значимы при $p < 0.05$.

После изучения влияния ВЖВУД на уровень тестостерона в крови и на уровень мРНК гена *Star*, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR в семенниках, нами не было выявлено значимых различий между контрольными крысами и животными с ДИО (рис. 1, 2). При этом в семенниках ДИО-крыс на 40 % была повышена экспрессия гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450_{ssc}, один из ключевых ферментов синтеза тестостерона. Кроме того, данные иммуногистохимического анализа демонстрировали снижение на 74 % содержания рецепторов ЛГ в клетках Лейдига у ДИО-крыс (рис. 3). Тем самым, несмотря на то что ВЖВУД существенно не влияла на уровень тестостерона, в семенниках наблюдали снижение уровня рецептора ЛГ и повышение экспрессии гена *Cyp11a1*, которое, по-видимому, носит компенсаторный характер.

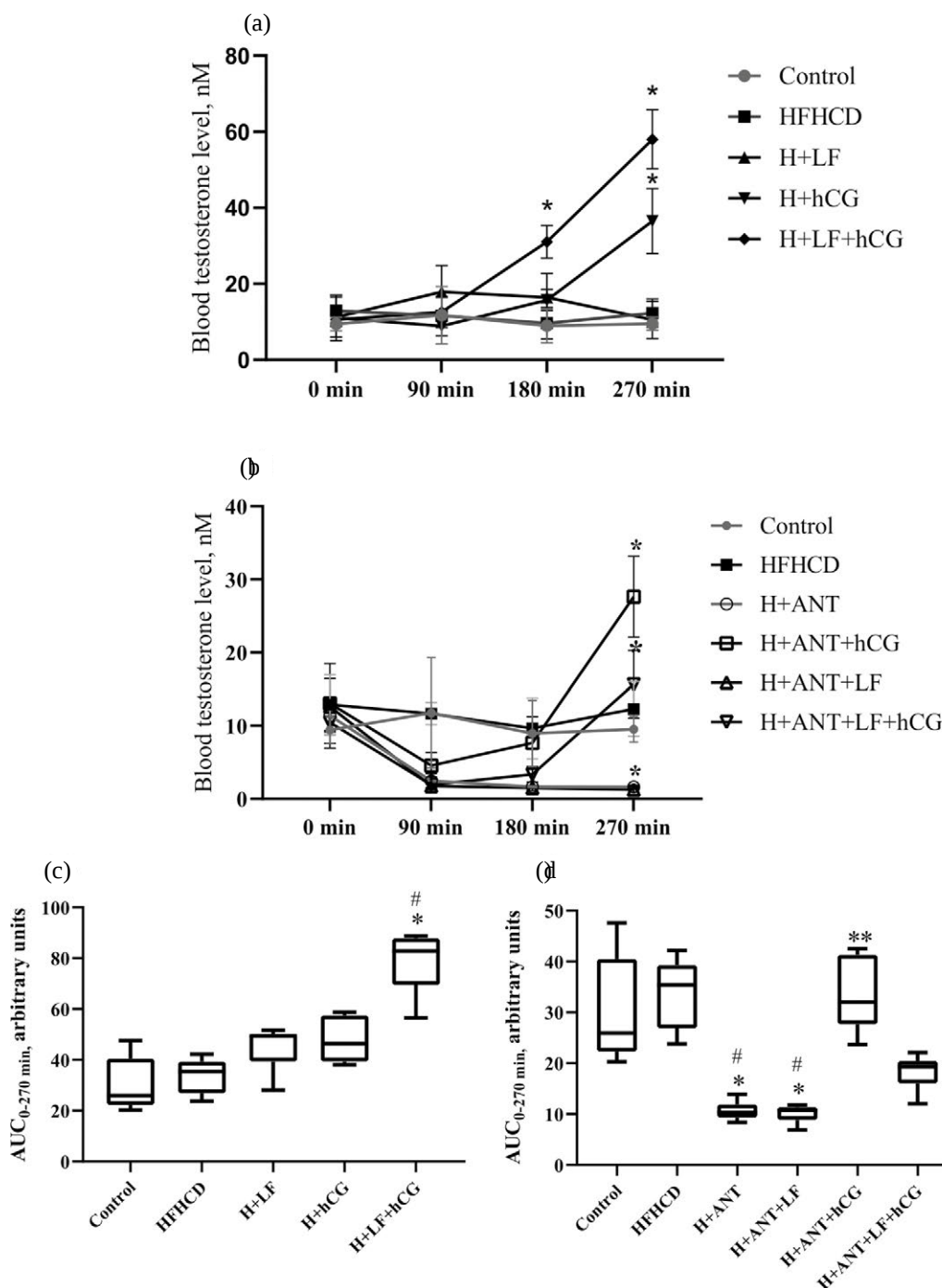


Рис. 1. Влияние трехдневного введения фрагмента лептина MA-[D-Leu4]-OB3 и/или центореликса и однократной инъекции ХГЧ на уровень тестостерона в крови самцов крыс в условиях потребления ими ВЖВУД.

Образцы крови для измерения уровня тестостерона были взяты из хвостовой вены в нулевой день эксперимента (0 min), а также на третий день обработки ФЛ и(или) АНТ через 90 мин после введения препаратов (90 min), через 180 мин после введения ФЛ и(или) АНТ и через 90 мин после введения ХГЧ (180 min), через 270 мин после введения ФЛ и(или) АНТ и через 180 мин после введения ХГЧ (270 min). (a) — Изменение уровня тестостерона в крови у ДИО-крыс, которым в течение трех дней интраназально вводили ФЛ в дозе 200 мкг/кг (H+LF и H+LF+hCG — группы “ВЖВУД+ФЛ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”) и однократно, подкожно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу (H+hCG и H+LF+hCG — группы “ВЖВУД+ХГЧ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”). (b) — Изменение уровня тестостерона в крови у ВЖВУД-крыс, которым в течение трех дней вводили АНТ в дозе 75 мкг/кг (подкожно) и/или ФЛ в дозе 200 мкг/кг (интраназально) (H+ANT — группа “ВЖВУД+АНТ”, H+ANT+LF — группа “ВЖВУД+АНТ+ФЛ”, H+ANT+hCG — группа “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ”, H+ANT+LF+hCG — группа “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ”) и однократно, подкожно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу (H+ANT+hCG и H+ANT+LF+hCG). (c) и (d) — Изменение значений AUC₀₋₂₇₀, которые соответствуют площади под кривой зависимости концентрации тестостерона в крови от времени, показанных на диаграммах (a) и (b). (a) и (b): * — отличия от базового уровня тестостерона (0 min) при внутригрупповом сравнении статистически значимы при $p < 0.05$, С и D: * — отличия от группы “Контроль” (Control), # — отличия от группы “ВЖВУД” (HFHCD), ** — отличия от группы “ВЖВУД+АНТ” (H+ANT) статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 6$.

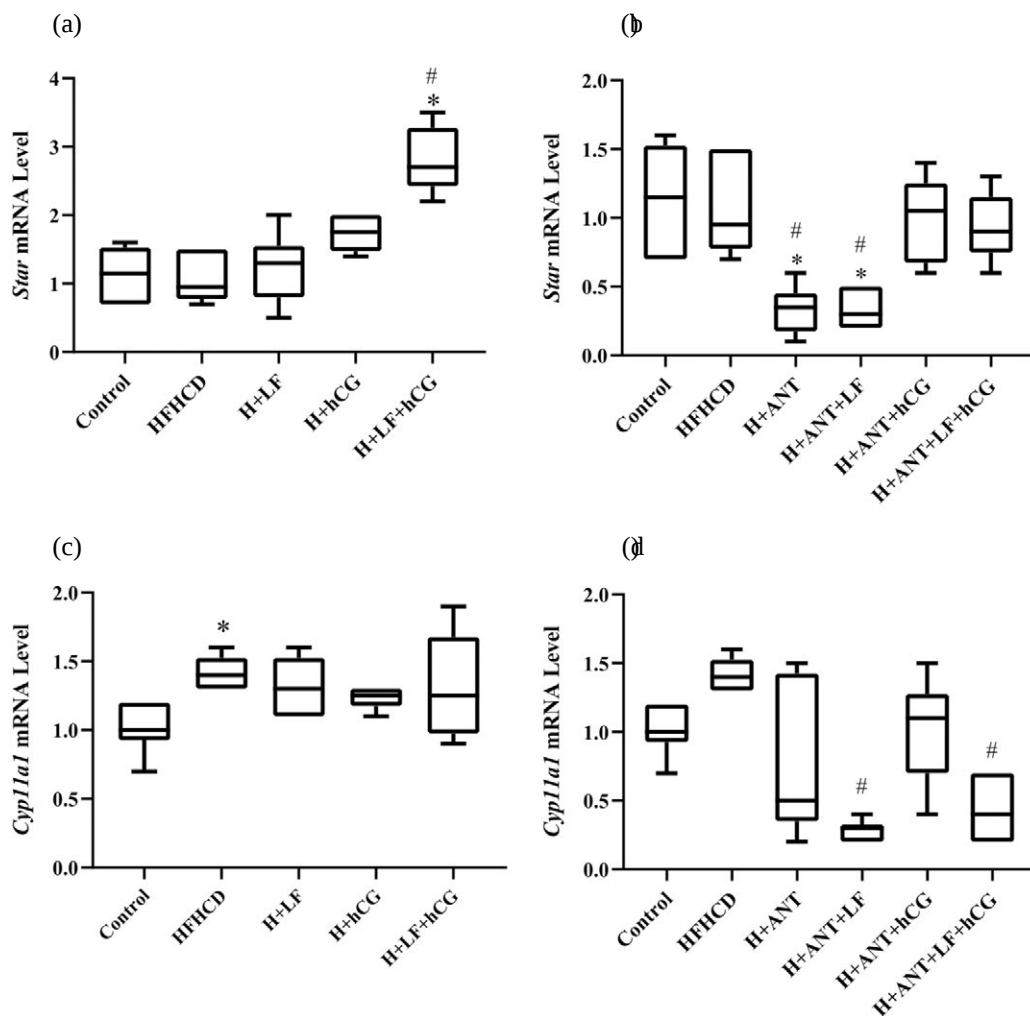


Рис. 2. Уровни мРНК генов *Star* и *Cyp11a1* в семенниках крыс, получавших ВЖВУД, на фоне введения фрагмента лептина МА-[D-Leu4]-ОВЗ и/или цетрореликса, а также стимуляции стероидогенеза с помощью ХГЧ. Образцы тканей семенников были взяты через 270 мин после введения ФЛ и/или АНТ и через 180 мин после введения ХГЧ. (а) – Уровни мРНК гена *Star* в семенниках ВЖВУД-крыс, которым в течение трех дней интраназально вводили ФЛ в дозе 200 мкг/кг (H+LF и H+LF+hCG – группы “ВЖВУД+ФЛ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”) и однократно, подкожно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу (H+hCG и H+LF+hCG – группы “ВЖВУД+ХГЧ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”). (б) – Уровни мРНК гена *Star* в семенниках ВЖВУД-крыс, которым в течение трех дней вводили АНТ в дозе 75 мкг/кг (подкожно) и/или ФЛ в дозе 200 мкг/кг (интраназально) (H+ANT – группа “ВЖВУД+АНТ”, H+ANT+LF – группа “ВЖВУД+АНТ+ФЛ”, H+ANT+hCG – группа “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ”, H+ANT+LF+hCG – группа “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ”) и однократно, подкожно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу (H+ANT+hCG и H+ANT+LF+hCG). (в) и (д) – Уровни мРНК гена *Cyp11a1* в семенниках ДИО-крыс на фоне введения ФЛ, АНТ, ХГЧ или их комбинаций. Препараты вводили как описано выше. Данные представлены как медиана, максимальное и минимальное значение, $n = 6$ в каждой группе. * – отличия от группы “Контроль” (Control), # – отличия от группы “ВЖВУД” (HFHCD) статистически значимы при $p < 0.05$.

Влияние ФЛ на эффекты ХГЧ на уровень тестостерона в крови, экспрессию генов тестикулярного стероидогенеза и содержание рецептора ЛГ в семенниках ДИО-крыс

Трехдневная интраназальная обработка самцов ДИО-крыс с помощью ФЛ приводила к усилению эффекта ХГЧ на уровень тестостерона в крови. В группе “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ” уровень тестостерона был повышен на 178 % уже через 90 мин после введения ХГЧ, а через 180 мин прирост составил 400 %.

В группе “ВЖВУД+ХГЧ” уровень тестостерона повышался на 231 % лишь через 180 мин после однократной инъекции ХГЧ (рис. 1а). Значение AUC_{0-270} под концентрационными кривыми для тестостерона в группе “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ” было значимо выше по сравнению с группами “Контроль” и “ВЖВУД” (рис. 1с). Уровень мРНК гена *Star* в семенниках был на 184 % повышен у крыс, получавших инъекцию ХГЧ на фоне предобработки ФЛ. Трехдневное введение ФЛ вызвало повышение количества

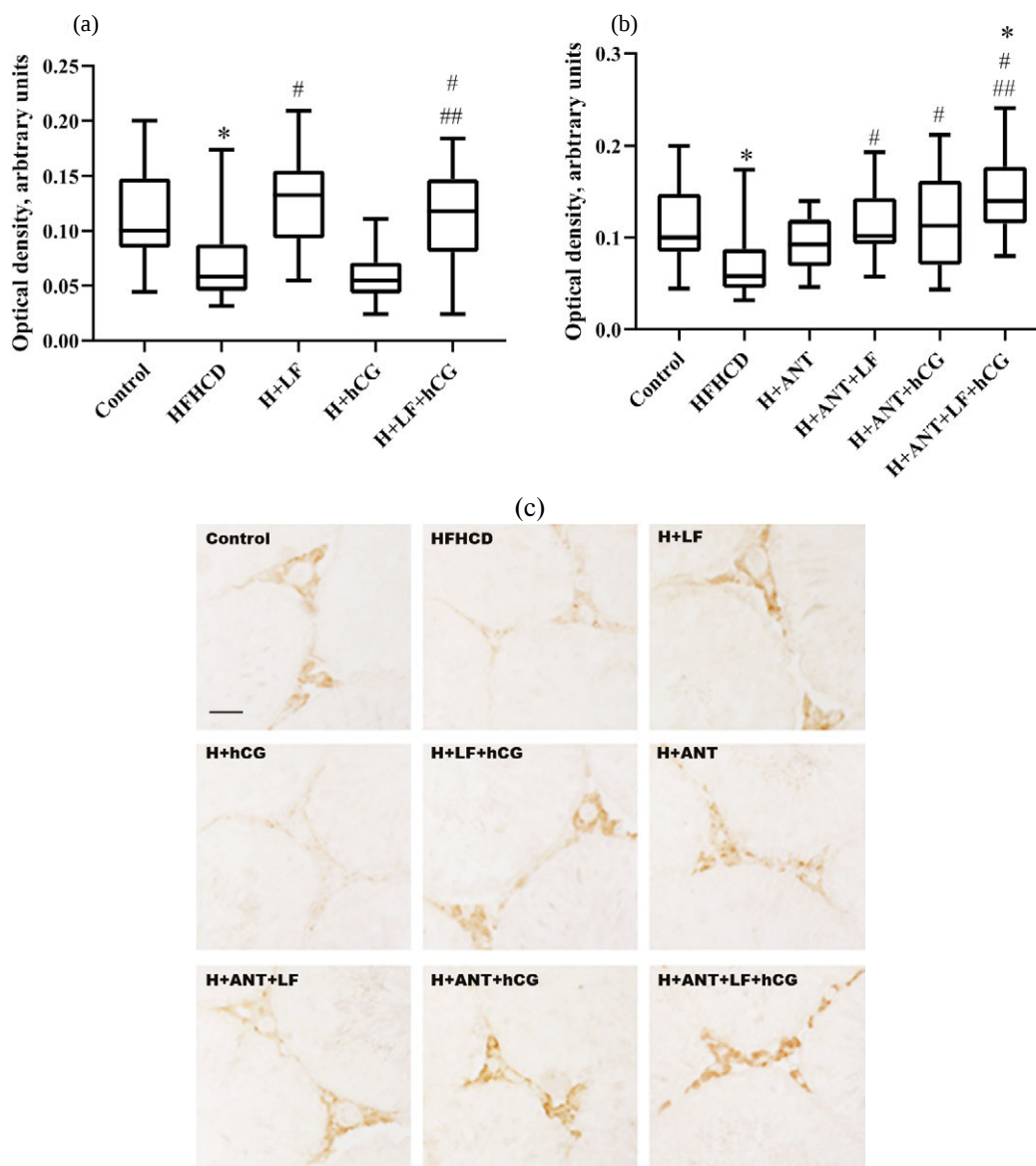


Рис. 3. Содержание белка рецептора ЛГ (а, б) и иммуногистохимическая реакция к рецептору ЛГ (с) в семенниках крыс, получавших ВЖВУД, на фоне трехдневного введения фрагмента лептина MA-[D-Leu4]-OB3 и/или цетрореликса, а также однократной инъекции ХГЧ.

Образцы тканей семенников были взяты через 270 мин после введения ФЛ и/или АНТ и через 180 мин после введения ХГЧ. (а) — Содержание рецептора ЛГ в семенниках ДИО-крыс, которым в течение трех дней интраназально вводили ФЛ в дозе 200 мкг/кг (H+LF и H+LF+hCG — группы “ВЖВУД+ФЛ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”) и однократно, подкожно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу (H+hCG и H+LF+hCG — группы “ВЖВУД+ХГЧ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”). (б) — Содержание рецептора ЛГ в семенниках ДИО-крыс, которым в течение трех дней вводили АНТ в дозе 75 мкг/кг (подкожно) и/или ФЛ в дозе 200 мкг/кг (интраназально) (H+ANT — группа “ВЖВУД+АНТ”, H+ANT+LF — группа “ВЖВУД+АНТ+ФЛ”, H+ANT+hCG — группа “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ”, H+ANT+LF+hCG — группа “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ”) и однократно, подкожно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу (H+ANT+hCG и H+ANT+LF+hCG). (с) — Иммуногистохимическая реакция к рецептору ЛГ в семенниках ДИО-крыс. Масштаб на всех изображениях: 50 мкм. Данные представлены как медиана, максимальное и минимальное значение, $n = 6$ в каждой группе. * — отличия от группы “Контроль” (Control), # — отличия от группы “ВЖВУД” (HFHCD), ## — отличия от группы “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ” (H+ANT+hCG) статистически значимы при $p < 0.05$.

белка рецептора ЛГ в семенниках крыс в группах “ВЖВУД+ФЛ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ” на 128 и 103 %, соответственно, что указывает на полное восстановление содержания этого рецептора, существенно сниженного на фоне ВЖВУД. Сравнивая

группы, получавшие однократную инъекцию ХГЧ, необходимо отметить, что предобработка с помощью ФЛ повышала на 115 % содержание рецептора ЛГ в группе “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ” и по сравнению с группой “ВЖВУД+ХГЧ”.

Влияние трехдневного введения антагониста рецептора гонадолиберина на эффекты фрагмента лептина и ХГЧ на уровень тестостерона в крови, экспрессию стероидогенных генов и уровень рецептора ЛГ в семенниках крыс с ДИО

Трехдневное введение АНТ привело к снижению уровня тестостерона в крови в группах “ВЖВУД+АНТ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ” на 85 и 90 % спустя 180 мин после третьего введения АНТ. Введение ХГЧ повышало уровень тестостерона на 593 %, а на фоне введения ФЛ эффект ХГЧ усиливался до 714 %. Однако при оценке интегрального показателя AUC_{0-270} картина менялась. Так введение АНТ снижало значение AUC_{0-270} в группах “ВЖВУД+АНТ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ” на 244 и 229 % соответственно. В группах, получавших ХГЧ, было показано еще более выраженное влияние однократной инъекции ХГЧ на уровень тестостерона на фоне АНТ, которое привело к повышению AUC_{0-270} на 211 % по сравнению с группой “ВЖВУД+АНТ” (рис. 1d). Таким образом, введение ФЛ параллельно с АНТ привело к уменьшению прироста значения AUC_{0-270} в группе “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ” по сравнению с группой “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ”.

Введение АНТ привело к снижению уровня мРНК гена *Star* на 171 и 217 % в группах “ВЖВУД+АНТ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ”, соответственно. При этом стимуляция с помощью ХГЧ в равной степени восстанавливала генную экспрессию в группах “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ”. Трехдневное введение ФЛ ДИО-крысам снижало экспрессию гена *Cyp11a1* на фоне введения АНТ в группах “ВЖВУД+АНТ+ФЛ” и “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ” на 367 и 250 %, соответственно. При этом в группах “ВЖВУД+АНТ” и “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ” такого снижения показано не было. Введение АНТ восстанавливало содержание белка рецептора ЛГ, сниженное при потреблении ВЖВУД, но в группе “ВЖВУД+АНТ+ФЛ+ХГЧ” прирост содержания белка рецептора ЛГ был на 24 % выше, чем в группе “ВЖВУД+АНТ+ХГЧ”.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для изучения влияния ожирения на метаболические и гормональные дисфункции, как правило, используют модели ДИО, для которых характерны повышение массы тела, увеличение доли жировой ткани, дислипидемия, нарушенная толерантность к глюкозе, сниженная чувствительность к инсулину и лептину [13]. В нашем исследовании ДИО было индуцировано с помощью комбинированной ВЖВУД, которую животные получали в течение 20 недель, начиная с двухмесячного возраста. У крыс, получавших эту диету, имелись выраженные нарушения глюкоз-

ного и липидного метаболизма, которые сопровождались повышением доли жировой ткани, инсулиновой и лептиновой резистентностью (табл. 2).

Ожирение, в том числе ассоциированное с сахарным диабетом 2-го типа и метаболическим синдромом, может приводить к ослаблению функциональной активности ГГТ оси у человека, что выражается в снижении уровня тестостерона в крови и нарушении стероидогенеза и сперматогенеза в семенниках [14, 15]. Несмотря на это, грызуны с ДИО, индуцированным с помощью высокожировой диеты и ВЖВУД, не всегда демонстрируют значимые нарушения тестикулярного стероидогенеза, что, по-видимому, связано с видоспецифичными адаптационными возможностями у грызунов разных линий и запуском компенсаторных процессов, позволяющих, по крайней мере, частично восстановить стероидогенный статус [16]. В настоящем исследовании нами не было выявлено существенных изменений уровня тестостерона в крови и экспрессии гена *Star*, ответственного за первую, скорость-лимитирующую стадию тестикулярного стероидогенеза, у крыс, находящихся на ВЖВУД. В то же время у них было выявлено снижение содержания рецептора ЛГ в семенниках (рис. 3), что может указывать на начальные стадии резистентности семенников к действию эндогенного ЛГ. Ранее сходные результаты были показаны нами у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа, которые длительное время получали высокожировую диету и однократно обрабатывались стрептозотоцином в дозе 25 мг/кг [12]. В настоящем исследовании в группе “ВЖВУД” нами обнаружено компенсаторное повышение уровня мРНК гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450_{ssc} (рис. 2в). Митохондриальный фермент цитохром P450_{ssc} катализирует превращение холестерина в прегненолон, что является первой стадией синтеза тестостерона, и это делает этот фермент важнейшим функциональным компонентом системы тестикулярного стероидогенеза [17].

Ранее было установлено, что фрагмент лептина MA-[D-Leu4]-OB3, обладающий основными фармакологическими свойствами полноразмерного лептина, способен снижать уровень глюкозы в крови и нормализовать потребление пищи [8, 10]. Кроме того, ранее нами было показано, что даже однократное введение ФЛ повышало уровень тестостерона в крови у крыс, находящихся на нормальной диете, а трехдневное введение было способно модулировать стероидогенный эффект ХГЧ [11]. В данной работе мы также исследовали способность ФЛ модулировать эффекты ХГЧ на уровень тестостерона в крови крыс с ожирением, вызванном длительной ВЖВУД. В группе “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ” нами был показан более выраженный эффект ХГЧ как по временной динамике, так и по уровню тестостерона в крови. Уже через 90 мин после введения ХГЧ (10 МЕ/кры-

су) уровень тестостерона повышался, в то время как ДИО-крысы, не получавшие ФЛ, демонстрировали значимое повышение уровня тестостерона только через 180 мин. Кроме того, значение AUC_{0-270} , представляющее собой интегральную площадь под концентрационными кривыми для тестостерона, в группе “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ” было выше, чем в группе “ВЖВУД+ХГЧ” (рис. 1). Исследование уровня мРНК гена, кодирующего транспортный белок StAR, показало его увеличение в ответ на стимуляцию ХГЧ на фоне обработки ФЛ. Белок StAR осуществляет транспорт холестерина из цитоплазмы в митохондрии, к месту начала синтеза тестостерона [17]. Таким образом, этот этап становится скоростью-лимитирующим в тестикулярном стероидогенезе и повышение экспрессии гена *Star* свидетельствует о стимуляции синтеза тестостерона. Ранее нами не было показано модулирующего эффекта ФЛ на уровень мРНК гена *Star* у крыс, получавших стандартную диету [11], что может указывать на более выраженное действие ФЛ на тестикулярный стероидогенез у крыс с ДИО. Одним из возможных объяснений более выраженного эффекта ФЛ у самцов крыс, получавших ВЖВУД, может быть развитие у них лептиновой резистентности и центральной лептиновой недостаточности в условиях ожирения [6, 18, 19]. Интраназальное введение ФЛ позволяет доставить препарат непосредственно к гипоталамическим структурам, где в условиях недостатка лептина эффект ФЛ может быть более выраженным [9, 10].

Способность клеток Лейдига семенников сохранять стероидогенную активность связана, в первую очередь, с нормальным функционированием рецепторного аппарата, являющегося мишенью гипоталамического ЛГ. Показанное нами снижение уровня рецептора ЛГ в семенниках ДИО-крыс было полностью компенсировано введением ФЛ в группах “ВЖВУД+ФЛ” и “ВЖВУД+ФЛ+ХГЧ”, что, как мы полагаем, объясняет модулирующий эффект ФЛ на тестикулярный стероидогенез при обработке крыс гонадотропином. Таким образом, нами показано, что ФЛ способен модулировать эффект ХГЧ на уровень тестостерона и экспрессию гена *Star* в семенниках у крыс с ВЖВУД-индуцированным ожирением, что, по всей видимости, объясняется способностью ФЛ восстанавливать чувствительность клеток Лейдига к гонадотропинам с ЛГ-активностью.

Секретируемый жировой тканью адипокин лептин, как и его фрагмент, используемый в настоящей работе, действуют в первую очередь на POMC- и NPY/AgRP-экспрессирующие нейроны аркуатного ядра гипоталамуса [3, 4]. Помимо ярко выраженного анорексигенного эффекта лептин также опосредованно влияет на GnRH-экспрессирующие нейроны гипоталамуса, стимулируя продукцию кассептина и меланокортиновых пептидов, активаторов се-

креции GnRH, и подавляя продукцию NPY и AgRP, ингибирующих секрецию GnRH. Ранее нами было обнаружено, что основной мишенью ФЛ является гипоталамическое звено ГГТ оси [11]. Введение антагониста рецептора GnRH цетрореликса совместно с ФЛ полностью подавляло его модулирующий эффект при стимуляции ХГЧ на уровень тестостерона в крови самцов крыс, получавших стандартную диету. В настоящем исследовании, нами также было показана способность цетрореликса подавлять модулирующий эффект ФЛ как на уровень тестостерона в крови, так и на экспрессию гена *Star* в семенниках ДИО-крыс. Таким образом, введение антагониста GnRH нивелирует модулирующий эффект ФЛ на тестикулярный стероидогенез у крыс, находящихся на ВЖВУД, что подтверждает полученные нами ранее результаты на животных без ожирения.

Нами показано, что ФЛ на фоне введения АНТ подавляет стимулирующий эффект ХГЧ как на уровень тестостерона в крови, так и на экспрессию гена *Cyp11a1* в семенниках крыс, получавших ВЖВУД. Подобный парадоксальный эффект может объясняться периферическими эффектами ФЛ, обусловленными его связыванием с рецепторами лептина, локализованными на поверхности клеток Лейдига. По данным литературы, воздействие лептина на семенники может приводить к разнонаправленным эффектам на тестикулярный стероидогенез и сперматогенез [5], что хорошо соотносится с нашими результатами.

Таким образом, впервые показано, что мистилированный фрагмент лептина 116–122 MA-[D-Leu4]-OV3 при трехдневном интраназальном введении крысам с ожирением, вызванным ВЖВУД, способен усиливать эффекты ХГЧ на уровень тестостерона в крови, а также на уровень мРНК гена *Star* в семенниках, и его стимулирующие эффекты обусловлены в основном воздействием на гипоталамические звенья ГГТ оси. Установлено, что в присутствии цетрореликса, антагониста рецептора GnRH, подавляющего активность гонадной оси, выявляются разнонаправленные периферические эффекты ФЛ, которые выражаются, с одной стороны, в подавлении стимулирующего эффекта ХГЧ на уровень тестостерона и экспрессию гена *Star* и, с другой, в восстановлении уровня рецептора ЛГ в семенниках крыс, сниженном на фоне ВЖВУД. Полученные нами данные указывают на способность ФЛ влиять на различные компоненты мужской гонадной оси в условиях ДИО, а также способствуют более глубокому пониманию роли лептина и его внутриклеточных сигнальных путей во взаимосвязи между метаболическими и гормональными нарушениями при ожирении и сахарном диабете и дисфункциями мужской репродуктивной системы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры осуществляли в строгом соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 1 от 27.01.2022), “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” и European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-75-00130).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы исследования декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.А.Б.), сбор данных (А.А.Б., И.А.Л. и В.С.К., И.Ю.М.), обработка данных (А.А.Б., И.А.Л., В.С.К., И.Ю.М.), написание и редактирование манускрипта (А.А.Б. и А.О.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khodamoradi K, Parmar M, Khosravizadeh Z, Kuchakulla M, Manoharan M, Arora H* (2020) The role of leptin and obesity on male infertility. *Curr Opin Urol* 30(3):334–339. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000762>
2. *Lainez NM, Coss D* (2019) Obesity, Neuroinflammation, and reproductive function. *Endocrinology* 160(11):2719–2736. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00487>
3. *Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, MacNicol AM* (2021) The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology* 162(2): bqaa204. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa204>
4. *Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, Gojobori T, Isenovic ER* (2021) Leptin and obesity: role and clinical implication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12:585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
5. *Nieuwenhuis D, Pujol-Gualdo N, Arnoldussen IAC, Kiliaan AJ* (2020) Adipokines: a gear shift in puberty. *Obes Rev* 21(6): e13005. <https://doi.org/10.1111/obr.13005>
6. *Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC* (2019) Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients* 11(11):2704. <https://doi.org/10.3390/nu11112704>
7. *Novakovic ZM, Leinung MC, Grasso P* (2013) [D-Leu-4]-OB3, an orally bioavailable leptin-related synthetic peptide insulin sensitizer: a study comparing the efficacies of [D-Leu-4]-OB3 and metformin on energy balance and glycemic regulation in insulin-deficient male Swiss Webster mice. *Peptides* 43:167–173. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.02.023>
8. *Wang A, Anderson BM, Novakovic ZM, Grasso P* (2018) [D-Leu-4]-OB3 and MA-[D-Leu-4]-OB3, small molecule synthetic peptide leptin mimetics, improve glycemic control in diet-induced obese (DIO) mice. *Peptides* 101:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.012>
9. *Novakovic ZM, Leinung MC, Lee DW, Grasso P* (2009) Intranasal administration of mouse [D-Leu-4]OB3, a synthetic peptide amide with leptin-like activity, enhances total uptake and bioavailability in Swiss Webster mice when compared to intraperitoneal, subcutaneous, and intramuscular delivery systems. *Regul Pept* 154(1–3):107–111. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.01.002>
10. *Anderson BM, Jacobson L, Novakovic ZM, Grasso P* (2017) Oral delivery of [D-Leu-4]-OB3 and MA-[D-Leu-4]-OB3, synthetic peptide leptin mimetics: Immunofluorescent localization in the mouse hypothalamus. *Brain Res* 1664:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.03.020>
11. *Bakhtyukov AA, Lebedev IA, Kuznetsova VS, Derkach KV, Shpakov AO* (2023) Leptin fragment 116–122 modulates testicular steroidogenesis in male rats. *J Evol Biochem Physiol* 59(3): 904–913. <https://doi.org/10.1134/S0022093023030225>
12. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepanchikina AM, Romanova IV, Morina IYu, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2021) The effects of separate and combined treatment of male rats with type 2 diabetes with metformin and orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor on steroidogenesis and spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23(1):198. <https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
13. *Rodríguez-Correa E, González-Pérez I, Clavel-Pérez PI, Contreras-Vargas Y, Carvajal K* (2020) Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes* 10(1):24. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>
14. *Donner DG, Elliott GE, Beck BR, Bulmer AC, Lam AK, Headrick JP, Du Toit EF* (2016) Trenbolone improves cardiometabolic risk factors and myocardial tolerance to ischemia-reperfusion in male rats with testosterone-deficient metabolic syndrome. *Endocrinology* 157(1):368–381. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1603>
15. *Nasr M, Abd-Allah H, Ahmed-Farid OAH, Bakeer RM, Hassan NS, Ahmed RF* (2022) A comparative study between curcumin and curcumin nanoemulsion on high-fat, high-fructose diet-induced impaired spermatogenesis in rats. *J Pharm Pharmacol* 74(2):268–281. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab172>
16. *Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WD* (2011) Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 9:32. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-32>
17. *Zirkin BR, Papadopoulos V* (2018) Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod* 99(1):101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/iroy059>
18. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents. *Neurochem Res* 43(4):821–837. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
19. *Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov 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(3): e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>

LEPTIN FRAGMENT MODULATES THE STIMULATORY EFFECTS OF CHORIONIC GONADOTROPIN ON TESTICULAR STEROIDOGENESIS IN A MODEL OF DIET-INDUCED OBESITY IN RATS

A. A. Bakhtyukov[#], I. A. Lebedev, I. Yu. Morina, V. S. Kuznetsova and A. O. Shpakov

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

[#] e-mail: bahtyukov@gmail.com

Leptin, secreted by adipose tissue, indirectly stimulates the activity of GnRH-producing neurons of the hypothalamus and thus regulates the functional activity of the hypothalamic-pituitary-testicular (HPT) axis. As is known, the obesity is accompanied by systemic hyperleptinemia and impaired leptin transport in the central nervous system, which limits the use of full-length leptin as a drug. It was previously shown that intranasally administered leptin fragment MA-[D-Leu4]-OB3 (LF) enhances the steroidogenic effect of human chorionic gonadotropin (hCG) in rats fed a standard diet. An even more urgent task is to assess its effect on testicular steroidogenesis in conditions of obesity, which reduces reproductive functions in men. The aim of the work was to study the ability of LF (200 µg/kg, intranasally, 3 days) to modulate the effect of hCG (10 IU/rat, subcutaneously, once) on testicular steroidogenesis in rats with obesity induced by a high-fat/high-carbohydrate diet (HFHCD), and also to evaluate influence of the GnRH receptor antagonist cetrorelix (ANT, 75 µg/kg, subcutaneously, 3 days) on the effects of LF. Male Wistar rats were used for the study and received HFHCD for 20 weeks. In obese rats, the level of the luteinizing hormone (LH) receptor in the testes was reduced and the expression of the *Cyp11a1* gene, encoding the steroidogenic enzyme cytochrome P450_{scc}, was compensatory increased. LF administration enhanced the effect of hCG on the testosterone level in the blood and the expression of the *Star* gene, encoding the cholesterol transport protein StAR, which indicates the ability of LF to positively modulate the activity of the HPT axis in obesity. Co-administration of ANT and LF, on the contrary, reduced the stimulating effect of hCG on testosterone levels and *Star* gene expression, which may be due to the testicular effects of LF. Our data indicate the ability of LF to influence various components of the male gonadal axis under conditions of diet-induced obesity.

Keywords: leptin fragment, obesity, gonadotropin, testicular steroidogenesis, GnRH receptor antagonist, testosterone, intranasal administration

СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ОРГАНИЗМЕ КОПЫТНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИЯ

© 2024 г. С. Н. Калинина^{1, *}, В. А. Илюха², В. Т. Комов², И. А. Зайцева¹,
И. В. Баишникова¹, Д. В. Панченко¹, Е. П. Антонова¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, Россия

² Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

* e-mail: cvetnick@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принята к публикации 17.03.2024 г.

Высокая токсичность ртути (Hg) представляет опасность для окружающей среды и человека, однако исследования концентрации этого металла у организмов наземных экосистем немногочисленны. Также мало внимания экотоксикологи уделяют изучению роли антиоксидантных витаминов в защите клетки от токсичных металлов. Республика Карелия является одним из северо-западных регионов России, биогеохимические особенности которого могут способствовать увеличению подвижности и биодоступности Hg в пищевых цепях. Цель работы состояла в определении концентрации Hg в печени, почках, мышце и шерсти копытных млекопитающих Республики Карелия (дикого кабана *Sus scrofa* L. и лося *Alces alces* L.) и анализе взаимосвязей между уровнем этого токсичного металла и содержанием некоторых низкомолекулярных антиоксидантов — восстановленного глутатиона, ретинола и α -токоферола. Отмечены видовые и тканевые особенности изученных показателей у кабанов и лосей. Подтверждены обнаруженные другими исследователями наблюдения о том, что всеядные виды по сравнению с растительноядными накапливают в своем организме больше Hg, а также что этот токсичный металл преимущественно аккумулируется в почках, тогда как мышцы содержат его минимальное количество. Концентрация Hg в большинстве проб печени и почки кабанов и во всех исследуемых пробах этих же органов лосей находились в пределах норм, зарегистрированных для домашних свиней и оленей соответственно. Зафиксированные нами уровни Hg в тканях и шерсти кабанов и лосей, в основном, были сопоставимы или ниже уровней этого металла, отмеченных у животных из других регионов России и других стран мира. У кабанов и лосей Карелии статистически значимых взаимосвязей между уровнем Hg и содержанием исследуемых антиоксидантов во внутренних органах обнаружено не было. Лоси характеризовались более высоким содержанием α -токоферола в организме, чем кабаны, что является особенностью данного вида растительноядных копытных млекопитающих. Результаты исследования свидетельствуют об относительно низком уровне загрязнения ртутью наземных экосистем Карелии.

Ключевые слова: токсичность, ртуть, ретинол, α -токоферол, глутатион, кабан, лось

DOI: 10.31857/S0044452924030022, **EDN:** YXVQXW

ВВЕДЕНИЕ

Ртуть (Hg, Hydrargyrum) является элементом, чья токсичность представляет серьезную угрозу для природы в целом и здоровья человека в частности [1, 2]. Металл попадает в окружающую среду в результате вулканической деятельности, выветривания горных пород, а также промышленной деятельности человека [3], далее ртуть транспортируется и перераспределяется между основными компонентами окружающей среды (воздухом, почвой и водой), пока в конечном итоге не будет удалена из системы путем залегания в прибрежных и глубоководных океанических и озерных отложениях и подземных почвах.

В окружающей среде металл может присутствовать в элементарной форме или в виде различных химических соединений, включая неорганические и органические. Последние, особенно метилртуть (CH_3Hg), обладают большей токсичностью для растений и животных, чем неорганические [3].

Ртуть поступает в организм животных и человека с пищей, при дыхании, а также через кожу и аккумулируется, в основном, в ЦНС, почках и печени [4]. У человека, птиц и млекопитающих [4, 5] повышенные уровни CH_3Hg приводят к нарушениям функции нервной, гормональной и выделительной систем, нарушениям двигательных функций, снижению репродуктивной способности и гибели. Око-

ло 90% соединений CH_3Hg выводится с желчью через желудочно-кишечный тракт, в меньшей степени через почки с мочой.

Считается, что токсическое действие металлов (в том числе и Hg) при хроническом воздействии во многом аналогично окислительному стрессу, индуцированному активными формами кислорода (АФК) [2, 6]. Для противодействия окислительным повреждениям, опосредованным металлами, крайне важно взаимодействие как эндогенных, так и экзогенных антиоксидантов. В экотоксикологических исследованиях достаточно часто фигурирует группа эндогенных антиоксидантов — глутатион (GSH, γ -глутамил-цистеинил-глицин), ферменты супероксиддисмутаза, глутатион-зависимые ферменты и каталаза [7], тогда как мало внимания уделяется изучению роли антиоксидантных витаминов (ретиноиды, α -токоферол и аскорбиновая кислота) в защите клетки от токсичных металлов [8–10].

Витамины — это органические соединения, которые присутствуют в рационе в очень небольших количествах. Витамин Е является жирорастворимым природным антиоксидантом, в организме млекопитающих его наиболее распространенной и биологически активной формой является α -токоферол [11]. Антиоксидантные свойства витамина Е обеспечивают защиту компонентов клеточных мембран путем передачи фенольного водорода свободным радикалам, ингибируя тем самым цепные реакции распространения свободных радикалов. Воздействие токсичных металлов может опосредованно влиять на уровень витамина Е в клетке, который способен предотвращать окислительные повреждения свободными радикалами, вызванные CH_3Hg [12] и Pb [9].

Ретиноиды — это натуральные или синтетические соединения со структурой, сходной с ретинолом, и среди этого обширного комплекса молекул те природные формы, которые способны проявлять биологическую активность, объединены термином “витамин А” [13]. Ретиноиды необходимы для жизненно важных биологических функций — роста, развития, дифференцировки клеток, иммунитета, размножения и зрения. Ретинол является предшественником для биосинтеза двух важнейших биологически активных метаболитов ретиналя и ретиноевой кислоты. Ретиноевая кислота регулирует физиологические процессы, являясь лигандом ядерных рецепторов, тогда как альдегидная форма важна для зрения [13]. Имеются сведения, что ретиноиды защищают клетки от окислительного стресса, удаляя свободные радикалы и препятствуя выработке АФК [14]. Предполагают, что положительная взаимосвязь между концентрацией Cd в почках и концентрацией ретиноидов в печени у рыб, обитающих в загрязненных районах, является механизмом защиты от окислительного повреждения, вызванного

Cd [8]. В других работах сообщается об увеличении уровней ретиноидов у диких животных в связи с загрязнением Fe, Zn, Cu [15], Hg [16] и Pb [9, 10].

Поскольку водные экосистемы являются важным компонентом глобального биогеохимического цикла ртути, хорошо изучены происходящие в них метилирование и биомagniфикация этого металла [17]. Трансформация неорганической Hg анаэробными микроорганизмами донных отложений в толще воды приводит к образованию CH_3Hg , которая последовательно аккумулируется на разных трофических уровнях пищевой цепи [18]. Рыбоядные птицы, водные и околотоводные млекопитающие, а также человек подвергаются гораздо более высокому риску накопления Hg в печени, почках и мышцах, чем типичные наземные гомеотермные хищники, предпочитающие питаться наземной добычей [2]. Дикие животные наземных экосистем, скорее всего, хронически испытывают воздействие низких доз ртути, содержащейся в пище, воде и окружающем воздухе, но исследования концентрации Hg у организмов наземных экосистем немногочисленны [2, 9, 10]. Однако ввиду высокого уровня глобального загрязнения окружающей среды ртутью такие работы крайне важны и необходимы [1, 2].

Проведенное нами исследование было сосредоточено на диких копытных млекопитающих (кабанах *Sus scrofa* L. и лосях *Alces alces* L.), обитающих на северо-западе России в Республике Карелия. Эти виды животных часто используются в экотоксикологических исследованиях в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды [2], они представляют один из высших трофических уровней лесных экосистем, предшествующий хищникам и человеку; кабан является всеядным, а лось — растительноядным животным. В настоящее время сведения о содержании Hg у копытных животных России и Европы фрагментарны и малочисленны [2, 19–22].

При изучении накопления ртути в основных естественных природных и урбанизированных средах Карелии [23] выявлено, что уровни этого металла в почве и растительности в некоторых исследованных районах не превышают принятых в России нормативов и близки к фоновым. Также близки к фоновым и значения концентрации Hg в воде и донных отложениях. Тем не менее, особенностью поверхностных вод Карелии является повышенная кислотность, что увеличивает подвижность и биодоступность ртути в пищевых цепях [24].

Цель работы состояла в определении концентрации ртути в печени, почках, мышце и шерсти наземных копытных млекопитающих Республики Карелия, а также анализе взаимосвязей между уровнем этого токсичного металла и содержанием низкомолекулярных антиоксидантов — GSH, ретинола и α -токоферола. Ранее [25] нами были исследованы в возрастном

аспекте уровни указанных антиоксидантов у кабанов, обитающих на северо-западе России (территории Республики Карелия и Ленинградской области).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Биологический материал был получен от кабанов (*Sus scrofa* L.) и лосей (*Alces alces* L.), добытых в результате легальной охоты в Республике Карелия во время охотничьих сезонов 2017–2022 гг. Учитывали пол, возраст (по прорезыванию зубов и их замене [26]) и массу тела каждого животного. Использовали образцы тканей шерсти, печени, почки и мышцы задней конечности у 35 диких кабанов и 16 лосей, обитающих в естественной среде на территории Лахденпохского, Сортавальского и Пряжинского районов Республики Карелия. Поскольку влияния района обитания на исследуемые показатели обнаружено не было, данные, полученные на животных трех исследуемых районов Республики Карелия, были объединены в общий пул. Выборка кабанов состояла из 15 самцов и 20 самок, 0.5–6 лет, массой тела 20–70 кг; выборка лосей — из 10 самцов и 6 самок, 1.5–8 лет, массой тела 100–350 кг. Животные были разделены на возрастные группы: сеголетки (< 1 года), молодые (1.5 года для кабанов и 1.5–2.5 лет для лосей) и взрослые (> 2 лет для кабанов и > 3 лет для лосей). Поскольку биологический материал собирался в полевых условиях охотниками, по разным техническим причинам набор биоматериала (печень, почка, мышца, шерсть) от животных не в каждом случае был полным. Согласно рекомендациям [27], образцы внутренних органов были взяты у животных в течение первых 2 ч после смерти и были немедленно помещены охотниками в сухой лед для транспортировки в лабораторию, где впоследствии хранились при температуре –80 °С до анализа.

Методы исследования

Содержание ртути в образцах определяли на ртутном анализаторе РА-915+ с приставкой ПИРО (“Люмэкс”, г. Санкт-Петербург) атомно-абсорбционным методом холодного пара без предварительной пробоподготовки [28]. Точность аналитических методов измерения контролировали с использованием сертифицированного биологического материала DORM-2 и DOLM-2 (Институт химии окружающей среды, Оттава, Канада). Концентрацию ртути измеряли в мкг/кг сырой массы ткани.

Определение содержания ретинола, токоферола, глутатиона и общего белка выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр Российской академии наук”.

Для определения содержания витаминов [29] навески тканей (100 мг) гомогенизировали в 0.9 мл 0.25 М раствора сахарозы (рН 7.4), содержащей 0.001 М динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА- Na_2). В конические полиэтиленовые пробирки вносили 0.25 мл гомогената и добавляли 0.25 мл 0.025 % раствора бутилгидрокситолуола в этаноле, после чего тщательно смешивали содержимое пробирки для осаждения белков. Затем добавляли 0.5 мл 0.0125 % раствора бутилгидрокситолуола в н-гексане, энергично встряхивали в течение 5 мин, центрифугировали 10 мин при 3000 g и оставляли образцы на холоде (4 °С) в течение 40 мин. В гексановом слое на микроколоночном жидкостном хроматографе “Милихром-6” (Россия) с УФ-детектором определяли концентрации α -токоферола и ретинола при длине волны 292 и 324 нм соответственно. Использовали хроматографическую колонку с прямой фазой (КАХ-5-80-4, Россия), элюирование проводили в изократическом режиме, скорость потока элюента 200 мкл/мин. Элюентом служила смесь гексана с изопропанолом в соотношении 98.5:1.5. Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы ретинола и α -токоферола (Sigma, США), расчет содержания витаминов проводили методом внешнего стандарта.

Для определения содержания GSH [30] 50 мг ткани гомогенизировали в 2 мл 0.02 М ЭДТА- Na_2 . После центрифугирования (15 мин при 5000 g) 1 мл супернатанта смешивали с 4 мл дистиллированной воды и 1 мл 50 % трихлоруксусной кислоты. Смесь периодически встряхивали в течение 10–15 мин, затем центрифугировали 15 мин при 3000 g. После центрифугирования 1 мл супернатанта смешивали с 2 мл 0.4 М трис-буферного раствора, добавляли 0.1 мл реактива Элмана и встряхивали смесь. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 412$ нм, СФ 2000, Россия) и выражали в мкмоль/г белка.

Содержание белка определяли по методу Лоури [31] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Следует отметить, что существует частичное пересечение данных по уровням ретинола, α -токоферола и глутатиона в печени, почке и мышце у 24 кабанов Республики Карелия между данной работой и уже опубликованным исследованием [25]. То есть в этих двух статьях только частично использовались одни и те же данные по некоторым кабанам, обитающим в Карелии. Однако, несмотря на это, цели этих двух статей — совершенно разные. Статья [25] содержит данные по уровням низкомолекулярных антиоксидантов у кабанов ($n=65$) разного возраста, обитающих на территории северо-запада России (Республики Карелия и Ленинградская область). Настоящая работа рассматривает степень загрязнения ртутью наземных экосистем (на примере копыт-

ных млекопитающих, как кабана ($n=35$), так и лося ($n=16$) Республики Карелия и включает в себя оценку возможных взаимосвязей уровня этого токсиканта с низкомолекулярными антиоксидантами.

Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами статистики в программах MS Excel и Statgraphics Plus 5.0 согласно рекомендациям [32]. Выборки имели распределение, отличающееся от нормального, поэтому данные в таблице представлены в виде медиан, а также нижнего и верхнего квартилей [Me (Q1; Q3)]. Для оценки влияния пола и возраста на исследуемые показатели использовали критерий Краскела—Уоллиса (Kruskal—Wallis H -test, непараметрический дисперсионный анализ). В связи с тем что статистически значимого влияния этих факторов обнаружено не было (за исключением влияния возраста на уровень ретинола в печени кабанов), данные по самкам и самцам одного вида разного возраста были объединены. Для оценки межвидовых различий показа-

телей использовали непараметрический критерий Манна—Уитни (Mann—Whitney test). Для выявления взаимосвязей, а также оценки их силы и направленности между изучаемыми показателями использовали корреляционный анализ (ранговый критерий Спирмена). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявлено влияние возраста на уровень ретинола в печени кабанов ($H=8.57$, $p < 0.01$): у животных 3-й возрастной группы (взрослые) [13.36 (11.96; 14.75)] этот показатель был выше, чем у сеголетков [31.93 (26.56; 37.30)]. Концентрации Hg, α -токоферола и GSH в органах (печень, почка, мышца) и шерсти (для Hg) кабанов и лосей в исследованные возрастные периоды статистически не различались ($p > 0.05$). С учётом этого данные по животным разного возраста одного вида были объединены. Содержание Hg, ретинола, α -токоферола и GSH в биологическом материале кабанов и лосей без разделения на возрастные группы представлено в табл. 1.

Таблица 1. Содержание ртути и антиоксидантов в организме кабанов и лосей [Me (Q1; Q3)]

Показатель	Биоматериал	Вид животного		Межвидовые различия (критерий Манна—Уитни, p)
		Кабан	Лось	
Ртуть, мкг/кг	печень	11.0 (5.0; 18.0) $n=28$	2.0 (1.0; 5.0) $n=15$	< 0.01
	почка	46.0 (29.0; 66.0) $n=29$	45.5 (29.0; 70.0) $n=14$	> 0.05
	мышца	4.0 (1.0; 6.0) $n=19$	1.0 (0.3; 1.0) $n=13$	< 0.01
	шерсть	23.0 (4.0; 27.0) $n=9$	5.0 (2.0; 8.0) $n=8$	> 0.05
Глутатион, мкмоль/г белка	печень	5.96 (4.96; 7.68) $n=29$	10.19 (6.09; 16.11) $n=4$	> 0.05
	почка	8.81 (6.22; 13.13) $n=29$	15.29 (8.43; 16.10) $n=4$	> 0.05
	мышца	7.09 (5.51; 10.17) $n=17$	22.89 (13.26; 28.95) $n=4$	> 0.05
α -Токоферол, мкг/г	печень	2.84 (1.44; 4.43) $n=27$	16.83 (10.36; 33.41) $n=14$	< 0.001
	почка	1.63 (0.87; 2.66) $n=26$	9.01 (4.64; 13.25) $n=12$	< 0.001
	мышца	1.48 (1.22; 3.87) $n=17$	5.35 (2.78; 12.04) $n=10$	< 0.05
Ретинол, мкг/г	печень	20.36 (12.74; 32.02) $n=27$	20.37 (6.18; 31.60) $n=14$	> 0.05
	почка	1.04 (0.45; 1.57) $n=26$	1.32 (0.82; 2.22) $n=12$	> 0.05
	мышца	0.33 (0.25; 0.39) $n=16$	0.33 (0.28; 0.43) $n=10$	> 0.05

Уровни исследованных показателей различались между тканями у одного вида (табл. 1). Так, среди органов кабанов и лосей именно почка отличалась самой высокой концентрацией ртути, тогда как в печени накапливались ретинол и α-токоферол. Уровень GSH был выше в почке кабана и мышце лося по сравнению с другими органами.

Межвидовые различия показателей (критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$) выразились в более высоком уровне ртути в печени и мышце у кабанов по сравнению с лосями, в более высокой концентрации α-токоферола в печени, почке и мышце лосей по сравнению с кабаном (табл. 1).

Сравнение данных по содержанию ртути в печени и почке кабанов и лосей Карелии с уровнями этого металла, указанными для домашних свиней и оленей соответственно [33], показало, что большинство проб органов кабанов и все исследуемые пробы органов лосей содержали оптимальный уровень ртути (табл. 2).

Таблица 2. Процент (%) образцов тканей дикого кабана и лося, содержащих концентрацию ртути, сопоставимую с референсными значениями элемента для домашних свиней и оленей соответственно [33]

Вид животного	Орган	Процент (%) образцов тканей	Референсные значения Hg, мкг/кг
Кабан	печень	89.3 % ($n = 25$)	< 30
	почка	86.2 % ($n = 25$)	< 100
Лось	печень	100 % ($n = 15$)	< 100
	почка	100 % ($n = 14$)	< 100

Корреляционный анализ показал наличие только положительных взаимосвязей между некоторыми исследуемыми показателями (рис. 1). У каба-

нов большинство связей между показателями были средней силы ($r = 0.3–0.7$), только связь между концентрациями ртути в печени и шерсти являлась сильной ($r \geq 0.7$). У лосей все отмеченные статистически значимые связи (между уровнями α-токоферола в исследуемых органах) оказались сильными ($r \geq 0.7$). Не обнаружено статистически значимых связей между концентрацией ртути и уровнями антиоксидантов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование содержания ртути в органах и шерсти двух видов копытных млекопитающих Республики Карелия показало существенные межвидовые различия в накоплении этого токсичного металла в организме. С большой долей вероятности можно утверждать, что пищевые предпочтения кабана, а именно его всеядность, послужили причиной более высокого содержания ртути в печени и мышце этого вида животных по сравнению с лосем. Рацион кабана на 80–90 % состоит из пищи, добытой из почвы, и включает растительные (культурные растения, травы, корни, кору деревьев и кустарников, ягоды), и животные корма (черви, насекомые, мелкие млекопитающие, яйца и птенцы наземногнездящихся птиц, остатки павших животных), а также грибы [34, 35]. Такая диета делает кабана подходящим животным для исследований уровней токсикантов в дикой природе. Лось относится к типичным дендрофагам, но в бесснежный период поедает много травянистых кормов. Список употребляемых лосем в пищу кормов весьма широк и в разных частях ареала составляет от 33 до 133 видов растений, лишайников и грибов [36]. Другие исследователи также отмечают, что всеядные виды по сравнению с растительноядными и хищниками накапливают больше токсичных элементов (в том числе и ртути) в своем организме [37].

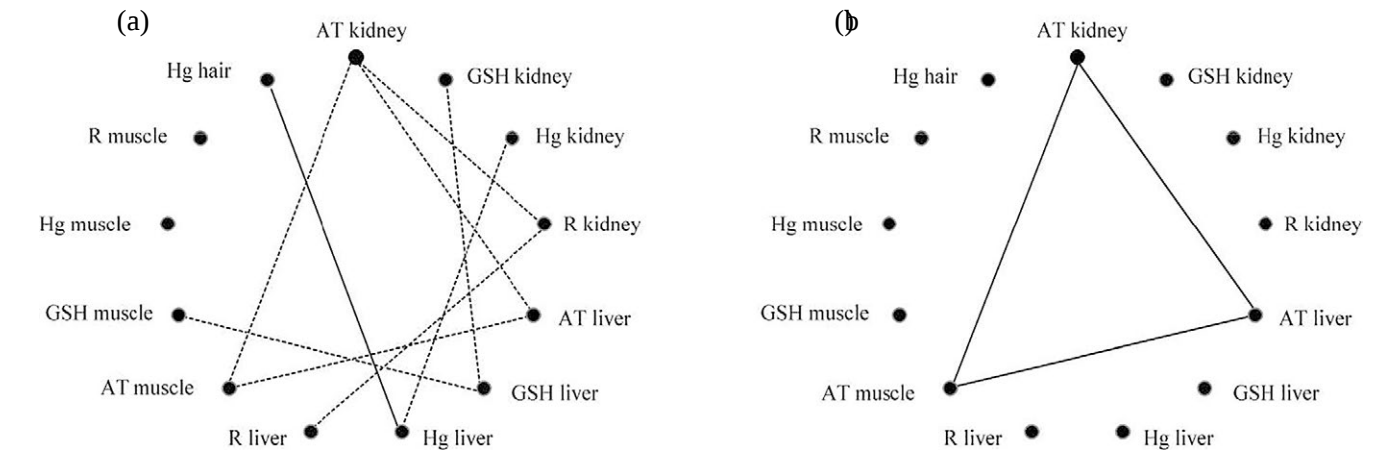


Рис. 1. Статистически значимые ($p < 0.05$) положительные корреляционные связи (критерий Спирмена) между изученными показателями у кабанов (а) и лосей (б) Республики Карелия. Показатели: AT – α-токоферол, GSH – глутатион, Hg – ртуть, R – ретинол. Биологический материал: kidney – почка, liver – печень, muscle – мышца, hair – шерсть. Сплошная линия – сильная взаимосвязь ($r \geq 0.7$) между показателями, пунктирная линия – взаимосвязь средней силы ($r = 0.3–0.7$).

Также мы отметили тканеспецифичность распределения ртути в организме исследованных животных: содержание этого металла уменьшалось в ряду почка — шерсть — печень — мышца. Подобная закономерность отмечается и другими исследователями [38]. В то время как печень является органом, отвечающим за метаболизм Hg, и индикатором кратковременного воздействия этого токсиканта на организм, именно почки наряду с ЦНС являются органами-мишенями ртути и могут накапливать неорганические формы Hg [4]. Из-за накопления ртути в почках часто наблюдается острая почечная недостаточность [4].

На сегодняшний день референсные значения концентрации Hg в организме диких копытных животных не определены, поэтому мы сравнивали полученные нами данные с данными, указанными для печени и почки домашних свиней и оленей [33]. Значения этого показателя для домашних животных могут не совпадать с уровнями металла, присутствующими в тканях диких кабанов и лосей, но такое сравнение дает некоторое представление о том, является ли уровень Hg у диких животных высоким или низким. Согласно данным [33], концентрация Hg в большинстве проб печени и почки кабанов и во всех исследуемых пробах этих же органов лосей находились в пределах оптимальных значений, зарегистрированных для свиней и оленей, соответственно.

Концентрации Hg в тканях и шерсти кабанов и лосей Карелии были сопоставимы или ниже уровней этого металла, зафиксированными у животных из других регионов России (Вологодская обл. [20, 21]; Кемеровская обл. [22]) и других стран мира [38–42]. Тем не менее у кабанов и лосей Карелии содержание Hg оказалось выше по сравнению с таковым у животных Алтая и Белгородской области [43, 44]. Также мы обнаружили положительные взаимосвязи между концентрациями Hg в печени и почке и в печени и шерсти диких кабанов Карелии.

Характерной особенностью токсичности металлов является нарушение работы ферментных систем и индукция окислительного стресса за счет генерации АФК, которые способны повреждать липиды и ДНК [6]. Активация механизмов антиоксидантной защиты организма зависит от многих факторов окружающей среды, включая загрязнение токсичными элементами. Так, предыдущие исследования выявили изменения антиоксидантов у млекопитающих и человека в ответ на окислительный стресс, вызванный Cd и Pb [9, 10]. Соединения As, Pb и Hg приводили к повышению уровня АФК, перекисного окисления липидов и активности глутатионпероксидазы, что сопровождалось снижением активности супероксиддисмутазы и каталазы и снижению концентраций окисленной и восстановленной форм глутатиона в крови и тканях крыс [45]. Введение в организм мышей соединений Hg приводило к увеличению активностей антиоксидантных ферментов

и повышению уровня GSH [46]. В организме ртуть легко и прочно связывается с сульфгидрильными (тиоловыми) группами (—SH) белков, пептидов, аминокислот и небелковых тиолов цистеина и GSH. Последний является важным антиоксидантом млекопитающих, который предотвращает повреждение клеточных структур, вызванное АФК и другими факторами, включая Hg(II) и CH₃Hg.

У кабанов и лосей Карелии статистически значимых взаимосвязей между уровнем ртути и содержанием исследуемых антиоксидантов (GSH, ретинол и токоферол) во внутренних органах обнаружено не было. По всей видимости, концентрация Hg в организме животных недостаточно высока, чтобы вызывать активацию антиоксидантной защиты внутренних органов. У диких млекопитающих Украины (кабан, косуля, заяц и лисица) уровень Hg в печени, почке и мышце также не коррелировал с уровнями антиоксидантов (активностью антиоксидантных ферментов) [38]. Восстановленная форма глутатиона (GSH) и связанные с ней ферменты считаются наиболее надежными биомаркерами окислительного стресса, лежащего в основе токсичности металлов при антропогенном загрязнении среды [6]. Другие исследователи [9, 10] обнаружили увеличение содержания GSH в печени дикого кабана из региона с высокой антропогенной нагрузкой (загрязнение свинцом). У кабанов Карелии отмечены положительные взаимосвязи умеренной силы между концентрациями GSH в печени и почке и в печени и мышце.

В нашем исследовании мы также определяли содержание витаминов-антиоксидантов α-токоферола и ретинола. Их роль в антиоксидантной защите организма наземных млекопитающих от токсичности металлов в литературе изучена слабо. У крыс предварительное добавление ретинола в пищу приводит к толерантности к гепатотоксичности Cd за счет индукции металлотионеина в печени [47]. Введение в рацион крыс витамина Е предотвращало и смягчало последствия токсического воздействия Pb на структуру и функцию почек [48]. Ранее были обнаружены [9, 10] изменения в статусе витаминов А и Е у диких кабанов из зоны добычи Pb. У животных наблюдалось значительное снижение содержания ретинилстеарата в печени, повышение уровня свободного ретинола и отрицательная взаимосвязь между α-токоферолом в печени и Pb в костях.

Лоси Карелии характеризовались более высоким содержанием α-токоферола в организме, чем кабаны. По всей вероятности, это является особенностью данного вида растительноядных копытных млекопитающих [49], которые получают витамин Е, поедая растения, в частности их зеленые части, богатые α-токоферолом. Лабильный пул витамина Е имеется в плазме и печени; депонируется витамин в жировой ткани [50]. Дефицит витамина Е (совместно с дефицитом селена) приводит к феталь-

ной смертности и абортam, а также к беломышечной болезни. У лосей Карелии мы обнаружили сильные взаимосвязи между концентрациями α -токоферола в исследованных органах, у кабанов эти связи были умеренной силы. Выявленные взаимосвязи, очевидно, свидетельствуют об адекватном поступлении витамина Е с пищей. Печень является основным органом, который регулирует гомеостаз витамина Е в организме и обеспечивает потребность периферических органов и тканей в этом витамине [51].

Отмечают, что α -токоферол может действовать как регулятор активности некоторых антиоксидантных ферментов [52], витамин обладает выраженным синергетическим действием с ретинолом и улучшает его доступность для организма животных [9, 10, 53]. Антиоксидантные свойства α -токоферола сохраняют целостность молекул ретинола и каротина от окислительного разрушения на разных стадиях их метаболизма в организме животных. Вероятно, поэтому у кабанов Карелии мы выявили взаимосвязь между уровнями ретинола и токоферола в почке. Возраст дикого кабана оказался значимым фактором, влияющим на содержание ретинола в печени этого вида животных. Аналогичные результаты были получены ранее на нескольких видах птиц и млекопитающих [54]. Печень играет важную роль в гомеостазе витамина А в качестве основного органа депонирования этого витамина и биотрансформации ретиноидов. Ретинол является метаболически активной формой витамина А, а его возрастное накопление в печени кабанов отражает достаточное поступление этого витамина с пищей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании мы ставили перед собой цель сравнить концентрацию ртути в организме двух видов копытных млекопитающих Республики Карелия и проанализировать взаимосвязи между уровнем этого токсичного металла и содержанием некоторых антиоксидантов — глутатиона, ретинола и α -токоферола. Подобных исследований на объектах наземных экосистем ранее не проводилось. Обнаружены видовые и тканеспецифичные особенности изученных показателей у кабанов и лосей. Концентрация ртути в большинстве проб печени и почки кабанов и во всех исследуемых пробах этих же органов лосей находились в пределах оптимальных значений, зарегистрированных для домашних свиней и оленей, соответственно. Зафиксированные нами уровни ртути в тканях и шерсти карельских кабанов и лосей, в основном, были сопоставимы или ниже уровней, отмеченных у животных из других регионов России и других стран мира. У кабанов и лосей Карелии статистически значимых взаимосвязей между уровнем ртути и содержанием исследуемых низкомолекулярных антиоксидантов во внутренних органах обна-

ружено не было. По всей видимости, концентрация ртути в организме животных недостаточно высока, чтобы вызывать активацию антиоксидантной защиты внутренних органов. Лоси характеризовались более высоким содержанием α -токоферола в организме, чем кабаны, что обусловлено особенностями питания данного вида растительноядных копытных млекопитающих. Результаты исследования могут свидетельствовать об относительно низком уровне загрязнения ртутью наземных экосистем Карелии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Для данного исследования не требовалось одобрения биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН, поскольку биологический материал был получен от животных, добытых в результате легальной охоты, сроки которой были определены в соответствии с Приказом Минприроды России (от 16.11.2010 № 512 “Об утверждении Правил охоты”), Указом главы Республики Карелия (от 20.09.2012 № 122 “Об определении параметров осуществления охоты в охотничьих угодьях на территории Республики Карелия, за исключением особо охраняемых природных территорий федерального значения”). Животные были застрелены охотниками во время охотничьих сезонов 2017–2022 гг.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-10001, <https://rscf.ru/project/23-24-10001/>, проводимый совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК)).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Н.К., В.А.И.), сбор биоматериала (Д.В.П.), проведение лабораторных анализов и обработка данных (все авторы), написание манускрипта (С.Н.К., В.А.И.) и его редактирование (все авторы).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Минприроды Республики Карелия М.Ю. Шилиеву и И.А. Бердникову за содействие в сборе биоматериала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO (2017) Ten chemicals of major health concern. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/index.html

2. *Kalisińska E* (ed.) (2019) Mammals and birds as bioindicators of trace element contaminations in terrestrial environments: an ecotoxicological assessment of the Northern Hemisphere. — Springer.
3. *Gworek B, Dmuchowski W, Baczevska-Dąbrowska AH* (2020) Mercury in the terrestrial environment: A review. *Environ Sci Eur* 32(1): 1–19.
<https://doi.org/10.1186/s12302-020-00401-x>
4. *UKHSA* (2022) Elemental Mercury and Inorganic Mercury: Toxicological Overview.
<https://www.gov.uk/government/publications/mercury-properties-incident-management-and-toxicology/elemental-mercury-and-inorganic-mercury-toxicological-overview#ref4>
5. *Scheuhammer AM, Meyer MW, Sandheinrich MB, Murray MW* (2007) Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. *Ambio* 36:12–17.
[https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2007\)36\[12:EOEMOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36[12:EOEMOT]2.0.CO;2)
6. *Isaksson C* (2010) Pollution and its impact on wild animals: a meta-analysis on oxidative stress. *EcoHealth* 7(3):342–350.
<https://doi.org/10.1007/s10393-010-0345-7>
7. *Lushchak VI* (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicol* 101(1):13–30.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
8. *Defo MA, Pierron F, Spear PA, Bernatchez L, Campbell PGC, Couture P* (2012) Evidence for metabolic imbalance of vitamin A2 in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicol Environ Safety* 85:88–95.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.017>
9. *Rodríguez-Estival J, Martínez-Haro M, Monsalve-González L, Mateo R* (2011) Interactions between endogenous and dietary antioxidants against Pb-induced oxidative stress in wild ungulates from a Pb polluted mining area. *Sci Total Environ* 409:2725–2733.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.010>
10. *Rodríguez-Estival J, Taggart MA, Mateo R* (2011) Alterations in vitamin A and E levels in liver and testis of wild ungulates from a lead mining area. *Arch Environ Contam Toxicol* 60(2):361–371.
<https://doi.org/10.1007/s00244-010-9597-z>
11. *Engin KN* (2009) Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vision* 15:855.
12. *Peraza AM, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael L* (1998) Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Persp* 106:(Suppl.1):1–27.
<https://doi.org/10.1289/ehp.98106s1203>
13. *Debiec C, Larondelle Y* (2005) Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr* 93:153–174.
<https://doi.org/10.1079/BJN20041308>
14. *Alpsoy L, Yildirim A, Agar G* (2009) The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicol Industr Health* 25:121–127.
<https://doi.org/10.1177/0748233709103413>
15. *Pereira AA, van Hattum B, Brouwer A* (2012) Hepatic retinoid levels in seven fish species (teleosts) from a tropical coastal lagoon receiving effluents from iron-ore mining and processing. *Environment Toxicol Chem* 31:408–416.
<https://doi.org/10.1002/etc.740>
16. *Wayland M, Smits JEG, Gilchrist HG, Marchant T, Keating J* (2003) Biomarker responses in nesting, common eiders in the Canadian arctic in relation to tissue cadmium, mercury and selenium concentrations. *Ecotoxicol* 12:225–237.
<https://doi.org/10.1023/A:1022506927708>
17. *Lavoie RA, Jardine TD, Chumchal MM, Kidd KA, Campbell LM* (2013) Biomagnification of mercury in aquatic food webs: a worldwide meta-analysis. *Environ Sci Technol* 47(23):13385–13394.
<https://doi.org/10.1021/es403103t>
18. *Zillioux EJ, Porcella DB, Benoit JM* (1993) Mercury cycling and effects in freshwater wetland ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 12:2245–2264.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620121208>
19. *Medvedev N* (1999) Levels of heavy metals in Karelian wildlife, 1989–91. *Environ Monit Assess* 56:177–193.
<https://doi.org/10.1023/A:1005988511058>
20. *Eltsova L, Ivanova E* (2021) Total mercury level in tissues of commercial mammalian species (wild boar, moose) of the Russky Sever National Park (North-West of Russia). In *E3S Web of Conferences* (Vol. 265, p. 05009). EDP Sciences
21. *Степанова ИК, Комов ВТ* (1996) Ртуть в абиотических и биотических компонентах озер Северо-Запада России. *Экология* 3:198–203. [*Stepanova IK, Komov VT* (1996) Mercury in abiotic and biotic components of lakes in Northwestern Russia. *Ecology* 3:198–203. (In Russ)].
22. *Prosekov AY, Altshuler OG, Kurbanova MG* (2021) Quality and Safety of Game Meat from the Biocenosis of the Be-loosipovo Mercury Deposit (part 2). *Food Proc: Techniq Technol* 51(4):654–663.
<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-654-663>
23. *Горбунов АВ, Ляпунов СМ, Ермолаев БВ* (2019) Распределение ртути в природных и урбанизированных средах Карелии. *Экология человека* 4:10–17. [*Gorbunov AV, Lyapunov SM, Yermolaev BV* (2019) Distribution of mercury in natural and urban environments of Karelia. *Hum Ecol* 4:10–17. (In Russ)].
24. *Немова НН* (2005) Биохимическая адаптация накопления ртути у рыб. М.: Наука, 164 с. [*Nemova NN* (2005) Biochemical adaptation of mercury accumulation in fish. М.: Nauka, 164 p. (In Russ)].
25. *Zaitseva IA, Baishnikova IV, Panchenko DV, Kalinina SN, Ilyina TN, Antonova EP* (2023) The Content of Retinol, α-Tocopherol and Glutathione in Tissues of the Wild Boar (*Sus scrofa* L.) Inhabiting the Northwest of Russia. *J Evol Biochem Physiol* 59(3):744–755.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023030092>
26. *Matschke GH* (1967) Aging European wild hogs by dentition. *J Wildl Manag* 31(1):109–113.
27. *Moore CD, Fahlman A, Crocker DE, Robbins KA, Trumble SJ* (2015) The degradation of proteins in pinniped skeletal muscle: viability of post-mortem tissue in physiological research. *Conserv Physiol* 3(1):1–8.
<https://doi.org/10.1093/conphys/cov019>
28. *Назаренко ИИ, Кислосева ИВ, Кашина ЛИ* (1986) Атомно-адсорбционное определение ртути в водах после сорбционного концентрирования на полимерном тизеофоре. *Журн аналитич хим* 11(8):1385–1390. [*Nazarenko II, Kisloeva IV, Kashina LI* (1986) Atomic adsorption determination of mercury in waters after sorption

- concentration on a polymer thioether. *J Analytical Chem* 11(8):1385–1390. (In Russ)].
29. Скурихин ВН, Двинская ЛМ (1989) Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сельскохозяйственная биология* 4:127–129. [Skurihin VN, Dvinskaya LM (1989) Determination of α -tocopherol and retinol in the blood plasma of farm animals using microcolumn high-performance liquid chromatography. *Agricult Biol* 4:127–129. (In Russ)].
 30. Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–205
 31. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randan RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275.
 32. Унгуряну ТН, Гржибовский АМ (2011) Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях. *Экология человека* 5:55–60. [Unguryanu TN, Grzhibovskii AM (2011) Brief recommendations for the description, statistical analysis and presentation of data in scientific publications. *Hum Ecol* 5:55–60. (In Russ)].
 33. Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory (WVDL) (2015) Normal range values for WVDL Toxicology.
 34. Данилов ПИ (2017) Охотничьи звери Карелии (экология, ресурсы, управление, охрана). Петрозаводск: Карельский научный центр, 388 с. [Danilov PI (2017) Game animals of Karelia (ecology, resources, management, protection). Petrozavodsk: Karel Sci Centr, 388 p. (In Russ)].
 35. Ballari SA, Barrios-García MN (2014) A review of wild boar (*Sus scrofa*) diet and factors affecting food selection in native and introduced ranges. *Mammal Rev* 44(2):124–134. <https://doi.org/10.1111/mam.12015>
 36. Филонов КП (1983) Лось. М.: “Лесная промышленность”, 248 с. [Filonov KP (1983) Moose. М.: “Lesnaya promyshlennost”, 248 s. (In Russ.)]
 37. Squadrone S, Robetto S, Orusa R, Griglione A, Falsetti S, Paola B, Abete MC (2022) Wildlife hair as bioindicators of metal exposure. *Biol Trace Elem Res* 200(12):5073–5080. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03074-6>
 38. Tomza-Marciniak A, Pilarczyk B, Drozd R, Pilarczyk R, Juszcak-Czasnojć M, Havryliak V, Podlasinska J, Udała J (2023) Selenium and mercury concentrations, Se: Hg molar ratios and their effect on the antioxidant system in wild mammals. *Environment Pollut* 322:121234. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121234>
 39. Lazarus M, Crnić AP, Bilandžić N, Kusak J, Reljić S (2014) Cadmium, lead and mercury exposure assessment among Croatian consumers of free-living game. *Archiv Industr Hygien Toxicol* 65(3). <https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2527>
 40. Piskorová L, Vasilková Z, Krupicer I (2003) Heavy Metal Residues in Tissues of Wild Boar (*Sus scrofa*) and Red Fox (*Vulpes vulpes*) in the Central Zemplin Region of the Slovak Republic. *Czech J Anim Sci* 48:134–138.
 41. Demirbaş Y, Erduran N (2017) Concentration of selected heavy metals in brown hare (*Lepus europaeus*) and wild boar (*Sus scrofa*) from central Turkey. *Balk J Wildl Res* 4:26–33. <https://doi.org/10.15679/bjwr.v4i2.54>
 42. Bilandžić N, Sedak M, Dokic M, Simic A (2010) Heavy Metal Concentrations in Tissues of Wild Boar of Continental Croatia. *Int J Environ Protect* 2:6–9.
 43. Бондарев АЯ (2012) Токсиканты в организмах волка и некоторых других млекопитающих Алтайского края. Вестник Алтайского государственного аграрного университета 91(5):44–49. [Bondarev AY (2012) Toxicants in the organisms of the wolf and some other mammals of the Altai Territory. *Bull Altai State Agr Univ* 91(5):44–49. (In Russ)].
 44. Курченко ГА (2002) Оценка содержания ртути в органах животных и окружающей среде [Белгородская обл.]. Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал 1:5–5. [Kurchenko GA (2002) Assessment of mercury content in animal organs and the environment [Belgorod region]. *Environment Saf Agricult. Abstract J* 1:5–5. (In Russ.)]
 45. Agrawal S, Flora G, Bhatnagar P, Flora SJS (2014) Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell Mol Biol* 60(2):13–21. <http://cellmolbiol.org/index.php/CMB/article/view/530>
 46. Hussain S, Atkinson A, Thompson SJ, Khan AT (1999) Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J Environ Sci Health B34(4):645–660*. <https://doi.org/10.1080/03601239909373219>
 47. Sauer JM, Waalkes MP, Hooser SB, Baines AT, Kuester RK, Sipes IG (1997) Tolerance induced by all-trans-retinol to the hepatotoxic effects of cadmium in rats: role of metallothionein expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 143(1):110–119. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8050>
 48. Alasia D, Etem-Chioma P, Ojeka S (2020) An evaluation of the mitigating effects of α -tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C) on the renal function and histology of adult male albino Wistar rats with sub-acute lead acetate exposure. *Occup Dis Environ Med* 8:35–49. <https://doi.org/10.4236/odem.2020.82003>
 49. Ильина ТН, Руоколайнен ТР, Белкин ВВ, Баишниковая ИВ (2011) Токоферол в физиологических адаптациях млекопитающих различного экогенеза. Труды Карельского научного центра РАН 3:49–56. [Irina TN, Ruokolainen TR, Belkin VV, Baishnikova IV (2011) Tokoferol v fiziologicheskikh adaptatsiyah mlekopitayushchih razlichnogo ekogeneza [Tocopherol in physiological adaptations of mammals of different ecogenesis]. *Proc Karelian Sci Center RAS* 3:49–56. (In Russ.)]
 50. Combs Jr GF, McClung JP (2016) The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Academic press.
 51. Traber MG (2013) Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res* 54:2295–2306. <https://doi.org/10.1194/jlr.R032946>

52. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S (2004) The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 10:1677–1694.
<https://doi.org/10.2174/1381612043384655>
53. Tesoriere L, Bongiorno A, Pintaudi AM, D'Anna R, D'Arpa D, Livrea MA (1996) Synergistic interactions between vitamin A and vitamin E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes. *Arch Biochem Bioph* 326(1):57–63.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0046>
54. Majchrzak D, Fabian E, Elmadfa I (2006) Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. *Food Chem* 98(4):704–710.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.035>

THE MERCURY AND LOW MOLECULAR-WEIGHT ANTIOXIDANTS LEVELS IN UNGULATES OF THE REPUBLIC OF KARELIA

S. N. Kalinina^{a, #}, V. A. Ilyukha, V. T. Komov^b, I. A. Zaitseva^a,
I. V. Baishnikova^a, D. V. Panchenko^a and E. P. Antonova^a

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

^b Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, Borok, Russia

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

The high toxicity of mercury (Hg) poses a danger to the environment and humans, but studies of the concentration of this metal in organisms of terrestrial ecosystems are few. Ecotoxicologists also pay little attention to studying the role of antioxidant vitamins in protecting cells from toxic metals. The Republic of Karelia is one of the northwestern regions of Russia, the biogeochemical features of which can contribute to an increase in the mobility and bioavailability of Hg in food chains. The purpose of the work was to determine the concentration of Hg in the liver, kidneys, muscle and hair of ungulate mammals of the Republic of Karelia (wild boar *Sus scrofa* L. and moose *Alces alces* L.) and to analyze the relationship between the level of this toxic metal and the content of low molecular-weight antioxidants – reduced glutathione, retinol and α -tocopherol. Species and tissue-specific of the studied parameters in wild boars and moose are noted. The observations discovered by other researchers that omnivorous species accumulate more Hg in their tissues compared to herbivores, and also that this toxic metal is predominantly accumulated in the kidneys, while muscles contain a minimal amount, have been confirmed. Hg concentrations in most samples of liver and kidney of wild boars and in all samples of these same organs of moose were within the limits recorded for domestic pigs and deer, respectively. The levels of Hg we recorded in the tissues and hair of wild boars and moose were generally comparable to or lower than the levels of this metal noted in animals from other regions of Russia and other countries of the world. In wild boars and moose of Karelia, no statistically significant relationships were found between the Hg level and the content of the studied antioxidants in the internal organs. Moose were characterized by a higher content of α -tocopherol in the body than wild boars, which is a feature of this type of herbivorous ungulate mammal. The results of the study indicate a relatively low level of mercury pollution in terrestrial ecosystems in Karelia.

Keywords: toxicity, mercury, retinol, α -tocopherol, glutathione, wild boar, moose

САМКИ МЫШЕЙ BALB/С ПРЕДПОЧИТАЮТ ЗАПАХ ПАРТНЕРОВ, ОТ КОТОРЫХ РОЖДАЕТСЯ МЕНЬШЕ ПОТОМКОВ

©2024 г. А. С. Хоцкина^{1,*}, Ю. В. Патрушев², Д. И. Юсупова¹, Л. А. Герлинская¹, С. О. Масленникова¹, Д. В. Петровский¹, М. П. Мошкин¹, Е. Л. Завьялов¹

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр “Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 06.02.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 17.03.2024 г.

Выбор партнера является одним из чрезвычайно важных этапов полового отбора. Свободный выбор партнера, как правило, обеспечивает рождение наиболее жизнеспособного потомства. Так, в опытах на разных видах животных установлено, что выживаемость от момента рождения до достижения половой зрелости существенно выше у особей, рожденных при скрещивании в соответствии со свободным поведенческим выбором партнера, по сравнению с таковой при скрещивании вопреки выбору. Совершая свой выбор, самка может опираться на визуальные, слуховые или обонятельные сигналы. Но в настоящий момент в экспериментах с оценкой полового выбора используют взаимодействие с животным, а не с отдельными его сигналами, что не позволяет определить конкретный вклад каждого из них. Известно, что для грызунов решающую роль во внутривидовых взаимодействиях играет запах. По запаху особи способны распознать пол, репродуктивный статус, генотип, диету, а также состояние здоровья конспецифика. На данный момент крайне мало работ связывают конкретные сигналы, исходящие от самца, с информацией о его отцовских эффектах. В своей работе мы оценили репродуктивный выход самцов, имевших возможность спаривания с двумя самками, по числу живых эмбрионов, их массе и массе их плацент. Затем летучую фракцию мочи этих самцов оценивали наивные самки в ольфакторных тестах. Образцы мочи самцов также были проанализированы при помощи хромато-масс-спектрометрического анализа. Оказалось, что наивные самки линии BALB/с предпочитают самцов, беременность от которых являлась малопродуктивной, по сравнению с самцами, беременность от которых являлась многоплодной. Возможность различить данные группы самцов была подтверждена инструментальным методом анализа. В то же время самки линии C57BL/6 не различали данные группы самцов. Другие параметры беременности не влияли на предпочтения самками мочи самцов.

Ключевые слова: ольфакторное предпочтение полового партнера, ольфакторный тест, линия мышей BALB/с, линия мышей C57BL/6

DOI: 10.31857/S0044452924030036, **EDN:** YXТОКС

ВВЕДЕНИЕ

Выбор партнера является одним из чрезвычайно важных этапов полового отбора, который необходим для поддержания внутривидовой морфофункциональной изменчивости и устойчивого существования вида в постоянно меняющейся среде обитания [1]. Свободный выбор партнера, как правило, обеспечивает рождение наиболее жизнеспособного потомства. Так, в опытах с участием разных видов животных было установлено, что выживаемость в неонатальный и постнатальный периоды значительно выше у особей, рожденных при спаривании в соответствии со свободным поведенческим выбором полового партнера, по сравнению с размножением с ограничением или отсутствием выбора [2–4].

Вклад самца в эти процессы ранее теоретически ограничивался лишь передачей “хороших генов”, либо генетической совместимостью с материнским организмом, как, например, в случае с генами главного комплекса гистосовместимости (МНС – main histocompatibility complex) [5]. В последнее десятилетие появилось большое количество исследований, которые демонстрируют, что не только генотип самца может оказывать влияние на потомков [6, 7]. Отмеченные в работах отцовские эффекты, а именно – процессы, происходящие во взрослом отцовском организме, которые влияют на состояние потомков, могут быть реализованы разными путями: через состав спермальной жидкости [6], через эпигенетические модификации генома гамет [8, 9], через активаци-

цию сигналами самца физиологических процессов в организме матери, влияющих на ход беременности и заботу о потомстве [10, 11]. Влияние онтогенеза самца на его потомство объясняет наличие отцовских эффектов даже у генетически идентичных животных [7, 12, 13].

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что выбор самкой полового партнера имеет селективный характер, и ключевую роль в этом процессе играют физиологические механизмы дистанционной рецепции [11, 14]. В зависимости от таксономической принадлежности и видоспецифического образа жизни самки используют зрительные, слуховые или обонятельные анализаторы при выборе генетически комплементарного, либо наиболее адаптированного к конкретным условиям окружающей среды полового партнера [15]. Однако было установлено, что у большинства видов грызунов в качестве важнейшего сигнального фактора все же выступает запах [14]. Согласно Clutton-Brock, репродуктивный успех — это количество копий генов, переданных следующему поколению, которое также способно к размножению [16]. Репродуктивный успех самца во многом определяется его способностью владеть ключевыми ресурсами среды обитания, включая корм, убежища и живущих на контролируемой им территории самок, которые, как правило, имеют меньшие, чем самцы, индивидуальные участки [17]. Так, самки лабораторных мышей [18], а также рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) демонстрируют большее предпочтение по отношению к доминантным самцам, основывая свой выбор именно на запахе мочи [19], при помощи которой самцы активно метят ареал своего обитания. На данный момент опубликованы десятки работ, устанавливающих связь между физиологическими характеристиками самца и компонентным составом его мочи [20–23]. При этом связь состава мочи и репродуктивных характеристик самца остается практически не изученной.

В данной работе мы задались целью связать показатели предпочтения самками мочевых меток самцов с характеристиками потомства, рожденного от тестируемых самцов. Для исключения влияния индивидуального генотипа животных на предпочтения полового партнера работа выполнена только с использованием инбредных линий лабораторных мышей BALB/с и C57BL/6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание животных

Исследование выполнено на базе ЦКП SPF-ви-варий ИЦиГ СО РАН. В данной работе были использованы самцы и самки линий мышей BALB/с и C57BL/6 в возрасте 8–10 недель на момент начала исследования. Животных содержали в индиви-

дуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, США) группами по 2–5 особей до начала экспериментов при свободном доступе к воде и гранулированному корму для мышей (“Чара”, Павлов-Посад), искусственном фотопериоде 14С:10Т, температуре 22–24 °С и относительной влажности 30–70 %. В качестве подстилочного материала использовали березовые гранулы (ООО “Альбион”, Новосибирск). Корм и подстилочный материал поступали к животным после стерилизации методом автоклавирования при 121 °С. Воду очищали при помощи фильтрационной системы Millipore. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям межинститутской биоэтической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН, протокол 8 от 19.03.2012.

Схема эксперимента

К 26 самцам линии BALB/с и 26 самцам линии C57BL/6, которые содержались одиночно в клетке, подсаживали по 2 интактные самки соответствующей линии для установления репродуктивных качеств исследуемых самцов. Покрытых самок сразу же отсаживали от самца и содержали одиночно до 16 суток беременности, затем проводили эвтаназию и некропсию (определяли количество плодов, их массу и массу их плацент). Покрытие самки определяли по наличию вагинальной пробки.

Сбор образцов мочи самцов для проведения ольфакторных тестов и хроматографического анализа, проводили после каждого обнаруженного покрытия. Самцов помещали на чашку Петри, выделение мочи при отсутствии мочеиспускания стимулировали путем поглаживания в нижней части живота. Все собранные образцы незамедлительно замораживали и хранили при температуре –80 °С в течение 4–6 недель до последующего тестирования.

Оценка репродуктивного выхода

За 6 дней совместного содержания с двумя самками 25 из 26 самцов BALB/с совершили покрытия, у 17 из этих самцов они привели к беременности самок (11 самцов оплодотворили одну, и 6 самцов — двух самок). Самцов разбили на группы — с маленькими и большими пометами, вычисляя медианное значение среди полученных размеров помета. У двух самцов, покрывших две самки, показатель одной из них был меньше медианного значения, а у другой — больше медианного. Оба самца при расчетах были определены в группу с большими пометами.

Из 26 самцов линии C57BL/6 20 совершили покрытия, 11 из которых завершились беременностью. У всех этих самцов только одна самка имела потомство.

Проведение ольфакторного тестирования

В ольфакторном тестировании были задействованы 36 самок линии BALB/c и 48 самок C57BL/6. За сутки до тестирования самок рассаживали по индивидуальным клеткам.

Тестируемую мочу самцов размораживали в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее подготавливали стимул: нанесли на фильтровальную бумагу размером 5 мм × 30 мм 20 мкл мочи и помещали в усеченный на 5 мм наконечник для автоматической пипетки объемом 1 мл. Верх наконечника закрывали плотным шариком из ваты. Данные манипуляции проводили для того, чтобы у самки не было прямого доступа к моче: таким образом, самка могла анализировать только летучие соединения мочи. Самки исследовали мочу самцов только своей линией.

Стимулы помещали в углу домашней клетки животного, на расстоянии по 5 см от ближайших сторон клетки, закрепляя прищепками на крышке клетки таким образом, чтобы мышь могла дотянуться до кончика для обнюхивания. Тестирование проводили в течение 10 минут, в темную фазу при красном освещении, результаты записывали на видеокамеру. Каждый стимул предъявляли трем разным самкам для увеличения надежности получаемых статистических данных. Одна самка исследовала только один стимул и участвовала в тестировании только один раз. В поведении самки анализировали общее количество подходов и общее время обнюхивания стимула.

Сразу после каждого ольфакторного тестирования у самок определяли стадию эстрального цикла [24], так как известно, что стадия цикла самки может оказать влияние на ее поведение в ольфакторных тестах [11]. Полученные данные нормировали, вычитая из количества подходов каждой самки среднегрупповое значение количества подходов, рассчитанное для каждой из 4 стадий цикла и прибавляя среднее, рассчитанное без учета стадии цикла. Аналогичное преобразование проводили для времени обнюхивания.

Газовая хроматография и масс-спектрометрия

Хромато-масс-спектрометрическим анализом исследовали 35 проб мочи и 8 проб воздуха в помещении. Для концентрирования пробы использовали трубку – концентратор из нержавеющей стали с сорбентом Tenax TA. Пробу объемом 20 мкл переносили в стеклянную вials, объемом 4 мл и продували

аргоном с объемной скоростью 40 мл/мин при температуре 60°C. Поток аргона с парами пробы через кварцевый капилляр подавался в трубку-концентратор, где происходила адсорбция компонентов пробы на сорбенте концентратора. Время адсорбции – 20 мин. Температура сорбции – 25°C. Для ввода пробы в хроматографическую колонку использовали термодесорбер UNITY Series2 (Markes), температура десорбции – 250°C.

Хроматографирование проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A GC с колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки НЖФ 0.25 мм. Условия: 3 мин при температуре 40°C, затем повышение температуры со скоростью 7°/мин до 250°C. В качестве детектора использовали масс-спектрометр Agilent 7000 Series Triple Quadrupole GC/MS. Полученные масс-спектры веществ сопоставляли с базой данных NIST08 программой библиотечного поиска MassHunter.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных был выполнен с использованием пакета STATISTICA 6.0. Для выбора используемых статистических методов устанавливали нормальность распределения признаков по критерию Колмогорова–Смирнова. Для обработки данных ольфакторного тестирования использовали анализ повторяющихся образцов Repeated Measure ANOVA, вычисляли мощность полученных критериев (1-β). Попарное сравнение исследуемых групп проводили при помощи критерия Тьюки (HSD-тест).

При анализе отдельных летучих органических соединений (ЛОС) мочи самцов использовали ANOVA и коэффициент корреляции Пирсона. Для интегральной характеристики паттернов ЛОС число исходных переменных было уменьшено с помощью дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (PLS-DA), который широко используется в биологических и медицинских исследованиях, поскольку позволяет максимизировать разделение между группами наблюдения [25]. PLS-DA строит модель линейной регрессии, проецируя переменные в новое пространство, где Y является категориальной переменной [26]. Затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ со значениями Y в качестве зависимой переменной, чтобы оценить распределение экспериментальных групп в пространстве осей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хроматографический анализ образцов мочи

Индивидуальные хроматограммы мочи интактных самцов насчитывали от 34 до 55 пиков (рис. 1). В общей сложности удалось зафиксировать 81 уникальный пик. Часть соединений, будучи продуктами

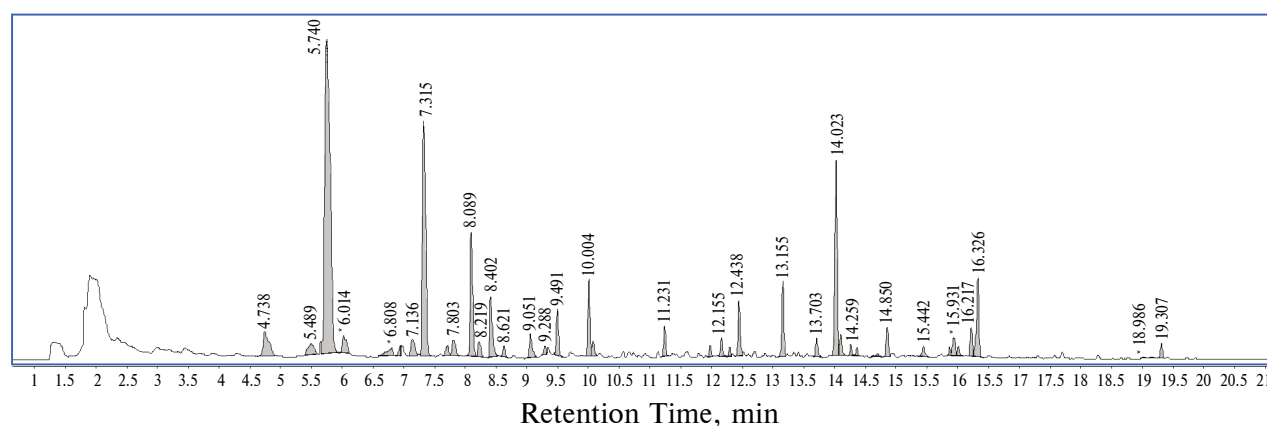


Рис. 1. Пример хроматограммы мочи самца линии BALB/c.

обмена веществ не только мышей, присутствовали в воздухе лабораторных помещений и также детектировались хроматографом, поэтому из дальнейших расчетов были исключены соединения, площадь пиков которых в моче обеих исследуемых линий, не превышала таковые в пробах воздуха. Всего для дальнейших расчетов было выделено 32 пика.

Хроматографические профили отдельных животных совпадали на 88 % у самцов линии BALB/c (индивидуальные корреляции пиков $0.939 < r < 0.998$) и на 70 % у самцов линии C57BL/6 (индивидуальные корреляции пиков $0.839 < r < 0.997$).

Масс-спектрометрический анализ проводили для всех пиков для каждого исследуемого образца. Из 32 выбранных соединений 30 пиков были полностью идентифицированы, в том числе были обнаружены два феромона самцов мышей: SBT и экзобревиомин. При исследовании образцов мочи самцов разных линий были обнаружены компоненты, детектируемые только у одной из исследуемых линий животных. Так, декан, ундекан и додекан присутствовали в моче самцов только линий мышей BALB/c, тогда как 1-[2-(2-метокси-1-метилэтоксигрупп)-1-метилэтоксигрупп]-пропан-2-ол и его стереоизомер были обнаружены в моче самцов только линии C57BL/6. Среди веществ, детектируемых у обеих линий, моча самцов различалась по содержанию 9 компонентов: нонан ($F_{(1, 33)} = 19.52$, $p = 0.000$, $1 - \beta = 0.99$), диметилсульфон ($F_{(1, 33)} = 28.81$, $p = 0.000$, $1 - \beta = 0.99$), 1-этил-3-метил-бензол ($F_{(1, 33)} = 4.40$, $p = 0.04$, $1 - \beta = 0.53$), декан ($F_{(1, 33)} = 7.60$, $p = 0.01$, $1 - \beta = 0.76$), экзобревиомин ($F_{(1, 33)} = 46.87$, $p = 0.000$, $1 - \beta = 0.99$), ацетофенон ($F_{(1, 33)} = 9.76$, $p = 0.004$, $1 - \beta = 0.86$), о-толуидин ($F_{(1, 33)} = 19.06$, $p = 0.000$, $1 - \beta = 0.99$), α , α -диметил бензоламетанол ($F_{(1, 33)} = 5.32$, $p = 0.03$, $1 - \beta = 0.61$), N-фенил-формамид ($F_{(1, 33)} = 10.91$, $p = 0.002$, $1 - \beta = 0.89$). Примечательно, что известный феромон — экзобревиомин, а также 1-этил-3-метил-бензол, α , α -диметил бензо-

ламетанол, декан и N-фенил-формамид были обнаружены в большем количестве в моче самцов линии BALB/c, тогда как количество остальных 4 соединений было большее в моче самцов C57BL/6.

Для дальнейшего анализа животные были разбиты по медианному значению каждого из репродуктивных показателей. По количеству эмбрионов были сформированы две группы самцов — имеющих “маленькие пометы” (у линии C57BL/6 от 1 до 6 эмбрионов, у линии BALB/c — от 1 до 5 эмбрионов) и “большие пометы” (у линии C57BL/6 от 7 до 10 эмбрионов, у линии BALB/c — от 6 до 9 эмбрионов). В группу “маленькая масса” линии C57BL/6 попали пометы со средней массой эмбриона от 541 мг до 615 мг, для линии BALB/c — от 434 мг до 482 мг, а в группу “большая масса” линии C57BL/6 — от 615 мг до 843 мг, для линии BALB/c — от 482 мг до 607 мг. Средняя масса плаценты на 16 сутки беременности также различалась между линиями мышей. В группу “маленькая масса плаценты” линии C57BL/6 попали пометы со средней массой плацент от 97 мг до 112 мг, для линии BALB/c — от 122 мг до 132 мг, а в группу “большая масса плаценты” линии C57BL/6 — от 112 мг до 134 мг, для линии BALB/c — от 132 до 157 мг.

Известно, что некоторые физиологические состояния могут быть закодированы относительным содержанием нескольких компонентов [21]. Для установления возможности разделения выбранных групп самцов по общей композиции соединений их мочи был использован метод PLS DA по всем 32 детектированным компонентам. HSD-тест не выявил значимых различий между самцами C57BL/6, отличающимися размером помета (Y1: $p = 0.94$; Y2: $p = 0.96$; Y3: $p = 0.17$). При этом различия между компонентами мочи у самцов BALB/c (Y1: $p = 0.95$; Y2: $p = 0.03$; Y3: $p = 0.99$) были зарегистрированы по второй компоненте (рис. 2а). При анализе различий между компонентами мочи самцов, имеющими разную мас-

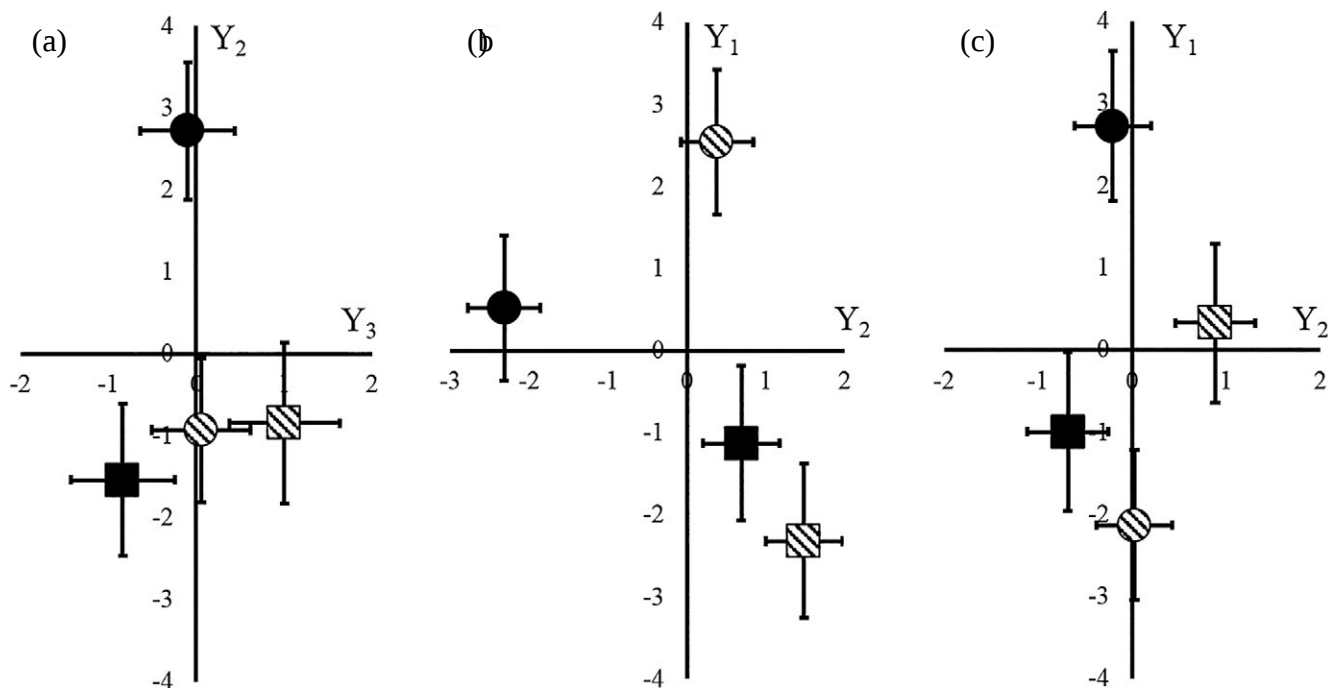


Рис. 2. Распределение индивидуальных паттернов ЛОС самцов в пространстве осей PLS. (а): заполненный квадрат – самцы C57BL/6 с маленькими пометами, квадрат со штриховкой – самцы C57BL/6 с большими пометами, заполненный круг – самцы BALB/c с маленькими пометами, круг со штриховкой – самцы BALB/c с большими пометами. (б): заполненный квадрат – самцы C57BL/6 с маленькой массой плодов, квадрат со штриховкой – самцы C57BL/6 с большой массой плодов, заполненный круг – самцы BALB/c с маленькой массой плодов, круг со штриховкой – самцы BALB/c с большой массой плодов. (с): заполненный квадрат – самцы C57BL/6 с маленькой массой плацент у плодов, квадрат со штриховкой – самцы C57BL/6 с большой массой плацент у плодов, заполненный круг – самцы BALB/c с маленькой массой плацент у плодов, круг со штриховкой – самцы BALB/c с большой массой плацент у плодов.

су эмбрионов в потомстве сравнение при помощи HSD-теста показало отсутствие различий между самцами линии C57BL/6 по всем трем компонентам (Y1: $p=0.83$; Y2: $p=0.72$; Y3: $p=0.37$). Для самцов линии BALB/c вклад массы эмбрионов был достоверным для второй компоненты (Y1: $p=0.93$; Y2: $p=0.04$; Y3: $p=0.99$) (рис. 2б). Различия между самцами C57BL/6, отличающимися по массе плацент у потомства, наблюдались по третьей компоненте (Y1: $p=0.74$; Y2: $p=0.68$; Y3: $p=0.05$), в то время как для групп самцов линии BALB/c – по первой и второй компоненте (Y1: $p=0.001$; Y2: $p=0.03$; Y3: $p=0.99$) (рис 2с).

При анализе различий в компонентном составе мочи между сформированными группами самцов не было обнаружено отличий по присутствию отдельных компонентов.

Анализируя количественное содержание каждого компонента в отдельности, не удалось разделить самцов в зависимости от размера их помета. Масса эмбрионов в помете самцов была связана с количественным содержанием этилбензола ($F_{(1, 18)}=9.57$, $p=0.01$, $1-\beta=0.83$) в моче их отцов линии BALB/c, но данные результаты не наблюдались для самцов линии C57BL/6. Количество этилбензола и 3-гептен-2-она было связано с массой плаценты плодов и было выше только у самцов линии BALB/c ($F_{(1, 18)}=6.00$, $p=0.03$, $1-\beta=0.64$), чьи эмбрионы имели массу плацент больше медианы. Таким образом, используя отдельные компоненты мочи, не удастся различить группы самцов линии C57BL/6 ни по одному из выбранных признаков, тогда как

Таблица 1. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA Repeated measures поведения самок линий C57BL/6 и BALB/c в ольфакторных тестах

Фактор	Количество подходов	Время обнюхивания
Линия	$F_{(1,24)}=245.98, p<0.001, 1-\beta=1.00$	$F_{(1,24)}=216.18, p<0.001, 1-\beta=1.00$
Размер помета	$F_{(1,24)}=11.85, p=0.002, 1-\beta=0.91$	$F_{(1,24)}=15.73, p<0.001, 1-\beta=0.97$
Линия*Размер помета	$F_{(1,24)}=1.40, p=0.248, 1-\beta=0.21$	$F_{(1,24)}=7.24, p=0.01, 1-\beta=0.73$

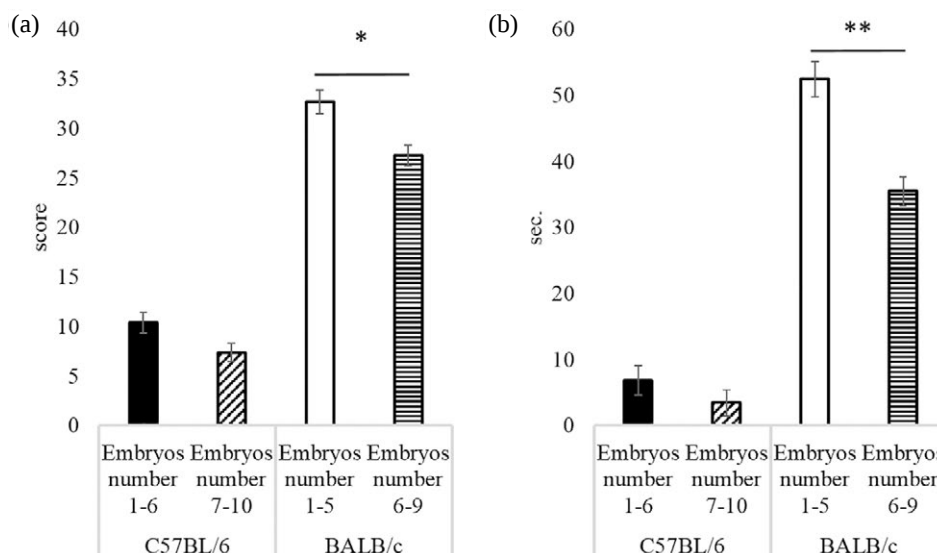


Рис. 3. (a) — Количество подходов к образцам мочи самцов в зависимости от количества эмбрионов в их потомстве. (b) — Время обнюхивания образцов мочи самцов в зависимости от количества эмбрионов в их потомстве. HSD-test * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$

самцов линии BALB/c возможно различить по массе потомков и массе их плаценты.

Поведенческие реакции самок на мочу самцов

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA Repeated measures поведения самок в ольфакторных тестах показал значимое влияние количества эмбрионов в потомстве самца на количество и время обнюхивания самками его мочи в тестах ольфакторного предпочтения (табл. 1).

Последующие сравнения при помощи post hoc критерия Тьюки выявили, что самки линии BALB/c, но не C57BL/6 предпочитают самцов, в потомстве которых было зафиксировано меньшее количество эмбрионов. Это выражалось в большем количестве подходов и времени обнюхивания стимулов самками линии BALB/c (рис. 3а, б).

В то же время не было обнаружено взаимосвязи реакции самок на мочу самца в ольфакторных тестах и массы эмбрионов в потомстве тестируемых самцов ($F_{(1,24)} = 1.21$, $p = 0.283$ для количества подходов, $F_{(1,24)} = 1.08$, $p = 0.309$ для времени обнюхивания), несмотря на наличие разницы в паттернах соединений мочи самцов линии BALB/c (рис. 2б). Последующие сравнения при помощи HSD-теста подтвердили отсутствие значимых различий.

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA Repeated measures поведения самок в ольфакторных тестах не выявил значимой связи между массой плаценты в потомстве самца и поведением самок в тестах ольфакторного предпочтения ($F_{(1,24)} = 0.04$, $p = 0.84$ для количества подходов, $F_{(1,24)} = 0.82$, $p = 0.37$ для времени обнюхивания). Последующие сравне-

ния при помощи post hoc критерия Тьюки подтвердили отсутствие значимых различий в поведении самок несмотря на то, что химический состав образцов позволял дифференцировать данные группы по общей композиции (рис. 2б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Моча имеет как летучие, так и нелетучие компоненты [27]. Ее состав неоднократно анализировался на жидкостных и газовых хроматографах с последующей расшифровкой состава при помощи референсных соединений или масс-спектрометрии, а также при помощи электрофореза для идентификации белковой фракции. Наиболее изученной является газовая составляющая мочи, список детектированных соединений в которой не раз публиковался исследователями [20–22]. При этом остается неясным — для передачи информации важна вся смесь или только некоторые ее составляющие. Так существуют работы, в которых различия между исследуемыми группами животных определялось наличием/отсутствием определенных компонентов [20]. Различия могли определяться и на основании количественного содержания некоторых компонентов смеси [20]. Или же значимость для дискриминации образцов приобретают группы соединений и их относительное содержание [21, 28, 29]. В нашей работе было продемонстрировано отсутствие различий в компонентном составе и относительном содержании каждого из веществ в отдельности при анализе групп самцов линии BALB/c различавшихся по количеству эмбрионов. Различия удалось установить только с привлече-

нием в анализ все 32 детектированных компонента. В то же время самки BALB/c были способны различить данные группы самцов в ольфакторном тесте, что позволяет предположить, что информация кодируется, главным образом, относительным содержанием группы компонентов мочи, а не их наличием или концентрацией отдельных веществ.

При работе с лабораторными животными, а тем более с инбредными линиями, всегда есть опасность выявления не общих закономерностей, а индивидуальной реакции конкретной линии, основанной на особенностях ее генотипа. Поэтому важно проводить сравнительные исследования генетически контрастных животных. Выбор линий C57BL/6 и BALB/c для изучения влияния репродуктивного успеха самцов мышей на химический состав и сигнальные свойства их мочи был связан, с одной стороны, с широким использованием этих линий в научных экспериментах, а с другой, — с функциональными особенностями животных этих линий. Прежде всего стоит отметить отличие двух исследуемых линий по МНС-локусам: H-2b у C57BL/6 и H-2d у BALB/c, что определяет различия в продукции цитокинов Т-клетками при развитии иммунной реакции [30], а также отличия в продукции рецепторов В-лимфоцитами, макрофагами и дендритными клетками [31], что в совокупности приводит к различным путям реакции иммунной системы, которая, в свою очередь, играет весьма значимую роль в течении беременности и при взаимодействии мать—плод [13, 32]. Также животные исследуемых линий существенно различаются по чувствительности к запаховым стимулам: мыши линии C57BL/6 на два порядка слабее реагируют на предъявляемые запахи, чем мыши линии BALB/c [33]. Это находит подтверждение в ольфакторных тестах, где мы наблюдали меньшую исследовательскую активность самок C57BL/6 по сравнению с самками BALB/c по отношению к образцам мочи самцов, что может свидетельствовать о их сниженной реакции на запаховые стимулы. Но не стоит исключать из рассмотрения и другие причины. Так было показано, что самцы линии C57BL/6 в моче имеют значительно выше содержание MUP по сравнению с BALB/c [34]. Помимо функции связывания летучих веществ мочи MUP обладают и собственной сигнальной функцией [22, 27, 34]. Постановка эксперимента с отсутствием прямого контакта с образцом исключает улавливание нелетучих компонентов образца мочи.

Репродуктивный успех определяется как количество копий генов, переданных следующему поколению, которое также способно к размножению [16]. Согласно данному определению, успех самца определяется количеством оставленных потомков. Оказалось, что репродуктивный успех самцов исследуемых линий, оцененный по числу их потомков, был связан с предпочтением их хемосигналов интактны-

ми самками. Так, мы наблюдали, что самки линии BALB/c предпочитали самцов, в потомстве которых наблюдалось меньшее количество эмбрионов. Тем не менее данный результат хорошо согласуется с гипотезой компенсации, выдвинутой Патрисией Говати и неоднократно подтверждавшейся впоследствии [3, 13, 35]. В данных работах было показано, что самки, размножающиеся с непредпочитаемыми самцами, повышали свой репродуктивный выход через увеличение числа овулировавших яйцеклеток. В исследовании Герлинской с соавторами (2007) было продемонстрировано, что самцы, имеющие большие затраты белка при маркировке (а значит, более привлекательные для самок и способные с большей вероятностью удержать свою территорию) имеют меньшее количество эмбрионов в потомстве, чем самцы с низкой белковой экскрецией [36].

В действительности не стоит забывать, что на репродуктивный успех влияет не только количество потомков, но и их жизнеспособность, а также способность впоследствии стать более конкурентоспособными в борьбе за полового партнера, оставить потомство и позаботиться о нем [37]. Помимо количества потомков исследователи часто используют характеристики потомства для описания репродуктивного успеха родителей, привлекая в анализ такие показатели, как масса тела потомков, их навыки в строительстве гнезд, способность к доминированию и т. д. — черты, которые, теоретически, позволяют выжить и более успешно размножиться данным особям, нежели их конкурентам [2, 13]. При этом вклад отца в развитие плода представляется достаточно значимым — экспрессия именно отцовских генов преобладает в плаценте [38]. А изменения в фенотипе отцов, отражающиеся в импринтировании генома, влияют на массу тела потомства, длину тела, массу плаценты и т. д. [39]. В настоящем исследовании также была обнаружена связь массы тела потомков и их плацент с отцовским фенотипом, а именно — запаховым профилем самцов. При этом масса тела потомков и их плацент не являлась значимым показателем для наивных самок при оценке мочи самца в ольфакторном тесте.

Таким образом, мы наблюдаем, что даже интактные инбредные животные имеют различия в проявлении фенотипических признаков. Такие параметры, как профиль летучих соединений в моче, способность покрывать самок, количество зачатых эмбрионов и параметры их развития — признаки, имеющие большую вариативность и зависящие не только от генотипа отца и матери. Выбирая полового партнера, самки могут получить информацию о некоторых его репродуктивных качествах, опираясь лишь на запаховый профиль мочевого метки самца. При этом более предпочтительным является спаривание, в результате которого будет зачато небольшое количество потомков, тогда как масса тела и плацен-

ты потомства самца не играет значимой роли при выборе партнера самкой на основе запаха его мочи.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Л.З., М.П.М., Л.А.Г.), сбор данных (Ю.В.П., С.О.М., А.С.Х.), обработка данных (А.С.Х., Д.В.П.), написание и редактирование манускрипта (А.С.Х., Д.И.Ю.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22.09.2010 – Directive 2010/63/EU) и одобрено межинститутской биоэтической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН (протокол 8 от 19.03.2012).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта (FWNR-2022-0004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием животных ЦКП “SPF-виварий” и оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанная Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта — RFMEFI62119X0023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мoшкiн МП, Шилова СА (2008) Разнокачественность особей как механизм поддержания стабильности популяционных структур. Успехи современной биологии 128: 307–320. [Moshkin MP, Shilova SA (2008) Raznokachestvennost' osobey kak mekhanizm podderzhaniya stabil'nosti populyatsionnykh struktur. Uspekhi sovremennoy biologii 128: 307–320].
2. Drickamer LC, Gowaty PA, Wagner DM (2003) Free mutual mate preferences in house mice affect reproductive success and offspring performance. Animal Behaviour 65: 105–114. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.2027>
3. Gowaty PA, Anderson WW, Bluhm CK, Drickamer LC, Kim YK, Moore AJ (2007) The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. Proc Nat Acad Sci 104: 15023–15027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706622104>
4. Raveh S, Sutalo S, Thonhauser KE, Thoß M, Hettyey A, Winkler F, Penn DJ (2014) Female partner preferences enhance offspring ability to survive an infection. BMC Evol Biol 14: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-14>
5. Apanius V, Penn DJ, Slev PR, Ruff LR, Potts WK (2017) The nature of selection on the major histocompatibility complex. Critical Rev Immunol 37: 75–125. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.10>
6. Dietz DM, LaPlant Q, Watts EL, Hodes GE, Russo SJ, Feng J, Oosting RS, Vialou V, Nestler EJ (2011) Paternal transmission of stress-induced pathologies. Biol Psychiatry 70: 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.005>
7. Gerlinskaya LA, Anisimova MV, Kontsevaya GV, Maslennikova SO, Romashchenko AV, Gong Y, Moshkin YM, Moshkin MP (2020) Mating with immunised male mice affects the phenotype of adult progeny. Reproduction 160: 117–127. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0360>
8. Dias BG, Ressler KJ (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. Nat Neurosci 17: 89–96. <https://doi.org/10.1038/nn.3594>
9. Ou XH, Zhu CC, Sun SC (2019) Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. J Cel Physiol 234: 7847–7855. <https://doi.org/10.1002/jcp.27847>
10. Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA (2011) Epigenetics and the origins of paternal effects. Horm Behav 59: 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.018>
11. Koyama S (2016) Primer Effects by Murine Pheromone Signaling: Pheromonal Influences on Reproductive Conditions. Springer.
12. Alter MD, Gilani AI, Champagne FA, Curley JP, Turner JB, Hen R (2009) Paternal transmission of complex phenotypes in inbred mice. Biol Psychiatry 66: 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.026>
13. Gerlinskaya LA, Maslennikova SO, Anisimova MV, Feofanova NA, Zavjalov EL, Kontsevaya GV, Moshkin YM, Moshkin MP (2017) Modulation of embryonic development due to mating with immunised males. Reproduct Fertility Devel 29: 565–574. <http://dx.doi.org/10.1071/RD15173>
14. Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. Trends Ecol Evol 13: 391–396. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01473-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01473-6)
15. Dougherty LR (2020) Designing mate choice experiments. Biol Rev 95: 759–781. <https://doi.org/10.1111/brev.12586>
16. Clutton-Brock TH (1988). Reproductive success: studies of individual variation in contrasting breeding systems. University of Chicago press.
17. Crowcroft P, Rowe FP (1963) Social organization and territorial behaviour in the wild house mouse (Mus Musculus L.). Proceedings of the Zoological Society of London. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd 140: 517–531. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01871.x>
18. Fang Q, Zhang YH, Shi YL, Zhang JH, Zhang JX (2016) Individuality and transgenerational inheritance of social

- dominance and sex pheromones in isogenic male mice. *J Exper Zool Part B: Mol Dev Evol* 326: 225–236. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22681>
19. *Kruczek M* (1997) Male rank and female choice in the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Behav Proc* 40: 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(97\)00785-7](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(97)00785-7)
 20. *Schwende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmack M, Novotny M* (1986) Urinary volatile constituents of the house mouse, *Mus musculus*, and their endocrine dependency. *J Chem Ecol* 12: 277–296. <https://doi.org/10.1007/bf01045611>
 21. *Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Breton RG, Reed RR, Trevejo JM* (2010) Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chem Senses* 35: 459–471. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq032>
 22. *Liu YJ, Guo HF, Zhang JX, Zhang YH* (2017) Quantitative inheritance of volatile pheromones and darcin and their interaction in olfactory preferences of female mice. *Sci Reports* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02259-1>
 23. *Khotskina AS, Zavjalov EL, Shnayder EP, Gerlinskaya LA, Maslennikova SO, Petrovskii DV, Baldin MN, Makas AL, Gruznov VM, Troshkov ML, Moshkin MP* (2023) CD-1 mice females recognize male reproductive success via volatile organic compounds in urine. *Vavilov J Gen Breeding* 27: 480–487. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-58>
 24. *Cora MC, Kooistra L, Travlos G* (2015) Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol* 43: 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
 25. *Gromski PS, Muhamadali H, Ellis DI, Xu Y, Correa E, Turner ML, Goodacre R* (2015) A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analyst Chimica Acta* 879: 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>
 26. *Brereton RG, Lloyd GR* (2014) Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemometrics* 28: 213–225. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
 27. *Hurst JL, Beynon R* (2013) Rodent urinary proteins: genetic identity signals and pheromones. *Chemical signals in vertebrates* 12. Springer, New York, NY: 117–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5927-9_9
 28. *Willse A, Belcher AM, Preti G, Wahl JH, Thresher M, Yang P, Yamazaki K, Beauchamp GK* (2005) Identification of major histocompatibility complex-regulated body odors by statistical analysis of a comparative gas chromatography/mass spectrometry experiment. *Analytical Chemistry* 77: 2348–2361. <https://doi.org/10.1021/ac048711t>
 29. *Novotny MV, Soini HA, Koyama S, Wiesler D, Bruce KE, Penn DJ* (2007) Chemical identification of MHC-influenced volatile compounds in mouse urine. I: Quantitative proportions of major chemosignals. *J Chem Ecol* 33: 417–434. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9230-9>
 30. *Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM* (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
 31. *Pellegrini A, Guiñazú N, Aoki MP, Calero IC, Carrera-Silva EA, Girones N, Fresno M, Gea S* (200) Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *Int Immunol* 19: 1395–1402. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm107>
 32. *Babochkina TI, Gerlinskaya LA, Anisimova MV, Kontsevaya GV, Feofanova NA, Stanova AK, Moshkin MP, Moshkin YM* (2022) Mother–Fetus Immune Cross-Talk Coordinates “Extrinsic”/“Intrinsic” Embryo Gene Expression Noise and Growth Stability. *Int J Mol Sci* 23: 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms232012467>
 33. *Lee AW, Emsley JG, Brown RE, Hagg T* (2003) Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in three inbred strains of mice. *Neuroscience* 118: 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00950-8)
 34. *Roberts SA, Prescott MC, Davidson AJ, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL* (2018) Individual odour signatures that mice learn are shaped by involatile major urinary proteins (MUPs). *BMC Biol* 16: 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0512-9>
 35. *Moshkin MP, Kondratiuk EI, Litvinova EA, Gerlinskaya LA* (2010) The activation of specific immunity in male mice stimulates fertility of their breeding partners: The phenomenon of Lot's daughters. *Zhurnal obshchei biologii* 71: 425–435. <https://doi.org/10.1134/S2079086411010063>
 36. *Герлинская ЛА, Фролова ЮА, Кондратюк ЕЮ, Мошкин МП* (2007) Затраты на маркировку и репродуктивный успех у самцов мышей лабораторной линии ICR. *Журн общ биол* 68: 296–306. [*Gerlinskaya LA, Frolova YUA, Kondratyuk YEYU, Moshkin MP* (2007) Zatratty na markirovku i reproduktivnyy uspek u samtsov myshey laboratornoy linii ICR. *Zhurn obshch biol* 68: 296–306]
 37. *Marshall DJ, Uller T* (2007) When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116: 1957–1963. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x>
 38. *Wang X, Miller DC, Harman R, Antczak DF, Clark AG* (2013) Paternally expressed genes predominate in the placenta. *Proc Nat Acad Sci* 110: 10705–10710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308998111>
 39. *Denomme MM, Parks JC, McCallie BR, McCubbin NI, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG* (2020) Advanced paternal age directly impacts mouse embryonic placental imprintin. *PLoS One* 15: 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229904>

FEMALE BALB/C MICE PREFER THE ODOR OF MATES PRODUCING FEWER PROGENY

A. S. Khotskina^{a, #}, Y. V. Patrushev^b, D. I. Yusupova^a, L. A. Gerlinskaya^a,
S. O. Maslennikova^a, D. V. Petrovskii^a, M. P. Moshkin^a and E. L. Zavjalov^a

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

^b The Federal Research Center Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

[#] e-mail: dotcenko@bionet.nsc.ru.

Mate choice is the very important part of sexual selection. It is known that free mate choice is to provide the most viable offspring are born. Researches on different animal species found that viability from introduction to sexual maturity is significantly higher in individuals born in crossbreeding in accordance with free behavioral mate choice, compared to that in crossbreeding against the mate choice. Making the choice, the female may rely on visual, vocal or olfactory signals of male. Most of experiments evaluating sexual choice allowing interactions with the animal, making it impossible to determine the specific contribution of each separate signal. Odor play a crucial role in intra-specific communication in rodents. Individuals are able to recognize sex, reproductive status, genotype, and diet and health condition conspecifics by odor. However, very few articles unite olfactory signals from the male to information about his paternal effects. In our research, we mated a male with two females. The number of live embryos, their weight and the weight of fetal placentas evaluated reproductive success of males. Naive females in olfactory tests then evaluated the volatile urine fraction of the males. Male urine samples were also analyzed using chromatography-mass spectrometry analysis. In result, the naive BALB/c females prefer males with low number of fetus in the litter compared to males with high number of fetus in the litter. Instrumental method of analysis approved the opportunity to differentiate between the groups of males. Other pregnancy parameters did not affect naive females' preference for male urine samples.

Keywords: Olfactory preference, mating choice, olfactory test, strain of mice BALB/c, strain of mice C57BL/6

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРНАТРИЕМИИ НА РЕАБСОРБЦИЮ БЕЛКОВ В ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦАХ ПОЧКИ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*

© 2024 г. Н. П. Пруцкова^{1, *}, Е. В. Селиверстова¹

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

* e-mail: natprut@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.02.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 17.03.2024 г.

Реабсорбция белков в проксимальных канальцах почек происходит одновременно с транспортом ионов и воды, однако мало что известно о зависимости рецептор-опосредованного эндоцитоза белка от изменений водно-солевого баланса. Целью исследования явилось изучение канальцевой реабсорбции и внутриклеточного везикулярного транспорта различных белков в модели гипернатриемии на озерных лягушках (*Pelophylax ridibundus*). В опытах лягушкам инъецировали гипертонический раствор хлорида натрия (0.75 М NaCl) за 1 ч до инъекции зеленого или желтого флуоресцентных белков (GFP или YFP), а также лизоцима. Для выявления лизоцима и рецептора эндоцитоза мегалина не срезах почек использовали метод флуоресцентной иммуногистохимии. Препараты изучали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе. На полученных изображениях определяли интенсивность флуоресцентных сигналов белков и мегалина в эпителиальных клетках проксимальных канальцев. Для изучения динамики эндоцитоза применяли автоматизированный метод количественной оценки колокализированных сигналов белка и мегалина. Установлено статистически достоверное снижение реабсорбции GFP, YFP и лизоцима в проксимальных канальцах после инъекций раствора NaCl по сравнению с контролем. Показано накопление белков в раннем эндоцитозном компартменте и снижение их поступления в поздние эндосомы и лизосомы, что рассматривается как свидетельство замедления внутриклеточного везикулярного транспорта при гипернатриемии. Полученные данные проанализированы в связи с изменениями показателей крови и деятельности почек в процессе осморегуляции, а также с ролью хлоридных каналов в рецептор-опосредованном эндоцитозе белков. Можно полагать, что усиление эпителиального транспорта ионов в проксимальных канальцах в условиях гипернатриемии приводит к снижению способности эпителиоцитов к реабсорбции белков и ингибированию их внутриклеточного транспорта в процессе эндоцитоза.

Ключевые слова: амфибии, лизоцим, мегалин, проксимальный каналец, реабсорбция белка, флуоресцентный белок, хлоридный канал

DOI: 10.31857/S0044452924030047, **EDN:** YXHQKW

ВВЕДЕНИЕ

Основные механизмы регуляции водно-солевого баланса и эпителиального канальцевого транспорта, действующие в почках амфибий, во многом сходны с таковыми у млекопитающих. Это позволяет использовать амфибий в качестве экспериментальных моделей для изучения физиологических процессов, действующих в почках позвоночных животных, включая фундаментальные и эволюционные аспекты [1]. Как известно, реабсорбция белков в почке происходит в проксимальных канальцах нефронов. Согласно установленному рецептор-опосредованному клатрин-зависимому пути [2–4], эндоцитоз белка начинается с его взаимодействия с рецепторами (мегалином и кубилином) на апикальной плазматической мембране и интернализации это-

го комплекса в составе эндоцитозных везикул при участии клатрина и адаптерных белков. После распада лиганд-рецепторного комплекса в эндосомах и рециклинга рецепторов на апикальную мембрану осуществляется последующий везикулярный транспорт абсорбированных макромолекул и их утилизация в лизосомах. Основным рецептором, вовлеченным в захват и внутриклеточный транспорт белков, является мегалин — гигантский трансмембранный белок, принадлежащий к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности [4–7]. Присутствие мегалина на апикальной мембране эпителиоцитов служит четким критерием для идентификации проксимальных канальцев в срезах почек [8]. У млекопитающих, рыб и амфибий установлена идентичность молекулярных механизмов эндоцитоза белка [8–11]. В исследованиях на лягушках нами было показано

участие рецепторов мегалина (мегалин/Irp2) и кубилина в захвате зеленого и желтого флуоресцентных белков (GFP и YFP), лизоцима и альбумина [11–13].

В проксимальных канальцах почек амфибий одновременно с профильтрованными белками реабсорбируется от 20 до 45 % Na^+ и Cl^- , основных ионов плазмы крови [14]. В структурах почки разными методами идентифицированы основные транспортные белки, участвующие в перемещении Na^+ и Cl^- [15]. В то же время мало что известно об их локализации и функциональной роли в клетках проксимальных канальцев, в отличие от дистальных сегментов нефрона и собирательных трубок, в которых на апикальной мембране эпителиоцитов имеются эпителиальный натриевый канал и Na^+/H^+ -обменник [16–19]. Некоторые белки семейства генов хлоридных каналов клонированы у лягушек рода *Xenopus*, в том числе хлоридные каналы xClC-5 и xClC-3 [20] с идентичностью 78–90 % в сравнении с аналогичными каналами млекопитающих и человека, ClC-5 и ClC-3 . Однако их функциональную экспрессию изучали преимущественно в ооцитах *Xenopus* или в клеточных линиях млекопитающих [21]. В то же время установлено, что у млекопитающих и человека хлоридные каналы участвуют в процессе эндоцитоза белка в проксимальных канальцах. От функционирования ClC-3 и ClC-5 зависит величина pH в эндоцитозных везикулах и эффективность гидролиза белка в лизосомах [21–23]. У мышей с нокаутом гена канала ClC-5 , а также у пациентов с болезнью Дента, обусловленной мутацией этого гена, происходит ингибирование эндоцитоза белка в проксимальных канальцах [24].

Существующие у амфибий механизмы осморегуляции позволяют этим животным успешно адаптироваться к повышению солёности среды, при этом в крови существенно возрастает концентрация Na^+ , Cl^- и мочевины [25–27]. Имеются также данные о повышении осмоляльности крови и мочи у амфибий при парентеральном введении гипертонического раствора NaCl [26, 28–30]. В наших недавних исследованиях установлено, что у озерных лягушек в ответ на введение 0.75 М NaCl не только увеличивается осмоляльность крови и концентрации в ней Na^+ и Cl^- , но также повышаются диурез, осмоляльность мочи и экскреция Na^+ и Cl^- почками [31]. Таким образом, несмотря на отсутствие в нефронах амфибий петель Генле и, соответственно, механизма осмотического концентрирования мочи, продемонстрировано усиление осмо- и ионорегулирующей функции почек после инъекций NaCl . Одновременно методом иммунофлуоресцентной микроскопии установлено увеличение количества ClC-5 , локализованного в эпителиоцитах проксимальных канальцев [31].

Исходя из сопряженности процессов реабсорбции белка в проксимальных канальцах и транспорта ионов в этом отделе нефрона, а также роли хло-

ридных каналов на разных этапах эндоцитоза, возникает вопрос о связи канальцевой реабсорбции белка с повышением концентрации в крови осмотически активных веществ. Целью исследования явилось изучение реабсорбции белка в почках лягушек в физиологической модели изменений водно-солевого баланса. В задачи работы входила оценка эффекта инъекций гипертонического раствора NaCl на реабсорбцию различных белков в почках озерных лягушек, а также динамики белкового транспорта в процессе рецептор-опосредованного эндоцитоза в эпителиоцитах проксимальных канальцев методами иммуногистохимии и конфокальной микроскопии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Озерные лягушки, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), были отловлены в Астраханской области и в периоде гибернации содержались в холодильной камере ЭБК ИЭФБ РАН при температуре 4 °С, в пластиковых контейнерах с водой. Опыты проводили с декабря до середины апреля. Перед экспериментами, животных помещали в индивидуальные контейнеры, заполненные водой до уровня 1–2 см, адаптировали к комнатной температуре в течение 1 ч и взвешивали. Масса тела лягушек, преимущественно самцов (64 %), составляла 96 ± 4 г ($n=28$) при отсутствии достоверных различий между самцами и самками, а также лягушками контрольных и опытных серий. Все инъекции лягушкам осуществляли подкожно, в спинной лимфатический мешок. Изотонический 0.01 М фосфатно-солевой буфер (PBS) использовали для растворения вводимых веществ (осмоляльность 200 мОсм/кг H_2O , pH 7.4). Для моделирования гипернатриемии животным инъектировали 0.75 М NaCl в дозе 100 мкл/30 г массы тела, контрольным лягушкам вводили PBS в таком же объеме. Через 1 ч в контроле и опыте вводили маркерные белки в дозе 18 мкг/100 мкл/30 г массы тела для тестирования реабсорбции в проксимальных канальцах. В разных сериях использовали зеленый или желтый флуоресцентные белки (GFP, YFP, Институт белка, РАН, Пущино-на-Оке, Россия), а также лизоцим (Sigma Aldrich Inc., США). Через 20 мин после введения белка лягушек обездвигивали, разрушая спинной мозг с помощью препаровательной иглы, быстро извлекали почки для дальнейшей препаровки и фиксации образцов и проводили эвтаназию путем декапитации.

Образцы ткани почек фиксировали в 4 % растворе параформальдегида и обрабатывали, как описано ранее [13]. Срезы (толщиной 5–7 мкм) из разных частей почки получали в криостате CM 1510 (Leica Microsystems, Germany). В иммуногистохимических исследованиях применяли кроличьи поликлональные антитела к лизоциму (Abcam, США)

в разведении 1:200 и мышиные моноклональные антитела к мегалину/LRP2 (MyBioSource, США; Acris, Origene Technologies, США) в разведении 1:1000, а также флуоресцентные конъюгаты козьих антикроличьих и обезьяньих антимышиных иммуноглобулинов (IgGs) с Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568 в разведении 1:500 (Invitrogen, Molecular Probes, США), согласно описанному ранее протоколу [11]. Срезы монтировали на предметные стекла, заключали в мовиол и изучали в конфокальном микроскопе DMI 6000 с лазерной приставкой Leica SP II (Leica Microsystems, Германия), используя объектив 40х. В режиме лазерного сканирования использовали спектры возбуждения с длинами волн 488, 513 и 568 нм, регистрируя в различных частях спектра свечение Alexa Fluor 488 и GFP (500–520 нм), YFP (515–550 нм) и Alexa Fluor 568 (590–650 нм), соответственно. Последовательное сканирование в этих каналах и проходящем свете осуществляли при одних и тех же настройках микроскопа.

Изображения анализировали, пользуясь программой ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>). В надгломерулярной зоне почек подсчитывали относительное число профилей проксимальных канальцев со свечением GFP, YFP или иммунофлуоресценцией лизоцима (% к общему числу мегалин-позитивных проксимальных канальцев), используя 20 изображений для каждой лягушки. В отдельных канальцах, выбранных случайным образом (30 проксимальных канальцев для каждой особи), определяли интенсивность флуоресцентного сигнала (оптическую плотность, в условных единицах (усл. ед.)) в надъядерной области клеток эпителиального слоя, включая апикальную и субапикальную цитоплазму. На совмещенных изображениях визуализировали свечение белка (зеленое), рецептора (красное), а также колокализованное свечение (желто-оранжевое). Для количественной оценки соотношения этих сигналов использовали плагин (<http://sibarov.ru/index.php?slab=software>) для программы ImageJ. Для каждой пары изображений, полученных в красной и зеленой спектральной области, создавали точечные диаграммы, на которых значения интенсивности пикселей на первом изображении отложены по оси X, а значения соответствующих пикселей на втором изображении — по оси Y. Автоматически рассчитывали количество пикселей со свечением в красной и зеленой области спектра, а также пикселей с перекрытием сигналов относительно общего числа светящихся пикселей с интенсивностью сигнала выше эмпирически установленного порога (75 усл. ед.). Используя 20 пар изображений для каждой лягушки, определяли общее количество пикселей со свечением абсорбированного белка и процентное соотношение колокализованного и неколокализованного белка. Данные предварительно проверяли

на соответствие закону нормального распределения (тест Шапиро–Уилка). Основные показатели представляли как медиану с верхним и нижним квартилем [Me (Q1; Q3)], в отдельных случаях — в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SEM$). Для сравнения независимых групп данных использовали Т-критерий Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для расчетов и статистической обработки данных пользовались программами ImageJ и Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На совмещенных изображениях представлен паттерн реабсорбции GFP, YFP или лизоцима в эпителии проксимальных канальцев почек через 20 мин после инъекции (рис. 1). Введенные белки были визуализированы в многочисленных мегалин-позитивных проксимальных канальцах (рис. 1a–c). В почках отдельных контрольных лягушек относительное количество канальцев со свечением флуоресцентных белков было в пределах 60–90% для GFP и 71–81% для YFP, а метка к лизоциму присутствовала в 88–94% канальцев. Мегалин выявлялся в апикальной зоне эпителиоцитов, где частично был колокализован с поступившим в клетки белком, а не связанный с рецептором белок присутствовал в апикальной цитоплазме и более удаленных от люминальной мембраны областях (рис. 1). Значительное число эндоцитозных везикул, содержащих GFP или лизоцим хорошо видно при большем увеличении (рис. 1d, e). Зона колокализации белка с рецептором наиболее отчетливо выявлялась после введения лизоцима (рис. 1c, e, f). Метка к лизоциму, преимущественно везикулярная в контроле (рис. 1d), после инъекции 0.75 M NaCl была в значительной мере диффузной и часто присутствовала в щеточной каемке эпителиоцитов (рис. 1f). Предварительное введение 0.75 M NaCl привело к снижению процента профилей канальцев с меткой к лизоциму и не повлияло на распределение GFP и YFP в проксимальных канальцах (табл. 1).

При определении интенсивности флуоресценции GFP, YFP или лизоцима в апикальной зоне эпителиоцитов проксимальных канальцев у лягушек контрольных и опытных серий установлено достоверное снижение оптической плотности сигналов для каждого из введенных белков после предварительной инъекции NaCl (рис. 2).

Автоматизированный анализ изображений позволил сопоставить процент колокализации сигналов белка и мегалина в контроле и на фоне инъекций NaCl. В качестве примера приведен результат оценки эндоцитоза GFP (рис. 3). На совмещенном изображении (рис. 3a) видно преобладание в контроле зеленого сигнала GFP, а желто-оранжевого свече-

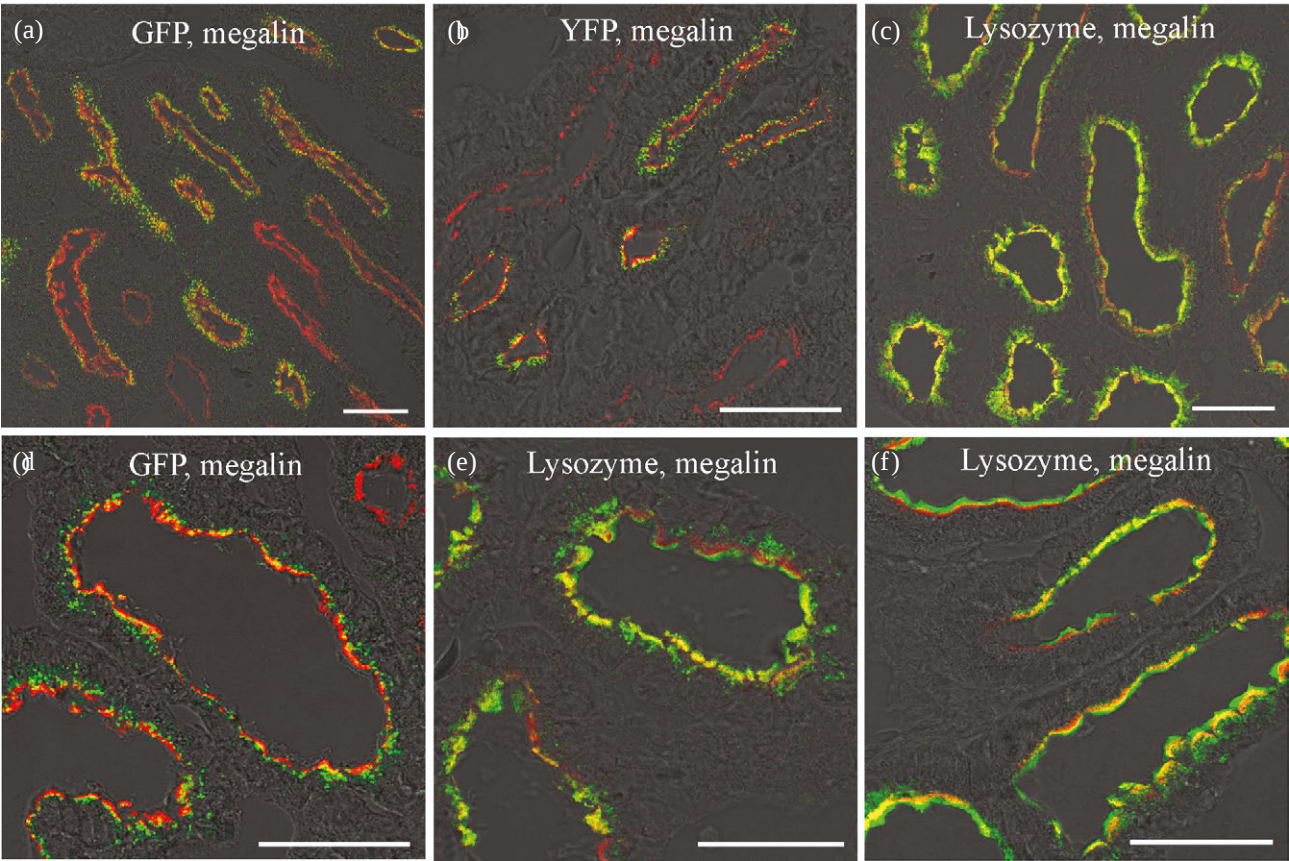


Рис. 1. Реабсорбция GFP, YFP и лизоцима (Lysosome) в иммунопозитивных к мегалину (megalin) проксимальных канальцах почек у озерных лягушек. (a–f) – профили проксимальных канальцев в контроле (a–e) и после предварительного введения NaCl (f). Сигналы: мегалин-Alexa 568 – красный, GFP, YFP и лизоцим-Alexa 488 – зелёный и колокализованное свечение – желто-оранжевый. Видно присутствие белков в большинстве мегалин-позитивных канальцев (a–c), образование многочисленных GFP-содержащих везикул (d), везикулярное и диффузное свечение лизоцима (e, f) и аккумуляция лизоцима в щётчатой каемке эпителиоцитов (f). Конфокальная микроскопия, совмещённые изображения. Калибровка: 50 мкм.

Таблица 1. Реабсорбция различных белков в проксимальных канальцах почек у озерных лягушек

Введенный белок	Число канальцев с реабсорбированным белком через 20 мин после инъекции (в % к мегалин-позитивным канальцам)			
	Контроль		Опыт	
	Me (Q1; Q3)	<i>n</i>	Me (Q1; Q3)	<i>n</i>
GFP	74.9 (67.3; 75.2)	7/140/2209	78.5 (70.1; 81.9)	6/120/1776
YFP	73.7 (72.3; 77.5)	3/60/759	71.9 (71.3; 73.3)	4/80/1078
Лизоцим	89.5 (88.9; 90.8)	4/80/1210	80.7 (78.7; 82.7)*	4/80/1442

Примечание: изотонический PBS (в контроле) и 0.75 M NaCl (в опыте) введены за 1 ч до инъекции белка. Достоверность различий по сравнению с контролем: * – $p < 0.05$ (Т-критерий Манна–Уитни); *n* – количество лягушек/изображений/канальцев.

ния (колокализованных сигналов GFP и мегалина) мало. На точечной диаграмме, представляющей распределение светящихся пикселей (рис. 3b), видно, что желто-оранжевых точек, соответствующих ко-локализации белка и рецептора, значительно меньше по сравнению с зелеными (в данном случае – 7 % и 54 % соответственно, относительно общего числа светящихся пикселей). После предварительного введения NaCl колокализованного свечения ста-

новится значительно больше, что видно на изображении (рис. 3c), и на точечной диаграмме (рис. 3d) преобладают пиксели с перекрытием сигналов по сравнению с сигналом только GFP (18 % и 6 % соответственно). Заметим, что абсолютное количество точек каждого цвета значения не имело, поскольку зависело от конкретного числа присутствующих на изображениях профилей проксимальных канальцев со свечением белка и мегалина. Для нас представля-

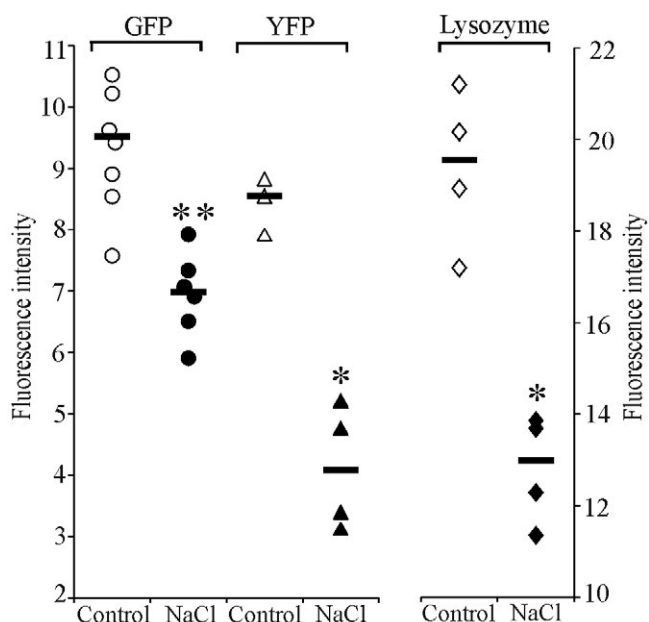


Рис. 2. Снижение реабсорбции GFP, YFP и лизоцима (Lysozyme) в проксимальных канальцах почек лягушек после предварительного введения NaCl. По оси ординат: интенсивность флуоресценции у отдельных лягушек (усл. ед.), слева — GFP (кружки) и YFP (треугольники), справа — лизоцима (ромбы); светлые значки — контроль (Control), темные значки — после инъекции 0.75 M NaCl; черная черта — медиана. Достоверность различий по сравнению с контролем: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ (Т-критерий Манна–Уитни).

ло интерес соотношение числа пикселей со свечением только белка и белка, колокализованного с рецептором. Если суммарное количество пикселей со свечением GFP принять за 100 %, то получается, что на первом изображении (рис. 3а) количество колокализованного белка составляет всего 12 %, а на втором (рис. 3с) — 74 %. Подобный расчет был применен ко всем сериям опытов с введением GFP, YFP и лизоцима. Установлено, что процент колокализации каждого из абсорбированных белков с мегалином достоверно увеличился под влиянием NaCl (рис. 4а). Соответственно, существенно изменилось соотношение колокализованного и неколокализованного белка в пользу первого (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В контрольных экспериментах паттерны мегалина, GFP, YFP и лизоцима в проксимальных канальцах почек не отличались от детально изученных ранее у амфибий [11–13] и были аналогичны таковым в эпителии проксимальных канальцев млекопитающих [32, 33]. Ранее было установлено, что введение 0.75 M NaCl озерным лягушкам приводит к гипернатриемии [31]. Как показало настоящее исследование, паттерн реабсорбции белков в проксимальных канальцах в этих условиях существенно не отличался от такового в контроле, за исключением сниже-

ния числа профилей канальцев, иммунопозитивных к лизоциму. В то же время установлено достоверное снижение интенсивности сигналов GFP, YFP и лизоцима, т. е. количества реабсорбированных белков. Наряду с этим изменялась динамика внутриклеточного транспорта в процессе эндоцитоза. После инъекции NaCl существенно возрастал процент колокализация белка с мегалином и снижалось относительное количество неколокализованного белка, т. е. белка в составе везикул (эндосом/лизосом), образовавшихся после распада белок-рецепторного комплекса и переместившихся из апикальной цитоплазмы в надъядерную и перинуклеарную зоны. Эти данные свидетельствуют о замедлении внутриклеточного транспорта белков. Эффект NaCl был установлен как для флуоресцентных белков, так и для лизоцима. Более того, установленный процент неколокализованного лизоцима можно считать даже заниженным, т. к. в его автоматизированный расчет попадала флуоресценция белка, не успевшего поступить в эпителиоциты и задержавшегося в зоне щеточной каемки. Как известно, процессы распада белок-рецепторного комплекса, рециклинга рецепторов и дальнейшего поступления белка в поздние эндосомы являются необходимыми этапами белкового трафика. От скорости этих процессов зависят аккумуляция и гидролиз белка в лизосомах с последующим использованием продуктов распада для пластического обмена и, таким образом, клиренс белка в организме. Выявленное на фоне гипернатриемии замедление эндоцитозного транспорта рассматривается нами как один из существенных факторов снижения абсорбционной способности клеток канальцев.

Имеются основания полагать, что наблюдаемое снижение реабсорбции белков является следствием существенных изменений водно-солевого баланса и тока ионов в составе канальцевой жидкости. Об этом свидетельствуют опубликованные ранее результаты инъекции 0.75 M NaCl на ионо- и осморегулирующую функции почек у озерных лягушек [31], которые соответствовали характерным лабораторным признакам гипертонической гипергидратации у человека. Так, через 60–80 мин после этого воздействия достоверно увеличивались осмоляльность сыворотки крови и содержание в ней Na^+ и Cl^- по сравнению с контролем, и аналогичные изменения наблюдались в моче. При этом отмечено усиление диуреза, скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и экскреции Na^+ , K^+ и Cl^- . Реабсорбция в почках профильтровавшейся жидкости и растворенных в ней веществ имеет большое значение для поддержания водно-солевого гомеостаза. Согласно представлениям о гломеруло-тубулярном балансе, существует прямая, почти линейная зависимость между изменением СКФ и реабсорбцией веществ в проксимальном канальце [34]. При умеренном повыше-

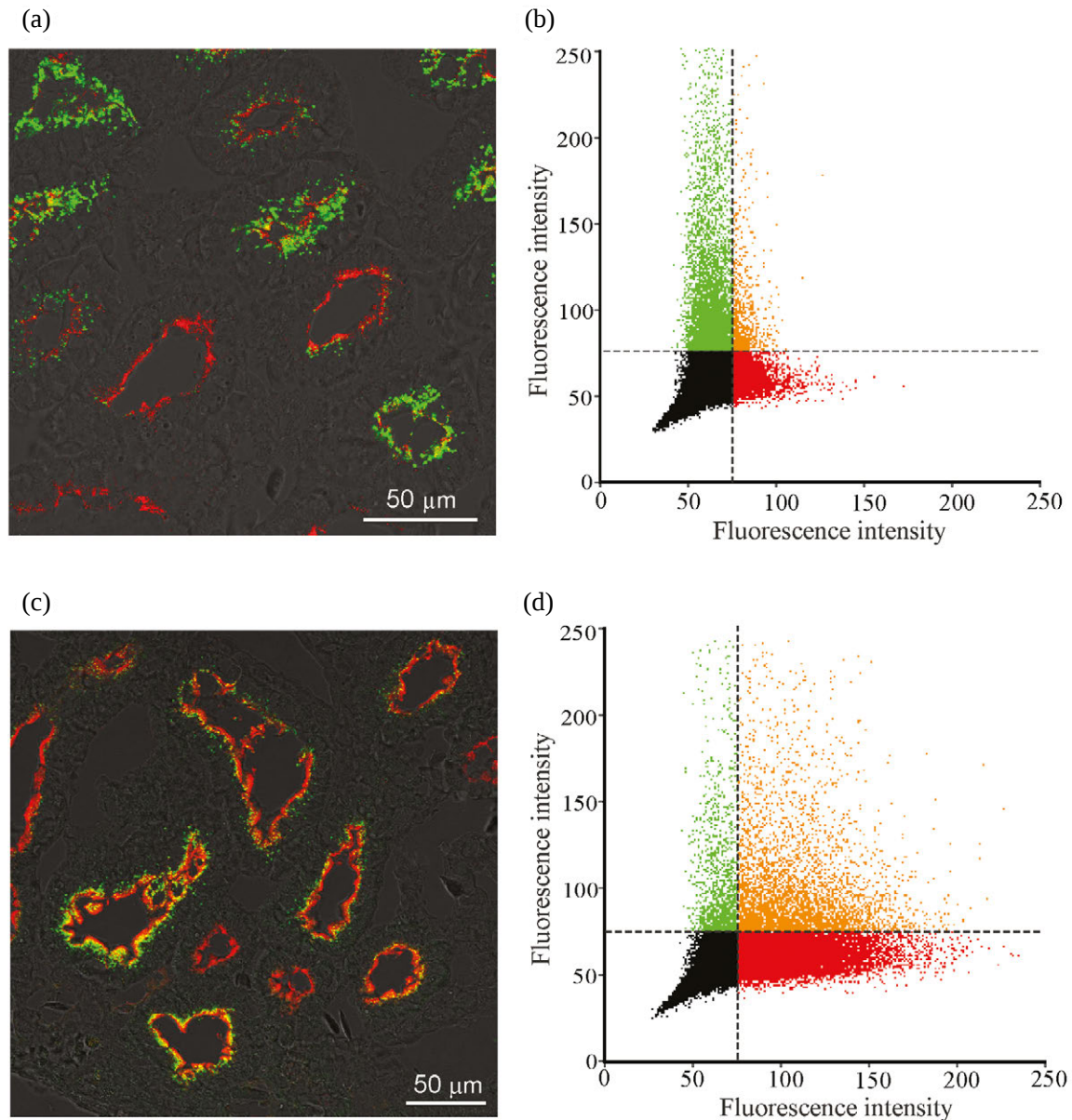


Рис. 3. Примеры автоматизированной количественной оценки и визуализации колокализованных флуоресцентных сигналов. (а) — GFP (зеленый), мегалин (красный) и колокализация сигналов (желто-оранжевый) в эпителии проксимальных канальцев в контроле. Конфокальная микроскопия, совмещенные изображения. Калибровка: 50 мкм. (б) — точечная диаграмма для изображения, представленного на (а). По оси абсцисс и ординат: интенсивность флуоресценции пикселей в красной и зеленой областях спектра, соответственно (в усл. ед.). Пиксели с перекрытием сигналов окрашены в желто-оранжевый цвет; пунктирные линии — пороги, отделяющие видимую флуоресценцию от темных пикселей. (с) и (d) — то же, что (а) и (б) для варианта с введением 0.75 M NaCl. Видно увеличение колокализации обоих сигналов по сравнению с контролем.

нии прохождения белков через клубочковый фильтр повышается как экскреция белков с мочой, так и канальцевая реабсорбция [35–37]. В то же время щелевые диафрагмы могут оказывать существенное сопротивление чрезмерному увеличению СКФ, что снижает поступление белка в ультрафильтрат, в отличие от потока жидкости [38]. Кроме того, предлагаемые модели зависимости реабсорбции белка от СКФ и тока жидкости в канальцах касаются, глав-

ным образом, альбумина, но не низкомолекулярных белков, а четких представлений о зависимости реабсорбции белка в проксимальных канальцах от гидродинамики канальцевой жидкости не имеется.

Ранее нами было продемонстрировано снижение захвата свободно фильтруемых GFP и лизоцима в проксимальных канальцах почек травяных и озерных лягушек под влиянием аргинин-вазотонина, способного снижать СКФ, действуя опосредованно

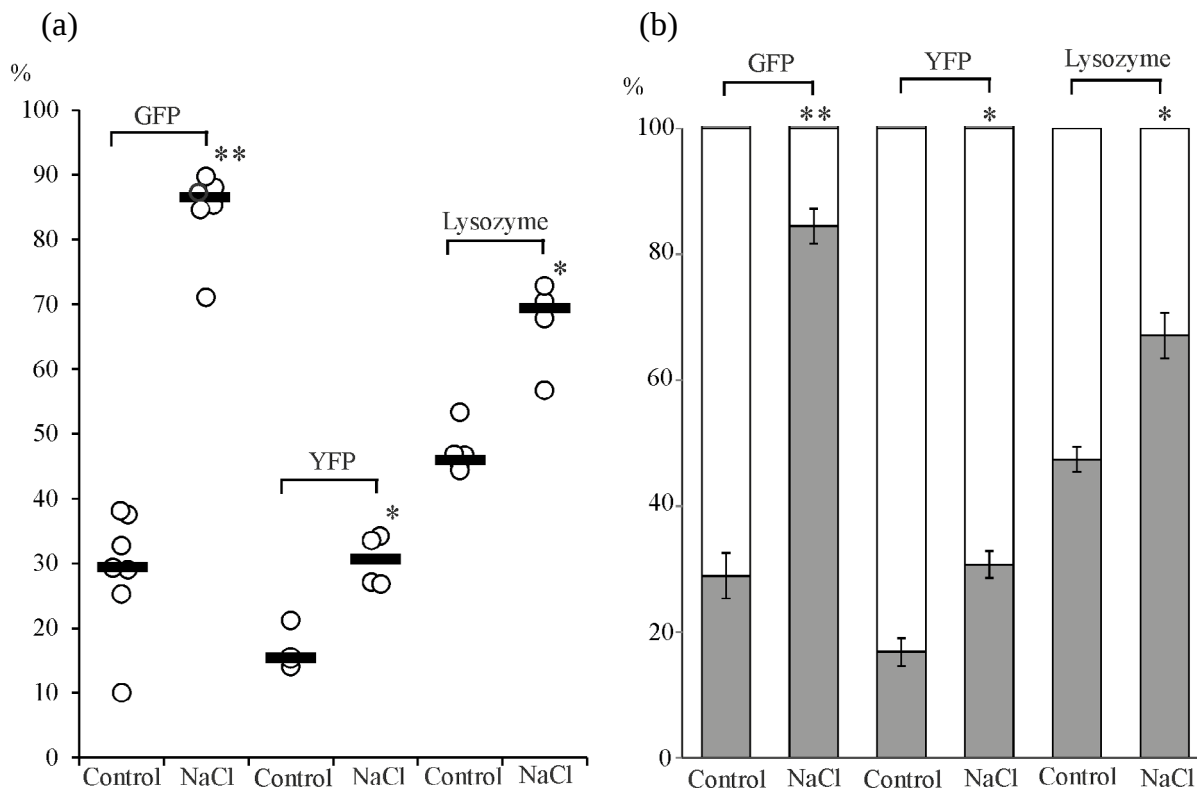


Рис. 4. Влияние инъекций 0.75 M NaCl на реабсорбцию и внутриклеточный транспорт GFP, YFP и лизоцима (Lysozyme) в проксимальных канальцах почек озерных лягушек. (a) — оценка колокализации введенных белков с мегалином в эпителии канальцев. По оси ординат: колокализованный белок (в % к общему количеству реабсорбированного белка) у отдельных лягушек (кружки) в контроле (Control) и после инъекции 0.75 M NaCl. Черная линия — медиана. (b) — соотношение колокализованного белка (темные столбцы) и неколокализованного белка (светлые столбцы) в тех же экспериментах. Данные представлены в виде $M \pm SEM$. Достоверность различий на (a) и (b): * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем (Т-тест Манна–Уитни).

через V1-подобные рецепторы прегломерулярных сосудов [39]. В настоящей работе выявлено уменьшение реабсорбции введенных белков в совершенно иных условиях, поскольку предварительно было показано, что инъекции 0.75 M NaCl приводят к увеличению СКФ [31]. Таким образом, нет ясности в механизмах, лежащих в основе выявленных нами изменений в захвате и внутриклеточном транспорте введенных белков. Имеются данные о том, что в норме эндоцитоз белка и контроль апикальной экспрессии аквапорина 1 в почках у мышей зависят от сопряженного функционирования мегалина и CIC-5 [40].

В наших исследованиях введение NaCl лягушкам повышало иммунофлуоресценцию CIC-5 в эпителии проксимальных канальцев без изменений паттерна и величины сигнала мегалина [31]. Известно, что белки семейства CLC представляют собой потенциал-зависимые хлоридные каналы плазматической мембраны и везикулярные Cl^-/H^+ -обменники [21]. В эпителиальных тканях эти белки вовлечены в различные процессы, включая эпителиальный транспорт, эндоцитоз, поддержание кислотно-щелочного баланса и регуляцию объема

клеток [20, 21]. Полагают, что в клетках проксимальных канальцев CIC-5 обеспечивает электрическое шунтирование, необходимое для подкисления эндосом и разобщения лиганд-рецепторного комплекса, и нарушением этого процесса объясняют протеинурию при болезни Дента [41].

В эпителиоцитах проксимальных канальцев CIC-5 присутствует непосредственно под апикальной мембраной, преимущественно в ранних эндосомах, где он колокализуется с абсорбированными белками и протонным насосом [22, 42, 43]. Возможно, в меньшем количестве CIC-5 присутствует в мембране микроворсинок [42]. В наших исследованиях на озерных лягушках CIC-5 был выявлен в везикулах апикальной и субапикальной цитоплазмы клеток проксимальных канальцев [31], и можно допустить, что у амфибий CIC-5 в эндоцитозных везикулах действует так же, как у млекопитающих. Инъекции 0.75 M NaCl приводили к появлению сигнала CIC-5 в виде яркой узкой полосы флуоресценции непосредственно под щеточной каемкой эпителиоцитов [31]. Возможно, рецепторный захват белка является триггером транспорта CIC-5 из везикулярного компартмента субапикальной цитоплазмы и надъ-

ядерной области эпителиоцитов в зону апикальной мембраны. Таким образом, у лягушек в условиях гипернатриемии можно констатировать повышение количества CIC-5 и его аккумуляцию вблизи цитоплазматической мембраны эпителиальных клеток. С другой стороны, в настоящем исследовании гипернатриемия приводила к снижению реабсорбции и замедлению транспорта белка, значительная часть которого задерживалась в апикальных эндосомах вместе с мегалином. Можно полагать, что участие CIC-5 в процессе эндоцитоза белка в условиях гипернатриемии снижается, несмотря на установленное увеличение его количества в эпителиоцитах, стимулом к которому могло быть повышение содержания Na^+ и Cl^- в просвете канальцев.

К сожалению, пока неизвестно, как в условиях гипернатриемии изменяется транспорт Na^+ , Cl^- и воды в люминальной мембране, что может влиять на характер функционирования CIC-5. Установлено, что CIC-5 является везикулярным $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обменником [21], но до конца не понятно, как этот антипорт способен нейтрализовать протонный насос, поскольку обеспечивает отток H^+ во время АТФ-зависимого подкисления эндосом. Существует мнение о том, что функции CIC-5 гораздо шире простого шунтирования протонного насоса, и CIC-5 может участвовать в механизмах модуляции проницаемости и электрического заряда мембран везикул [21, 44]. Предполагается, что нарушение эндоцитоза при болезни Дента является результатом не только снижения подкисления эндосом [22], оно может быть связано с “разобщением” градиентов Cl^- и H^+ в цитозоле и везикулах [45].

Согласно представленным результатам и изученным ранее эффектам введения гипертонического раствора NaCl на содержание в крови Na^+ и Cl^- , а также на ионо- и осморегулирующую функции почек у лягушек [31] мы считаем, что проявлением адаптивной реакции организма лягушек на уровне проксимальных канальцев почек прежде всего будут изменения транспорта воды и ионов в эпителиоцитах. Можно полагать, что в условиях гипернатриемии включаются механизмы гомеостатической регуляции, противодействующие внутриклеточной дегидратации и направленные на восстановление осмотического равновесия и объема клеток, а процесс реабсорбции белков приобретает второстепенное значение, что проявляется в снижении захвата и замедлении везикулярного транспорта белков.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея, планирование и дизайн экспериментов (Н.П.П., Е.В.С.), проведение опытов и сбор первичных данных (Н.П.П., Е.В.С.), иммуногистохимические исследования и конфокальная микроскопия (Е.В.С.), конфокальная микроскопия, анализ изображений и стати-

стическая обработка данных, подготовка иллюстраций (Н.П.П.), написание и редактирование текста рукописи (Н.П.П., Е.В.С.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 11-1/2022 от 24.11.2022).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00264-24-00 на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН (ЦКП ИЭФБ РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Д.А. Сибарову за консультативную помощь в использовании программного модуля для обработки изображений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burggren WW, Warburton S (2007) Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *Ilar J* 48 (3): 260–269. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.3.260>
2. Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R (2009) Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflügers Arch* 458 (6): 1039–1048. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0685-8>
3. Kumari S, Mg S, Mayor S (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research* 20: 256–275. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.19>
4. De S, Kuwahara S, Saito A (2014) The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes* 4 (3): 333–355. <https://doi.org/10.3390/membranes4030333>
5. Moestrup SK, Verroust PJ (2001) Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 21: 407–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.407>
6. Christensen E, Birn H (2002) Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (4): 258–267. <https://doi.org/10.1038/nrm778>
7. Saito A, Sato H, Iino N, Takeda T (2010) Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2010: 403272. <https://doi.org/10.1155/2010/403272>

8. Christensen EI, Birn H, Storm T, Weyer K, Nielsen R (2012) Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)* 27 (4): 223–236.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2012>
9. Anzenberger U, Bit-Avragim N, Rohr S, Rudolph F, Dehmel B, Willnow TE, Abdelilah-Seyfried S (2006) Elucidation of megalin/LRP2-dependent endocytic transport processes in the larval zebrafish pronephros. *J Cell Sci* 119: 2127–2137.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02954>
10. Christensen E, Raciti D, Reggiani L, Verroust PJ, Brändli AW (2008) Gene expression analysis defines the proximal tubule as the compartment for endocytic receptor-mediated uptake in the *Xenopus* pronephric kidney. *Pflügers Arch* 456 (6): 1163–1176.
<https://doi.org/10.1007/s00424-008-0488-3>
11. Seliverstova EV, Romanova IV, Prutskova NP (2021) Molecular determinants of protein reabsorption in the amphibian kidneys. *Acta Histochem* 123 (6): 151760.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151760>
12. Prutskova NP, Seliverstova EV (2013) Absorption capacity of renal proximal tubular cells studied by combined injections of YFP and GFP in *Rana temporaria* L. *Comp Biochem Physiol A* 166: 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.05.022>
13. Seliverstova EV, Prutskova NP (2015) Receptor-mediated endocytosis of lysozyme in renal proximal tubules of the frog *Rana temporaria*. *Eur J Histochem* 59 (2): 2482.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2482>
14. Dantzer WH (2016) Transport of Inorganic Ions by Renal Tubules. In: *Comparative Physiology of the Vertebrate Kidney*. Springer, NY: 81–157.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3734-9_4
15. Uchiyama M, Konno N (2006) Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. *Gen Comp Endocrinol* 147 (1): 54–61.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.018>
16. Hunter M, Horisberger JD, Stanton B, Giebisch G (1987) The collecting tubule of *Amphiuma*. I. Electrophysiological characterization. *Am J Physiol Renal Physiol* 253: F1263–F1272.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1987.253.6.F1263>
17. Stoner LC, Engbretson BG, Viggiano SC, Benos DJ, Smith PR (1995) Amiloride-sensitive apical membrane sodium channels of everted *Ambystoma* collecting tubule. *J Membr Biol* 144 (2): 147–156.
<https://doi.org/10.1007/BF00232800>
18. Konno N, Hyodo S, Yamada T, Matsuda K, Uchiyama M (2007) Immunolocalization and mRNA expression of the epithelial Na⁺ channel α -subunit in the kidney and urinary bladder of the marine toad, *Bufo marinus*, under hyperosmotic conditions. *Cell Tissue Res* 328 (3): 583–594.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0383-9>
19. Kumano T, Konno N, Wakasugi T, Matsuda K, Yoshizawa H, Uchiyama M (2008) Cellular localization of a putative Na⁺/H⁺ exchanger 3 during ontogeny in the pronephros and mesonephros of the Japanese black salamander (*Hynobius nigrescens* Stejneger). *Cell Tissue Res* 331: 675–685.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0544-x>
20. Schmieder S, Lindenthal S, Ehrenfeld J (2002) Cloning and characterisation of amphibian ClC-3 and ClC-5 chloride channels. *Biochim Biophys Acta* 1566 (1–2): 55–66.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00594-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00594-1)
21. Jentsch TJ (2015) Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function, and pathophysiology. *J Physiol* 593 (18): 4091–4109.
<https://doi.org/10.1113/JP270043>
22. Günter W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ (1998) ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (14): 8075–8080.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8075>
23. Schwake M, Friedrich T, Jentsch TJ (2001) An internalization signal in ClC-5, an endosomal Cl-channel mutated in Dent's disease. *J Biol Chem* 276 (15): 12049–12054.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010642200>
24. Christensen EI, Devuyst O, Dom G, Nielsen R, Van der Smitten P, Verroust P, Leruth M, Guggino WB, Courtoy PJ (2003) Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (14): 8472–8477.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1432873100>
25. Ferreira HG, Jesus CH (1973) Salt adaptation in *Bufo bufo*. *J Physiol* 228 (3): 583–600.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010101>
26. Katz U (1989) Strategies of adaptation to osmotic stress in anuran Amphibia under salt and burrowing conditions. *Comp Biochem Physiol A* 93 (3): 499–503.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90001-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90001-7)
27. Scheer BT, Mumbach MW (1982) Fluxes of sodium ion in frogs (*Rana esculenta*) acclimated to solutions of NaCl in lake water and effects of hypophysectomy. *Comp Biochem Physiol* 72A (3): 549–558.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90121-9)
28. Pang PKT (1977) Osmoregulatory functions of neurohypophysial hormones in fishes and amphibians. *Amer Zool* 17: 739–749.
<https://doi.org/10.1093/icb/17.4.739>
29. Nouwen EJ, Kühn ER (1985) Volumetric control of arginine vasotocin and mesotocin release in the frog (*Rana ridibunda*). *J Endocrinol* 105 (3): 371–377.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1050371>
30. Muir TJ, Costanzo JP, Lee RE Jr (2007) Osmotic and metabolic responses to dehydration and urea-loading in a dormant, terrestrially hibernating frog. *J Comp Physiol B* 177 (8): 917–926.
<https://doi.org/10.1007/s00360-007-0190-3>
31. Prutskova NP, Seliverstova EV, Kutina AV (2023) Effect of changes in water-salt balance on ion- and osmoregulatory renal functions in the lake frog. *Lab Animal Sci* 3: 44–53.
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-03>
32. Gburek J, Birn H, Verroust PJ, Goj B, Jacobsen C, Moestrup SK, Willnow TE, Christensen EI (2003) Renal uptake of myoglobin is mediated by the endocytic receptors megalin and cubilin. *Am J Physiol Renal Physiol* 285 (3): F451–F458.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00062>

33. Lee D, Gleich K, Fraser SA, Katerelos M, Mount PF, Power DA (2013) Limited capacity of proximal tubular proteolysis in mice with proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1009–F1019.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00601.2012>
34. Schnermann J, Wahl M, Liebau G, Fischbach H (1968) Balance between tubular flow rate and net fluid reabsorption in the proximal convolution of the rat kidney. I. Dependency of reabsorptive net fluid flux upon proximal tubular surface area at spontaneous variations of filtration rate. *Pflügers Arch* 304: 90–103.
<https://doi.org/10.1007/BF00586722>
35. Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D (1979) Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int* 16: 251–270.
<https://doi.org/10.1038/ki.1979.128>
36. Cojocel C, Maita K, Baumann K, Hook JB (1984) Renal processing of low molecular weight proteins. *Pflügers Arch* 401 (4): 333–339.
<https://doi.org/10.1007/bf00584332>
37. Lazzara MJ, Deen WM (2007) Model of albumin reabsorption in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 292 (1): F430–F439.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00010.2006>
38. Smithies O (2003) Why the kidney glomerulus does not clog: A gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. *PNAS* 100: 4108–4113.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0730776100>
39. Prutskova NP, Seliverstova EV (2011) Tubular GFP uptake pattern in the rat and frog kidneys. *Comp Biochem Physiol A* 160: 175–183.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.029>
40. Pohl M, Shan Q, Petsch T, Styp-Rekowska B, Matthey P, Bleich M, Bachmann S, Theilig F (2015) Short-term functional adaptation of aquaporin-1 surface expression in the proximal tubule, a component of glomerulotubular balance. *J Am Soc Nephrol* 26: 1269–1278.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2014020148>
41. Günter W, Piwon N, Jentsch TJ (2003) The CIC-5 chloride channel knock-out mouse – an animal model for Dent's disease. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 445: 456–462.
<https://doi.org/10.1007/s00424-002-0950-6>
42. Sakamoto H, Sado Y, Naito I, Kwon TH, Inoue S, Endo K, Kawasaki M, Uchida S, Nielsen S, Sasaki S, Marumo F (1999) Cellular and subcellular immunolocalization of CIC-5 channel in mouse kidney: Colocalization with H⁺-ATPase. *Am J Physiol* 277 (6): F957–F965.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.6.F957>
43. Wartosch L, Fuhrmann JC, Schweizer M, Stauber T, Jentsch TJ (2009) Lysosomal degradation of endocytosed proteins depends on the chloride transport protein CIC-7. *FASEB J* 23 (12): 4056–4068.
<https://doi.org/10.1096/fj.09–130880>
44. Stauber T, Jentsch TJ (2013) Chloride in vesicular trafficking and function. *Annu Rev Physiol* 75: 453–477.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212–183702>
45. Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ (2010) Endosomal chloride-proton exchange rather than chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science* 328 (5984): 1398–1401.
<https://doi.org/10.1126/science.1188070>

EFFECT OF HYPERNATREMIA ON PROTEIN REABSORPTION IN RENAL PROXIMAL TUBULES OF THE LAKE FROG *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*

N. P. Prutskova[#] and E. V. Seliverstova

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St.-Petersburg, Russia

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

Protein reabsorption in the kidney proximal tubules occurs simultaneously with the transport of ions and water, but little is known about the dependence of receptor-mediated protein endocytosis on water-salt balance changes. The aim of the study was to investigate tubular reabsorption and intracellular vesicular transport of various proteins in a model of hypernatremia in lake frogs (*Pelophylax ridibundus*). Frogs were injected with hypertonic sodium chloride solution (0.75 M NaCl) 1 hour before injection of green or yellow fluorescent proteins (GFP or YFP), as well as lysozyme. The method of fluorescent immunohistochemistry was used for detection of lysozyme and endocytic receptor megalin in kidney sections. Specimens were investigated using laser scanning confocal microscopy. The intensity of fluorescent signals of proteins and megalin in proximal tubular cells was determined on the images obtained. To study the dynamics of endocytosis, an automated method for quantifying colocalized protein and megalin signals was used. A statistically significant decrease in the reabsorption of GFP, YFP and lysozyme in the proximal tubules after 0.75 M of NaCl injection was found. The accumulation of proteins in the early endocytic compartment and decrease in their entry into late endosomes and lysosomes are shown, that is considered as evidence of a delay in intracellular vesicular transport in hypernatremia. The data obtained were analyzed in connection with changes in blood parameters and kidney activity during osmoregulation, and also with the role of chloride channels in receptor-mediated protein endocytosis. It can be assumed that increased ion transport in the proximal tubules cells in hypernatremia leads to decreased reabsorption capacity of epitheliocytes and delayed intracellular transport of proteins.

Keywords: amphibians, lysozyme, megalin, proximal tubule, protein reabsorption, fluorescent protein, chloride channel

МОРФОЛОГИЯ ДОКСОРУБИЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ ОРГАНОПАТИЙ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НИКОТИНАМИД РИБОЗИДА

© 2024 г. Е. Ю. Подъячева*, Н. Ю. Семенова, З. Е. Артюхина,
В. А. Цинзерлинг, Я. Г. Торопова

*Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия*

* e-mail: ekaterinapodyachevaspb@gmail.com

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 11.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Доксорубицин (ДОКС) является одним из наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов антрациклинового ряда, при этом его применение в клинической практике ограничено наличием ярко выраженных побочных эффектов в отношении жизненно важных органов — сердца, почек, легких, печени. На сегодняшний день отсутствуют эффективные препараты, способные снизить системное токсическое действие ДОКС. Никотинамид рибозид (НР) может рассматриваться в качестве перспективного фармакологического агента, способного обеспечивать комплексный защитный эффект от системного влияния токсических эффектов ДОКС. Целью данной работы являлась комплексная морфологическая оценка жизненно важных органов (сердце, легкие, печень, почки) крыс стока Wistar в условиях воздействия ДОКС при внутривенном введении НР в различных режимах в качестве протективного агента. Работа выполнена на 60 самцах крыс весом 283 ± 22 гр. Животные были разделены на 4 группы: интактная, контрольная (внутрибрюшинное введение ДОКС), опытные группы животных (внутрибрюшинное введение ДОКС) с превентивным и сочетанным режимом внутривенного введения НР. По окончании введения фармакологических агентов наблюдение за животными составило 2 месяца. На этапе окончания исследования у наркотизированных животных осуществляли взятие сердца, легких, печени, почек для проведения морфологических исследований. Эхокардиографический анализ осуществлялся с целью подтверждения развития кардиотоксических эффектов ДОКС. В условиях воздействия ДОКС наибольшие морфологические изменения наблюдались в сердце, почках и легких. Используемые схемы введения НР обеспечивали протективный эффект в отношении жизненно важных органов, при этом наиболее выраженное защитное действие НР наблюдалось при использовании превентивного режима.

Ключевые слова: доксорубицин, сердце, почки, печень, легкие, никотинамид рибозид, морфология

DOI: 10.31857/S0044452924030058, **EDN:** YXHEAS

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день доксорубицин (ДОКС) широко применяется при лечении широкого спектра опухолевых заболеваний, включая как солидные опухоли, так и гематологические злокачественные новообразования [1]. ДОКС является одним из наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов антрациклинового ряда, при этом его применение в клинической практике ограничено наличием ярко выраженных побочных эффектов. Наиболее известным и изученным токсическим действием ДОКС является выраженная дозозависимая кардиотоксичность, которая проявляется гибелью кардиомиоцитов посредством апоптоза [2, 3], некроптоза [4], ферроптоза [5], пироптоза [6] и некроза [7], что приводит к дисфункции левого желудочка, развитию

дилатационной кардиомиопатии и, как итог, к формированию хронической сердечной недостаточности. Молекулярные механизмы, лежащие в основе действия ДОКС, многогранны и не до конца изучены, однако хорошо известно, что чередование хиновой и семихиновой структур ДОКС может производить большое количество свободных радикалов (активных форм кислорода, реактивных форм азота). Агрессивное действие свободных радикалов на фоне терапии антрациклинами не только повреждает сердце, но и вовлекает в патологический процесс другие органы, в том числе почки, печень, кишечник и легкие, с последующим нарушением их функции [8–10].

В многочисленных работах было показано, что данный химиопрепарат характеризуется наличием выраженных нефротоксических эффектов. ДОКС оказывает повреждающее действие как на почеч-

ные каналы, так и на почечные клубочки, приводя к выраженной протеинурии [11, 12]. В свою очередь протеинурия на фоне стойкого системного воспаления и активации оксидативного стресса со временем приводит к формированию фиброзных изменений в почках, что значительно снижает их функционирование. В ряде работ были продемонстрированы гепатотоксичные эффекты ДОКС, которые связаны с воспалительной инфильтрацией, увеличением стромального компонента, развитием фиброза, а также апоптозом и локальным некрозом гепатоцитов [13, 14]. Работы, посвященные токсическим эффектам ДОКС в отношении бронхолегочной системы, в литературе практически не представлены. Имеется информация о том, что формирующийся выраженный оксидативный стресс также приводит к нарушению биохимических процессов в легких, оказывая повреждающий эффект как на уровне эпителия бронхов и сосудистого компонента, так и на клеточном уровне. Этому способствуют их большая площадь поверхности и усиленное кровоснабжение [15].

На молекулярном уровне ДОКС способен напрямую ингибировать сиртуины (Silent Information Regulator 2 proteins, SIRT), НАД⁺-зависимые гистоновые деацетилазы, приводя к снижению антиоксидантной защиты, интенсификации процессов апоптоза посредством ацетилирования p53 [16]. Кроме того, ингибирование SIRT1 оказывает блокирующее действие на коактиватор PPAR γ -1 α (PGC1- α), ключевого маркера митохондриального биогенеза [17]. В итоге повышенные уровни свободных радикалов, провоспалительных, проапоптотических факторов и сниженные уровни антиоксидантных ферментов в комплексе с нарушенным митохондриальным биогенезом приводят к ярко выраженным полиорганным токсическим эффектам ДОКС [8, 18].

Поскольку побочные эффекты, связанные с применением ДОКС в клинике, могут существенно ограничивать его использование, отдельное внимание уделяется разработке способов снижения его токсичности. На сегодняшний день отсутствуют эффективные препараты, оказывающие одновременно как кардиопротективное действие, так и защитный эффект на остальные жизненно важные органы организма при проведении химиотерапии антрациклинами.

В качестве перспективного фармакологического агента, способного обеспечивать комплексное защитное воздействие от системного токсического воздействия ДОКС, может рассматриваться никотинамид рибозид (НР), способный быстро нормализовать соотношение НАД⁺/НАДН в клетках организма [19]. В свою очередь, нормализация уровня НАД⁺ стимулирует работу сиртуинов, способных защищать клетки от оксидативного/нитрозативного повреждения, индуцировать аутофагию, восстанавли-

вать биогенез митохондрий, регулировать работу клеточного цикла, тем самым снижая выраженность воспаления и уменьшая процесс фиброобразования [20–24]. Известно, что у пациентов, проходящих химиотерапию, может развиваться ряд побочных эффектов, сказывающихся на функционировании пищеварительного тракта (мукозит кишечника) [25], что может приводить к недостаточной биодоступности НР. Внутривенный способ введения НР, который впервые был предложен авторами [26, 27], позволяя повысить биодоступность фармакологического агента, может явиться альтернативой пероральному способу его введения.

В настоящий момент отсутствуют работы, направленные на исследование комплексного влияния внутривенного введения НР на различные органы в условиях воздействия ДОКС. С учетом предполагаемой способности НР оказывать кумулятивный эффект, отдельный интерес представляет оценка влияния НР при различных режимах (превентивном и сочетанном) его использования.

В связи с этим целью данной работы являлась комплексная морфологическая оценка жизненно важных органов (сердце, легкие, печень, почки) крыс стока Wistar в условиях воздействия ДОКС при внутривенном введении НР в различных режимах в качестве протективного агента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакологические агенты

Подготовка фармакологических агентов (Доксорубицин-ЛЭНС®, 50 мг (ООО “Верофарм”, Россия) и никотинамид рибозид (Kingherbs Limited, Китай)) для введения животным осуществлялась непосредственно перед использованием (*ex tempore*). Используемые дозы подобраны эмпирическим путем с учетом литературных и собственных данных [28, 29]. Расчет доз осуществлялся в зависимости от массы животного. Препараты разводили в 0.9% стерильном физиологическом растворе. В ходе эксперимента дозы корректировались с учетом изменения массы животных.

Экспериментальный протокол

В исследовании использовали 60 половозрелых самцов крыс стока Wistar SPF-статуса массой 283 ± 22 г. Животные содержались в виварии барьерного типа в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище. Выбор экспериментальных животных и их количество были основаны на опубликованных ранее данных по моделированию ДОКС-индуцированной кардиомиопатии [29], а также с учётом on-line программы (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>). Животные были случай-

ным образом распределены на 4 экспериментальные группы, характеристика которых представлена в табл. 1.

Животные находились под наблюдением в течение 2 месяцев после достижения кумулятивной дозы ДОКС, что является достаточным для реализации его отсроченных эффектов, а именно фиброзного поражения миокарда и развития систолической дисфункции. Эхокардиограмму регистрировали перед началом введения ДОКС, по окончании его введения, а также через 1 и 2 месяца. На момент окончания эксперимента животные подвергались наркотизации (10 мг/кг ксилазина + 25 мг/кг золетила, внутримышечно), затем осуществлялось взятие сердца, легких, почек, печени для проведения морфологического исследования. Для остановки сердца в левый желудочек вводили 10 % раствор KCl до полной остановки сердечной деятельности в фазе диастолы. Животных взвешивали на лабораторных весах (DX 1200 WP, AND, Япония) каждые два дня с начала и до окончания введения фармакологических агентов, затем один раз в неделю.

Эхокардиографическое исследование

Для верификации развития хронической ДОКС-индуцированной кардиомиопатии было проведено эхокардиографическое исследование. Перед проведением эхокардиографии животное наркотизировалось (1.7 % изофлюран). Эхокардиографические изображения были получены при стабилизации частоты сердечных сокращений на уровне 400 ± 30 ударов в мин. Эхокардиограмму регистрировали при помощи ультразвуковой визуализационной платформы The Vevo® 2100 (VisualSonics Inc., Торонто, Канада). Анализ объема и функции сердца проводили в М-режиме (одномерное сканирование). Измеряли конечно-диастолический внутренний диаметр

левого желудочка (LVIDd, мм), конечно-систолический внутренний диаметр левого желудочка (LVIDs, мм). Фракцию укорочения (FS) рассчитывали по формуле: $FS (\%) = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100$.

Морфологическое исследование

Органы фиксировали в 10 % забуференном формалине. Обезживание и пропитывание парафином проводили по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Vip5Jr (Sakura, Япония) в готовом растворе IsoPREP (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия). С использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, Уолтем, Массачусетс, США) изготавливали срезы толщиной 2–3 мкм, которые в дальнейшем депарафинировали, дегидратировали в соответствии с рекомендациями производителя (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия).

Микроскопическое исследование и фоторегистрацию проводили на микроскопе Nis-E (Nikon, Япония) при увеличении ×40, ×100, ×200, ×400.

Для анализа гистологических изменений были выбраны параметры, отражающие отклонения от гистологической нормы, специфические для каждого органа, в том числе дистрофические изменения в клетках паренхимы и стромы, нарушения кровообращения, воспалительная инфильтрация, наличие коллагенового фиброза.

Морфометрическую оценку части параметров проводили с использованием программ морфометрии Nis-Elements 4.3 Br (Nikon, Токио, Япония) и ORBIT IMAGE ANALYSIS Version 3.64, а также полуколичественно в баллах по шкале от 0 до 3, где 0 – отсутствие выраженности признака, 1 – слабая выраженность, 2 – умеренная выраженность, 3 – сильная выраженность.

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп

Группы, n	Препараты	Дозы	Режим введения (продолжительность)	Кумулятивные дозы
Контроль (n = 15)	0.9 % хлорида натрия	1 мл	6-кратное в/б введение с интервалом в 2 дня (2.5 недели)	6 мл
ДОКС (n = 15)	Доксорубицин	1.67 мг/кг	6-кратное в/б введение с интервалом в 2 дня (2.5 недели)	10 мг/кг
НР+ДОКС (n = 15)	Никотинамид рибозид + Доксорубицин	300 мг/кг + 1.67 мг/кг	Сочетанный режим 6-кратное введение с интервалом в 2 дня: в/в НР → 30 мин → в/б доксорубицин (2.5 недели)	1800 мг/кг + 10 мг/кг
НР/НР+ДОКС (n = 15)	Никотинамид рибозид + Доксорубицин	300 мг/кг + 1.67 мг/кг	Превентивный режим 3-кратное в/в введение с интервалом в 2 дня НР → 6-кратное в/б введение доксорубицина с чередованием через раз в/в введением НР (3 раза) (3.5 недели)	1800 мг/кг + 10 мг/кг

в/б — внутрибрюшинное введение; в/в — внутривенное введение.

Для определения степени коллагенового фиброза проводили гистохимическую окраску “по Маллори” (“Биовитрум”, Санкт-Петербург, Россия). Морфометрические исследования проводили с использованием программ Nis-Elements 4.3 Br (Nikon, Токио, Япония) и ORBIT IMAGE ANALYSIS Version 3.64. На каждой фотографии определяли площадь (маска слоя в программе по цвету), занятую коллагеновыми волокнами (синий цвет), и затем вычисляли относительную площадь в процентах от общей площади среза.

Оценка фиброза выполнялась в разных областях левого желудочка сердца. Отдельно оценивались участки левого желудочка с кардиомиоцитами и интерстициальной тканью (“интерстициальный фиброз”), артерии среднего калибра в поперечном сечении (“периваскулярный фиброз”), эпикард. Обработывалось по 5 полей зрения в каждой зоне на каждое животное. По каждой зоне вычислялось среднее арифметическое значение (М) на исследуемый образец. “Фиброз по всем зонам” определялся как сумма средних значений по зонам. В табл. 3 результаты представлены как Ме — на образец по 5 фотографиям подсчитывали среднее арифметическое значение (М), а на группу медиану (Ме).

В легких определяли площадь свободного альвеолярного пространства в% ко всей площади альвеолярной ткани на поле зрения, оценку проводили по 5 полям зрения при увеличении $\times 400$. Фиброз в легких оценивали по 5 полям зрения при увеличении $\times 400$. На каждой фотографии определяли площадь, занятую коллагеновыми волокнами (синий цвет), и затем вычисляли площадь в процентах от общей площади альвеол.

В печени оценивали количество двухъядерных клеток и перисинусоидальных клеток, в том числе звездчатых клеток Ито и клеток Купфера. Оценку проводили по 5 полям зрения при увеличении $\times 400$ в зоне портального тракта.

Критерии исключения

На начальном этапе исследования: исключались животные, имеющие клинические признаки нарушения здоровья.

Во время исследования:

1. Исключались животные, находящиеся в тяжелом состоянии и подлежащие внеплановой эвтаназии согласно международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных.

2. Животные, не достигающие на дискретных точках целевых показателей:

— показатель фракции укорочения при регистрации эхокардиограммы (менее 10 % от исходного уровня).

Статистический анализ

Расчеты проводились с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, 170 USA) для ОС Windows 10 (Microsoft Inc., США). Для определения нормальности распределения использовался критерий Шапиро–Уилка. Для оценки различий между разными группами использовали непарный непараметрический критерий Крускала–Уоллиса с критерием Данна. Критерий Уилкоксона использовался для попарного сравнения зависимых значений ненормального распределения (ЭХО-данные, * — динамика по сравнению с исходным значением). Значения в группах были обработаны с использованием непараметрической статистики (медиана и 25-й и 75-й проценти (Ме (25 %;75 %)). Количественные показатели гистологических изменений, выраженные в баллах, были описаны с использованием средних арифметических значений (М) и ошибки среднего значения (m) (В баллах измеряли те показатели, которые не подсчитывали морфометрически. Морфометрические показатели (а именно% фиброза) представлены в формате Ме [25 %;75 %].) Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе эксперимента гибели животных не наблюдалось. Оснований для проведения внеплановой эвтаназии животных также не отмечалось.

Сократительная функция сердца

В динамике эксперимента у контрольной группы животных эхокардиографические показатели не изменялись. Через 1 месяц после окончания введения ДОКС у животных наблюдалось достоверное увеличение LVIDs и LVIDd (табл. 2), и как следствие, снижение фракции укорочения, что свидетельствует о нарушении сократительной функции миокарда. При использовании сочетанного режима НР в динамике эксперимента не было выявлено значимого увеличения LVIDd, а также на втором месяце исследования не отмечалось достоверной разницы с контрольной группой животных по фракции укорочения (табл. 2), что может косвенно отражать снижение токсического действия ДОКС в отношении кардиомиоцитов. Превентивный режим введения НР характеризовался значимым увеличением как LVIDs, так и LVIDd, аналогично ДОКС группе животных.

Морфологические особенности миокарда крыс

В образцах группы животных ДОКС не отмечалось ярко выраженной воспалительной инфильтрации и проявлений некроза. Однако выявлялись слабовыраженные дистрофические изменения кардиомиоци-

Таблица 2. Изменение показателей LVIDs, LVIDd и FS у экспериментальных животных в динамике эксперимента

Параметры		Контроль	ДОКС	НР+ДОКС	НР/ НР+ДОКС
LVIDs	Исходно	3.09 [2.97; 3.41]	2.85 [2.73; 3.03]	2.91 [2.74; 3.27]	2.98 [2.72; 3.12]
	Окончание введения	3.27 [3.04; 3.37]	3.24 [3.07; 3.60]*	2.98 [2.93; 3.31]	3.55 [3.31; 3.74]**
	1-й месяц	3.14 [2.99; 3.57]	3.41 [3.02; 3.85]***	3.59 [3.26; 3.89]**	3.42 [3.06; 3.64]
	2-й месяц	3.33 [2.88; 3.47]	3.53 [3.25; 3.73]***	3.42 [3.06; 3.72]*	3.92 [3.52; 4.22]***
LVIDd	Исходно	6.36 [6.20; 6.61]	6.14 [5.99; 6.34]	6.37 [6.03; 6.61]	6.35 [6.06; 6.53]
	Окончание введения	6.74 [6.34; 6.84]	6.31 [6.12; 6.46]	6.34 [6.18; 6.55]	6.77 [6.60; 6.99]**
	1-й месяц	6.78 [6.48; 7.00]	6.55 [6.31; 6.79]**	6.49 [6.32; 7.10]	6.81 [6.36; 6.89*]
	2-й месяц	6.74 [6.53; 6.96]	6.57 [6.42; 6.85]**	6.53 [6.08; 6.08]	6.82 [6.47; 7.09]**
FS	Исходно	50.21 [47.98; 53.56]	54.22 [50.53; 55.51]	53.55 [51.82; 56.21]	53.98 [50.23; 57.15]
	Окончание введения	51.61 [50.00; 53.74]	48.89 [43.96; 49.99]**/#	51.71 [47.76; 53.29]	46.79 [44.89; 51.67]#
	1-й месяц	52.63 [48.77; 54.24]	48.61 [42.47; 52.02]**/#	45.37 [44.81; 49.56]***/#	49.90 [46.64; 52.74]
	2-й месяц	51.05 [49.50; 56.63]	47.50 [43.53; 48.79]***/#	47.94 [43.20; 51.17]**	42.92 [39.29; 45.69]***/###

* – по сравнению с исходным значением; # – по сравнению с контрольной группой. (*/# – $p < 0.05$, **/## – $p < 0.01$, ***/### – $p < 0.001$). LVIDs, конечно-систолический размер левого желудочка; LVIDd, конечно-диастолический размер левого желудочка; FS, фракция укорочения. Значения представлены Ме [25%;75 %].

тов с вакуолизацией цитоплазмы, стиранием контуров клеток. Также определялись единичные клетки с признаками апоптоза (кариопикноз, кариорексис, конденсация хроматина), единичные лимфоциты, полнокровие капиллярной сети разной степени выраженности. В контрольной группе этих паттернов не было отмечено. Данные морфологические особенности могут являться токсическими проявлениями действия ДОКС, что также подтверждается достоверно значимым снижением фракции укорочения по данным эхокардиографии. У части животных НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС групп также отмечались слабовыраженные дистрофические изменения, однако клеток с признаками апоптоза не было обнаружено (рис. 1).
Результаты гистохимической окраски по Маллори по исследуемым зонам в сердечной мышце приведены в табл. 3. При оценке интерстициального фиброза статистически значимых отличий между группами не было обнаружено (рис. 2). Однако периартериально выявлялось достоверно значимое

увеличение относительной площади коллагеновых волокон у животных опытных групп по сравнению с контрольной (менее выражено у животных НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС групп по сравнению с ДОКС группой) (рис. 3).
В эпикардальной зоне отмечалось статистически значимое повышение процента фиброза у животных ДОКС группы по сравнению с контрольной и НР/НР+ДОКС группами (рис. 4). При оценке относительной площади фиброза по всем зонам наблюдалось достоверное увеличение относительной площади коллагеновых волокон у всех опытных групп по сравнению с контрольной, но наиболее выраженное увеличение отмечалось у животных ДОКС группы.
В целом фиброз был более выражен в зоне эпикарда и вокруг сосудов (в основном артерий), чем между кардиомиоцитами в толще интерстициальной ткани. Это связано с наличием в этих участках большего количества стромальных клеток, которые

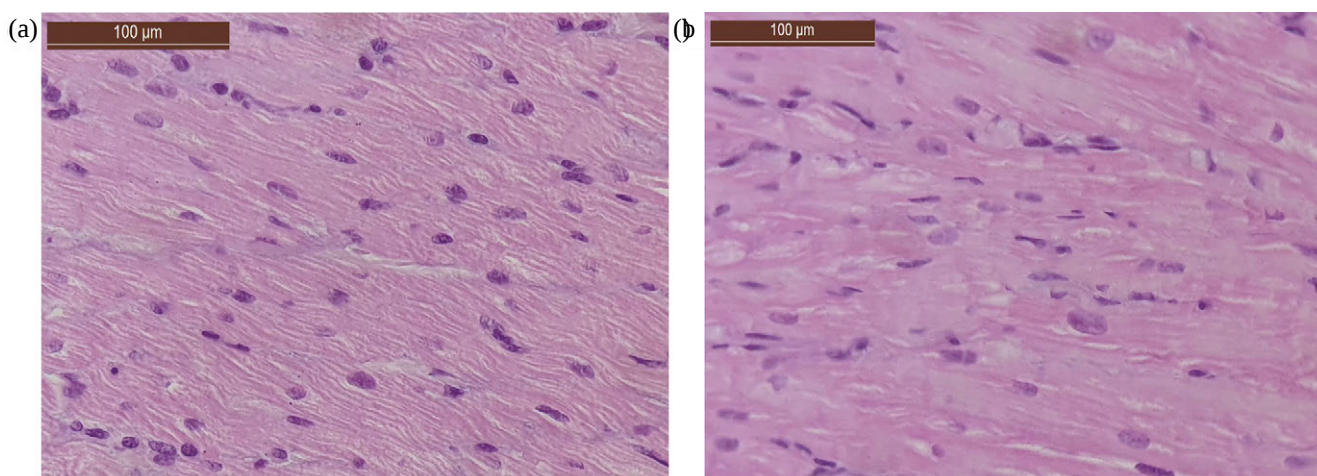


Рис. 1. Репрезентативные фотографии сердца животных экспериментальных групп. (а) — контроль; (б) — ДОКС. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$.

Таблица 3. Морфометрические значения (% площади коллагеновых волокон) в сердечной мышце у животных экспериментальных групп

Группы	Зоны для морфометрической оценки в сердечной мышце			
	Интерстиций	Сосуды	Эпикард	Фиброз по всем зонам
Контроль	1.81 [1.22; 2.05]	2.30 [2.04; 2.81]	1.40 [1.17; 1.95]	1.76 [1.65; 2.08]
ДОКС	1.40 [1.35; 2.22]	4.45 [3.82; 5.12]***	2.12 [1.58; 2.55]	2.47 [2.12; 3.06]***
НР+ДОКС	1.10 [1.03; 1.34]	3.45 [2.85; 5.34]**	1.82 [1.22; 2.18]	2.15 [1.87; 2.45]*
НР/НР+ДОКС	1.48 [1.15; 1.41]	3.6 [3.15; 4.79]**	1.58 [1.25; 1.87]#	2.08 [1.95; 2.37]**/#

* — по сравнению с контрольной группой (* — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$); # — по сравнению с группой ДОКС (# — $p < 0.05$, ## — $p < 0.01$). Значения представлены Ме [25%; 75%].

вырабатывают коллаген. Результаты оценки процента фиброза у животных в группе НР/НР+ДОКС показали снижение параметров как в эпикардиальной зоне, так и по общей площади фиброза по сравнению с животными ДОКС группы ($p < 0.05$).

Результаты морфологических исследований сердечной мышцы животных разных групп свидетельствуют о том, что введение НР обеспечивает снижение кардиотоксических эффектов ДОКС. По данным оценки фиброза по всем зонам и фиброза в зоне эпикарда превентивный режим введения НР обеспечивает более выраженное защитное действие.

Морфологические особенности легких крыс

В легких группы животных ДОКС отмечался слабо и умеренно выраженный катаральный бронхит с экссудацией слизисто-белковых масс в просвет и десквамацией клеток эпителия. Альвеолярная ткань в большинстве случаев сохраняла воздуш-

ность, однако встречались нерегулярные зоны дислектаза и умеренно и ярко-выраженное полнокровие с явлениями стаза в эктазированных сосудах мелкого калибра. Отмечалась интерстициальная и перибронхиальная слабовыраженная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация. Вокруг сосудов и бронхов определялись отложения коллагеновых волокон от умеренного до ярко выраженного, также выявлялись дистрофические изменения мышечных слоев стенки сосудов (рис. 5). Толщина межальвеолярных перегородок в образцах ДОКС группы была больше, чем в контроле, а процент свободного альвеолярного пространства снижался (рис. 6). В большей степени это связано с отеком, полнокровием капилляров и интерстициальной инфильтрацией, но может быть связано и с пролиферацией стромального компонента легких. При окраске по Маллори в тканях легкого в зоне альвеол отмечалось увеличение процента коллагеновых волокон (интерстициальный фиброз слабой степени выраженности) (рис. 7). Все описанные повреждения свидетельствуют о значительном повреждающем действии ДОКС на ткани легких.

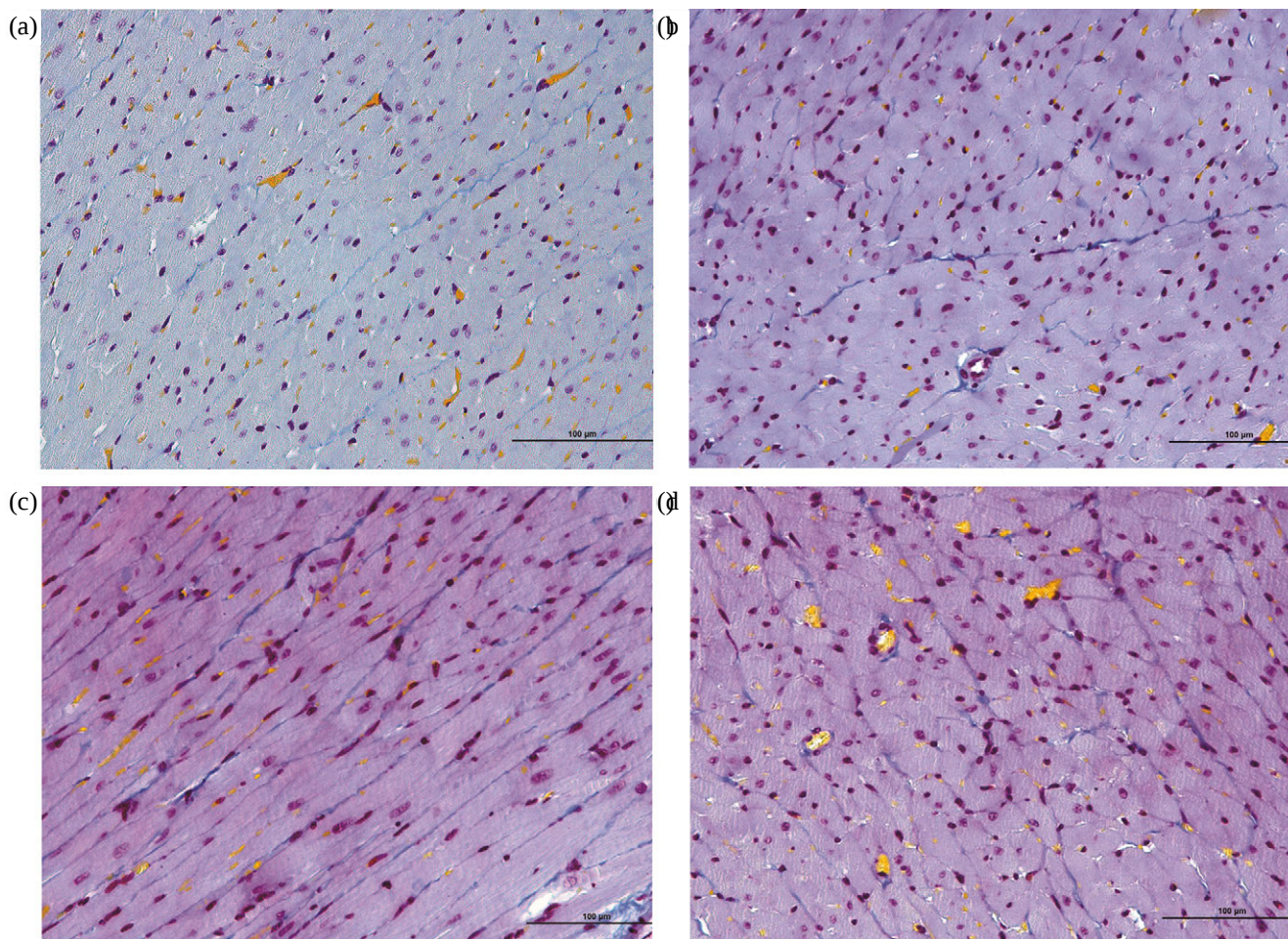


Рис. 2. Репрезентативные фотографии сердца (интерстициальная зона) животных экспериментальных групп. Синим цветом окрашены коллагеновые волокна. (a) — контроль; (b) — ДОКС; (c) — НР+ДОКС; (d) — НР/НР+ДОКС. Окраска по Маллори, $\times 200$.

В группах животных НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС также отмечались морфологические паттерны — бронхит, фиброз и интерстициальная воспалительная инфильтрация, как и в группе ДОКС, однако эти параметры статистически достоверно менее выражены в группе НР/НР+ДОКС. Альвеолярная ткань более воздушная в группах НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС, толщина межальвеолярных перегородок приближена к значениям контрольной группы ($p < 0.05$). В табл. 4 представлены данные со средними баллами на группу по морфологическим параметрам.

По результатам статистического анализа в группе НР/НР+ДОКС показано статистически значимое изменение всех параметров при сравнении с группой ДОКС. В группе НР+ДОКС отмечено статистически достоверное увеличение% альвеолярного пространства.

Таким образом, внутривенное введение НР в превентивном режиме оказывает более выраженное протективное действие в отношении легких при проведении включающей ДОКС химиотерапии.

Морфологические особенности печени крыс

В образцах печени группы животных ДОКС отмечались слабо и умеренно выраженные дистрофические изменения, очаговая слабовыраженная лимфоплазмоцитарная воспалительная инфильтрация портальных трактов, неравномерное полнокровие и расширение синусоидных капилляров. Также в некоторых образцах выявился гепатоцеллюлярный и каналикулярный холестаз, были обнаружены единичные гепатоциты с признаками кариорексиса (рис. 8). Фиброзных изменений в печени не обнаружено. В некоторых образцах отмечались локальные проявления мелкокапельной жировой дистрофии гепатоцитов. Данные нарушения свидетельствуют об умеренно выраженном гепатотоксическом воздействии ДОКС.

У животных НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС групп также отмечались морфологические особенности, схожие с группой ДОКС, однако в целом они менее выражены. Явления холестаза не

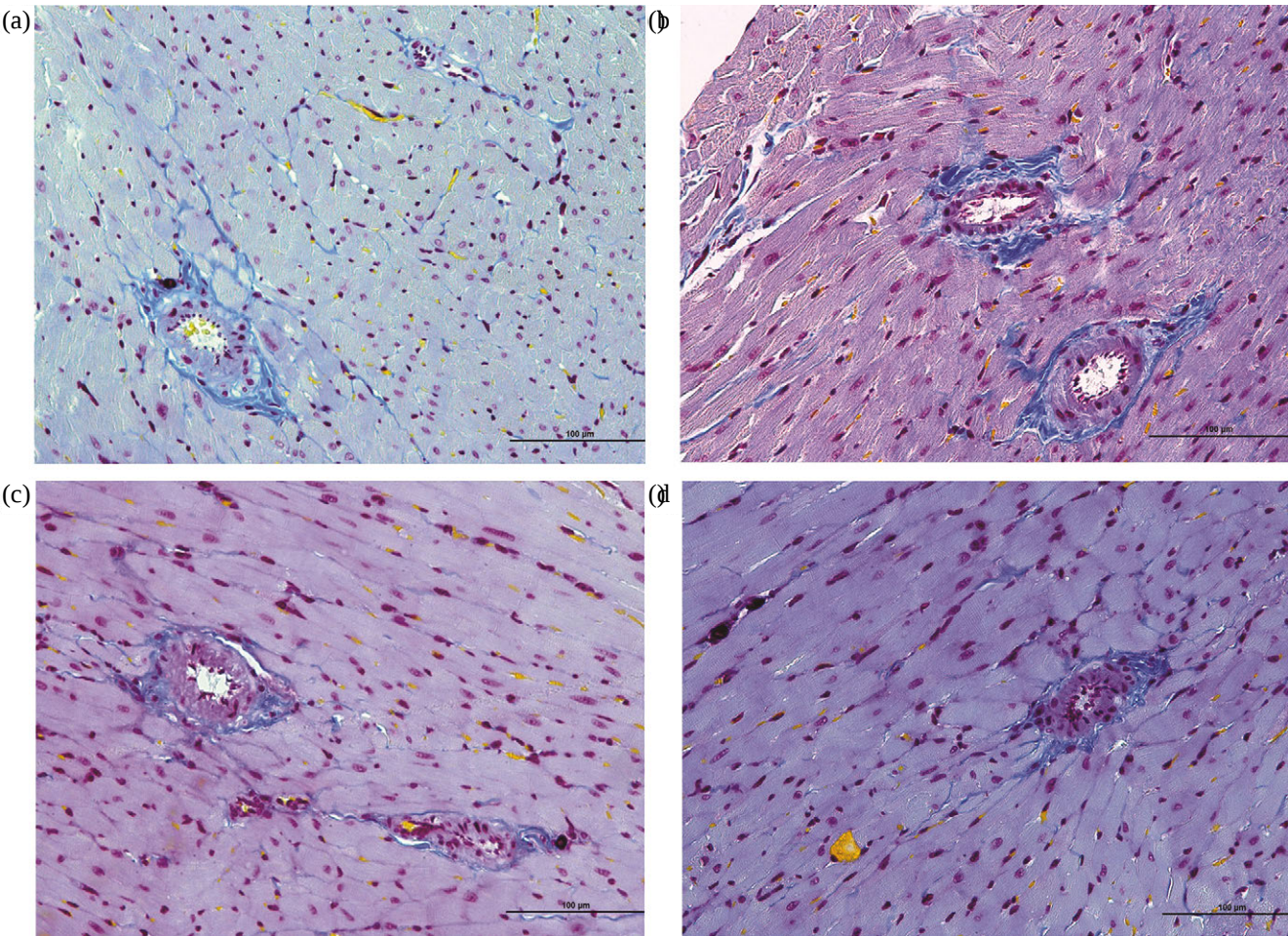


Рис. 3. Репрезентативные фотографии сердца (периваскулярная зона) животных экспериментальных групп. Синим цветом окрашены коллагеновые волокна. (a) – контроль; (b) – ДОКС; (c) – НР+ДОКС; (d) – НР/НР+ДОКС. Окраска по Маллори, $\times 200$.

Таблица 4. Выраженность морфологических изменений в легких животных экспериментальных групп

Группы	Бронхит, баллы	Интерстициальная воспалительная инфильтрация, баллы	Фиброз, % коллагеновых волокон от общей площади альвеол	% альвеолярного пространства
	$M \pm m$	$M \pm m$	Me [25%;75%]	Me [25%;75%]
Контроль	1.20 ± 0.14	0.27 ± 0.06	23.11 [17.41; 27.23]	43.0 [37.34; 47.11]
ДОКС	$1.80 \pm 0.25^*$	$0.60 \pm 0.11^*$	47.32 [32.41; 52.40]*	22.42 [17.24; 26.32]*
НР+ДОКС	1.27 ± 0.45	0.47 ± 0.12	31.81 [29.51; 36.14]	39.11 [33.34; 44.21]#
НР/НР+ДОКС	$1.00 \pm 0.37\#$	$0.40 \pm 0.09\#$	19.90 [17.11; 23.24]#	33.62 [28.17; 36.41]#

* – по сравнению с контрольной группой (* – $p < 0.05$); # – по сравнению с группой ДОКС (# – $p < 0.05$). Значения представлены $M \pm m$ (полуколичественная оценка в баллах) и Me [25%;75%] (морфометрия).

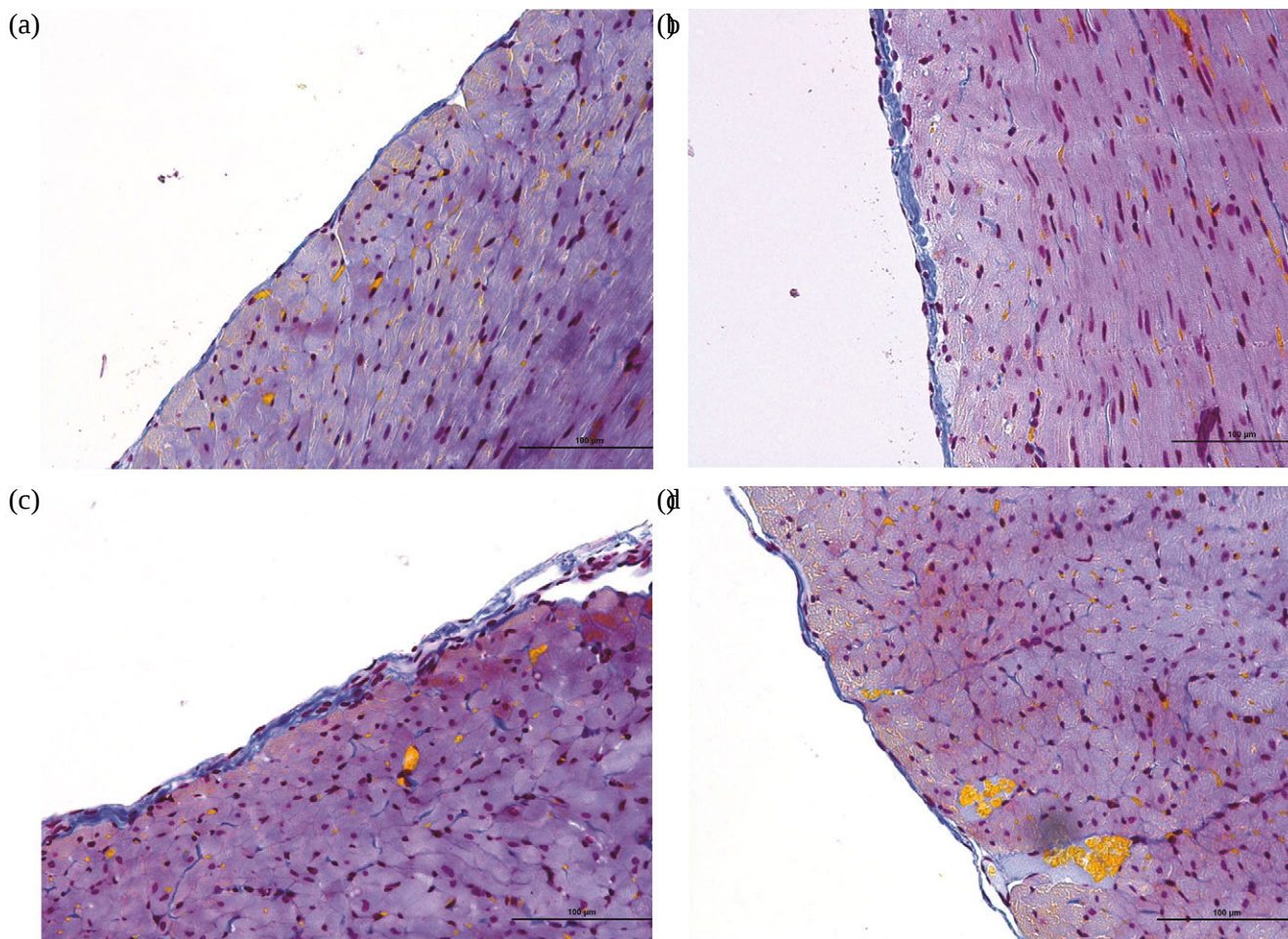


Рис. 4. Репрезентативные фотографии сердца (эпикардальная зона) животных экспериментальных групп. Синим цветом окрашены коллагеновые волокна. (a) – контроль; (b) – ДОКС; (c) – НР+ДОКС; (d) – НР/НР+ДОКС. Окраска по Маллори, $\times 200$.

визуализировались, апоптозы гепатоцитов единичные. Отмечалось расширение просветов и неравномерно выраженное от умеренно до ярко выраженного полнокровие синусоидных капилляров.

В зонах рядом с портальными венами проводили подсчет двухъядерных клеток и перисинусоидальных клеток, в том числе звездчатых клеток Ито и клеток Купфера. Эти клеточные элементы участвуют в воспалительных реакциях и процессах фиброобразования в печени. Результаты представлены в таблице 5. Наибольшее количество клеток обоих типов отмечалось у животных группы ДОКС. В группах НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС количество перисинусоидальных клеток статистически значимо меньше по сравнению с группой ДОКС.

По результатам статистического анализа у животных групп НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС показано статистически значимое изменение ряда параметров при сравнении с группой ДОКС. В группе НР+ДОКС отмечено снижение количества клеток с проявлениями апоптоза, двухъядерных гепатоцитов и перисинусоидальных клеток по сравнению с группой ДОКС, а также снижаются проявления

холестаза. В группе НР/НР+ДОКС отмечено снижение количества двухъядерных гепатоцитов и перисинусоидальных клеток по сравнению с группой ДОКС. Проявления холестаза и апоптоза также отмечались реже, но статистическая достоверность по этим параметрам не была определена.

Таким образом, внутривенное введение НР в превентивном и сочетанном режимах обеспечивает схожий гепатопротективный эффект в условиях воздействия ДОКС, более выраженный в группе превентивного введения.

Морфологические особенности почек крыс

В образцах почек группы животных ДОКС отмечались выраженные дистрофические изменения эпителия канальцев: локальное кистозное расширение канальцев, вакуольная дистрофия, потеря щеточной каймы, атрофия и локальный некроз канальцевого эпителия. В расширенных канальцах визуализируются плотные гиалиновые цилиндры в просвете, что косвенно свидетельствуют о проте-

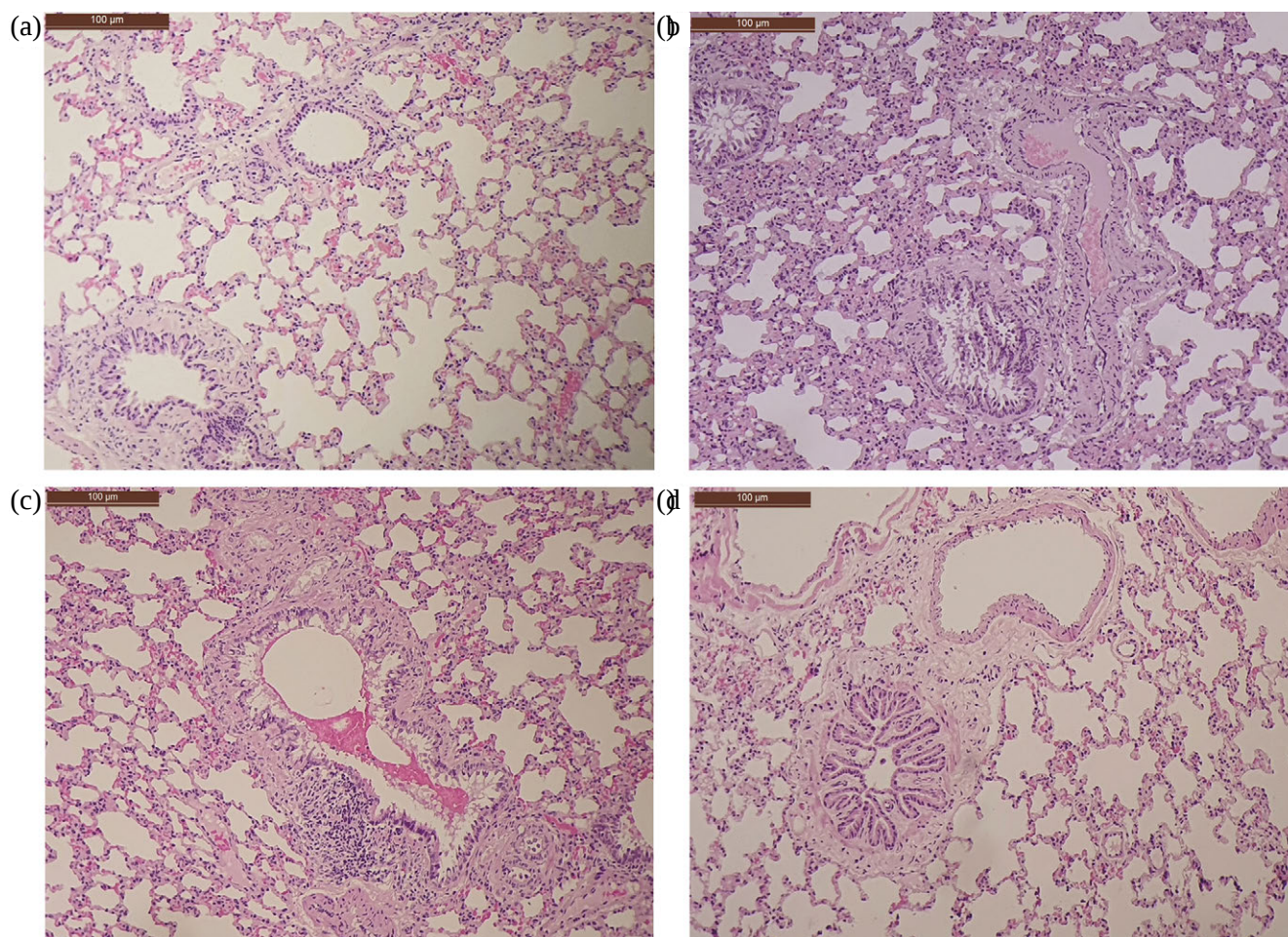


Рис. 5. Репрезентативные фотографии легких животных экспериментальных групп. Разный диаметр альвеол, толщина альвеолярных перегородок, интерстициальная инфильтрация легкого. (a) — контроль; (b) — ДОКС; (c) — НР+ДОКС; (d) — НР/НР+ДОКС. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$.

Таблица 5. Морфометрические параметры печени животных экспериментальных групп

Группы	Перисинусоидальные клетки, количество, морфометрия	Двухъядерные клетки, количество, морфометрия	Холестаз, балл	Кариорексис, балл	Нодулярная воспалительная инфильтрация, балл
	Me [25%;75 %]	Me [25%;75 %]	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Контроль	25.85 [21.21; 27.23]	7.90 [6.51; 9.62]	0	0	0.12 ± 0.09
ДОКС	38.50 [34.64; 46.22]*	12.20 [8.20; 13.40]*	$0.75 \pm 0.12^*$	$1.10 \pm 0.22^*$	$1.20 \pm 0.31^*$
НР+ДОКС	27.50 [25.54; 37.03]#	7.00 [5.0; 9.0]#	$0.13 \pm 0.32^{\#}$	$0.20 \pm 0.03^{\#}$	0.13 ± 0.05
НР/НР+ДОКС	24.80 [21.61; 35.22]#	6.80 [4.55; 7.55]#	0	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02

* — по сравнению с контрольной группой (* — $p < 0.05$); # — по сравнению с группой ДОКС (# — $p < 0.05$). Значения представлены $M \pm m$ (полуколичественная оценка в баллах) и Me [25%;75 %] (морфометрия).

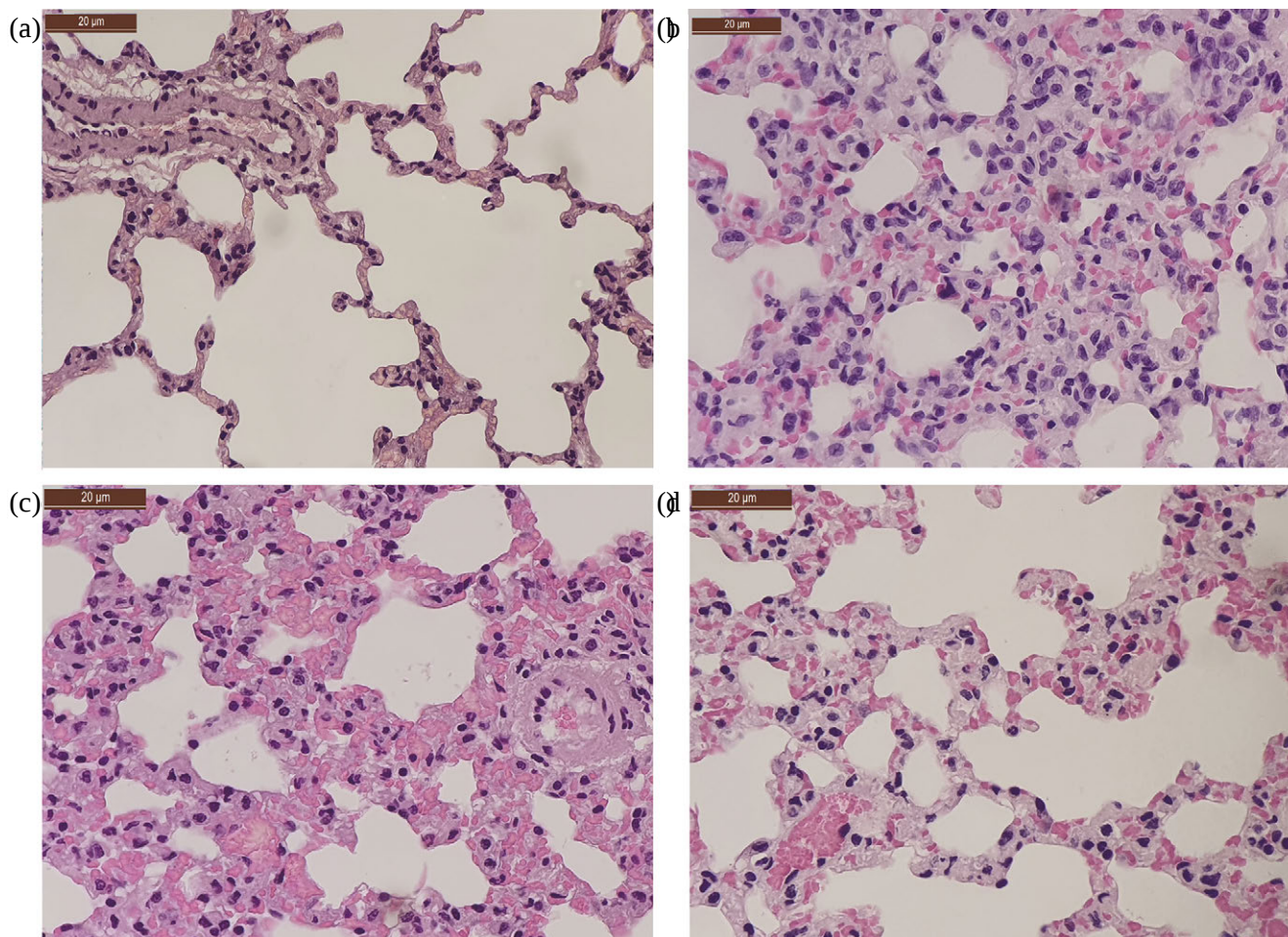


Рис. 6. Репрезентативные фотографии легких животных экспериментальных групп. (а) — контроль, альвеолы нормального строения и кровенаполнения; (б) — ДОКС, слабовыраженная гиперемия и умеренно выраженная инфильтрация лимфоцитами; (с) — НР+ДОКС, умеренно выраженная гиперемия; (д) — НР/НР+ДОКС, умеренно выраженная гиперемия. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$.

урии. В части препаратов выявлялась нодулярная воспалительная инфильтрация в корковом веществе почки, между канальцами. Данные изменения отражают нефротоксическое воздействие химиопрепарата. Также было отмечено полнокровие клубочков разной степени выраженности, при этом воспалительной инфильтрации в клубочках не отмечалось. При окраске по Маллори было выявлено увеличение процента коллагеновых волокон по сравнению с контролем ($p < 0.05$) и очаги фиброза в корковом веществе (рис. 9, 10).

В группах НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС дистрофические изменения эпителия канальцев встречаются в единичных образцах, локально, в целом гистоархитектоника тканей приближена к контрольной группе. Гиалиновые цилиндры единичные, участки некроза эпителия канальцев единичные, воспалительная инфильтрация клетками лимфоидного ряда не отличается от контрольной группы. Данные статистически значимы ($p < 0.05$), представлены в табл. 6.

По результатам статистического анализа в группах НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС показано статистически значимое изменение параметров при сравнении с группой ДОКС. Отмечено снижение показателей фиброза, воспалительной инфильтрации, дистрофических изменений канальцев, некроза и гиалиновых цилиндров до значений, близких к показателям контрольной группы.

Таким образом, внутривенное введение НР в превентивном и сочетанном режимах по ряду исследованных параметров оказывает равнозначное протективное действие на почки при токсическом воздействии ДОКС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ДОКС оказывает повреждающее полиорганное действие, особенно ярко в отношении сердца, почек, легких и печени. Клинически это проявляется в развитии дилатационной кардиомиопатии, приводящей к хронической сердечной

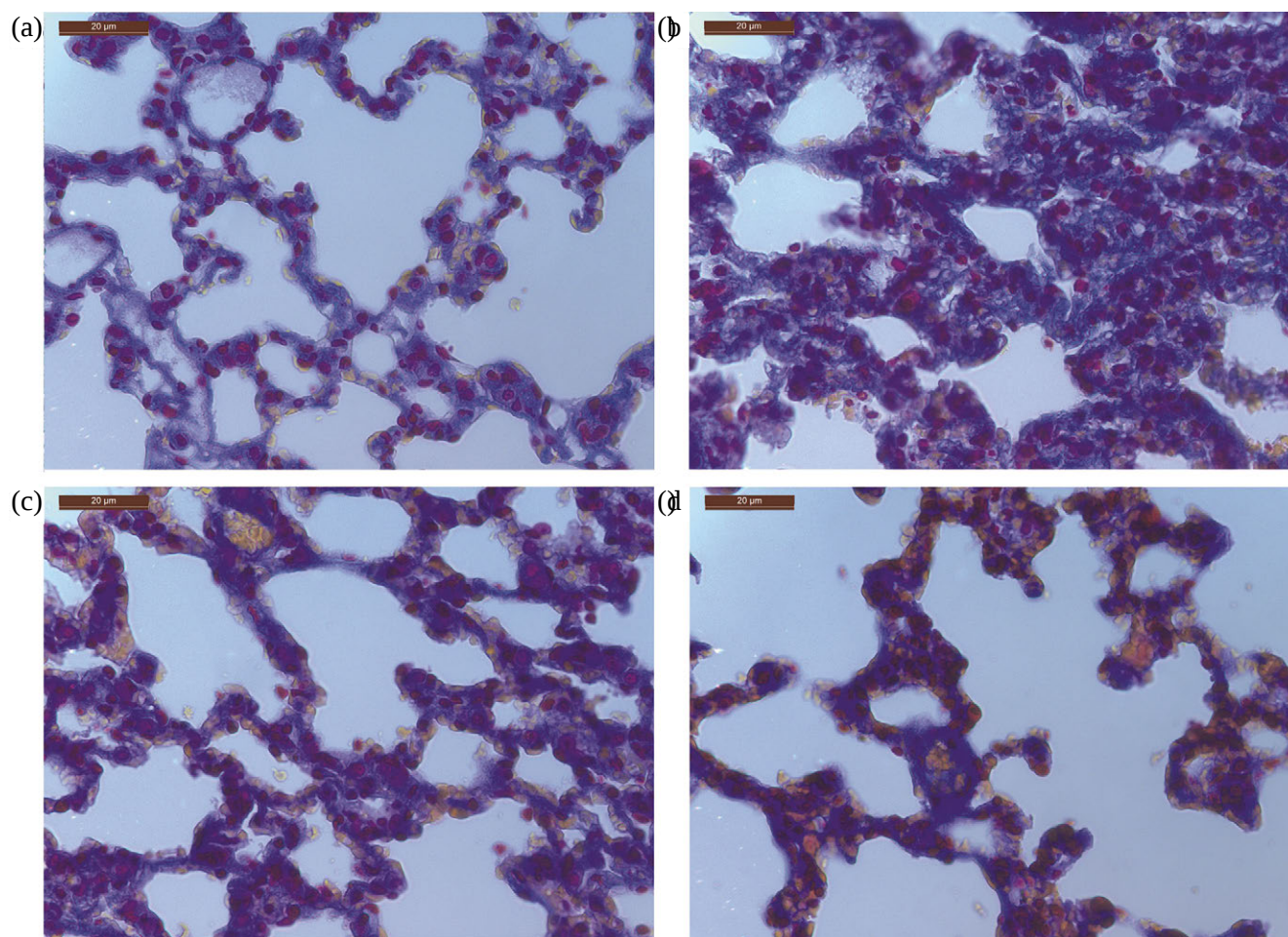


Рис. 7. Репрезентативные фотографии легких животных экспериментальных групп. Синим цветом окрашены коллагеновые волокна. (a) — контроль; (b) — ДОКС; (c) — НР+ДОКС; (d) — НР/НР+ДОКС. Окраска по Маллори, $\times 400$.

Таблица 6. Морфометрические параметры почек животных экспериментальных групп

Группы	Дистрофия канальцев, баллы	Некроз эпителия канальцев, баллы	Нодулярная воспалительная инфильтрация, баллы	Гиалиновые цилиндры, баллы	Фиброз, % коллагеновых волокон от общей площади поля зрения, морфометрия
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$	Me [25%;75 %]
Контроль	0.25	0	0.125 ± 0.08	0	3.84 [1.50;5.20]
ДОКС	$1.6 \pm 0.14^*$	$0.6 \pm 0.01^*$	$1.2 \pm 0.11^*$	$1.1 \pm 0.14^*$	9.20 [6.42;14.30] *
НР+ДОКС	0.27 ± 0.08	$0.06 \pm 0.02\#$	$0.13 \pm 0.04\#$	$0.2 \pm 0.04\#$	5.31 [4.82;7.43] #
НР/НР+ДОКС	$0.08 \pm 0.04\#$	0#	$0.08 \pm 0.02\#$	$0.15 \pm 0.02\#$	4.81 [3.82;5.97] #

* — по сравнению с контрольной группой (* — $p < 0.05$); # — по сравнению с группой ДОКС (# — $p < 0.05$). Значения представлены $M \pm m$ (полуколичественная оценка в баллах) и Me [25%;75 %] (морфометрия).

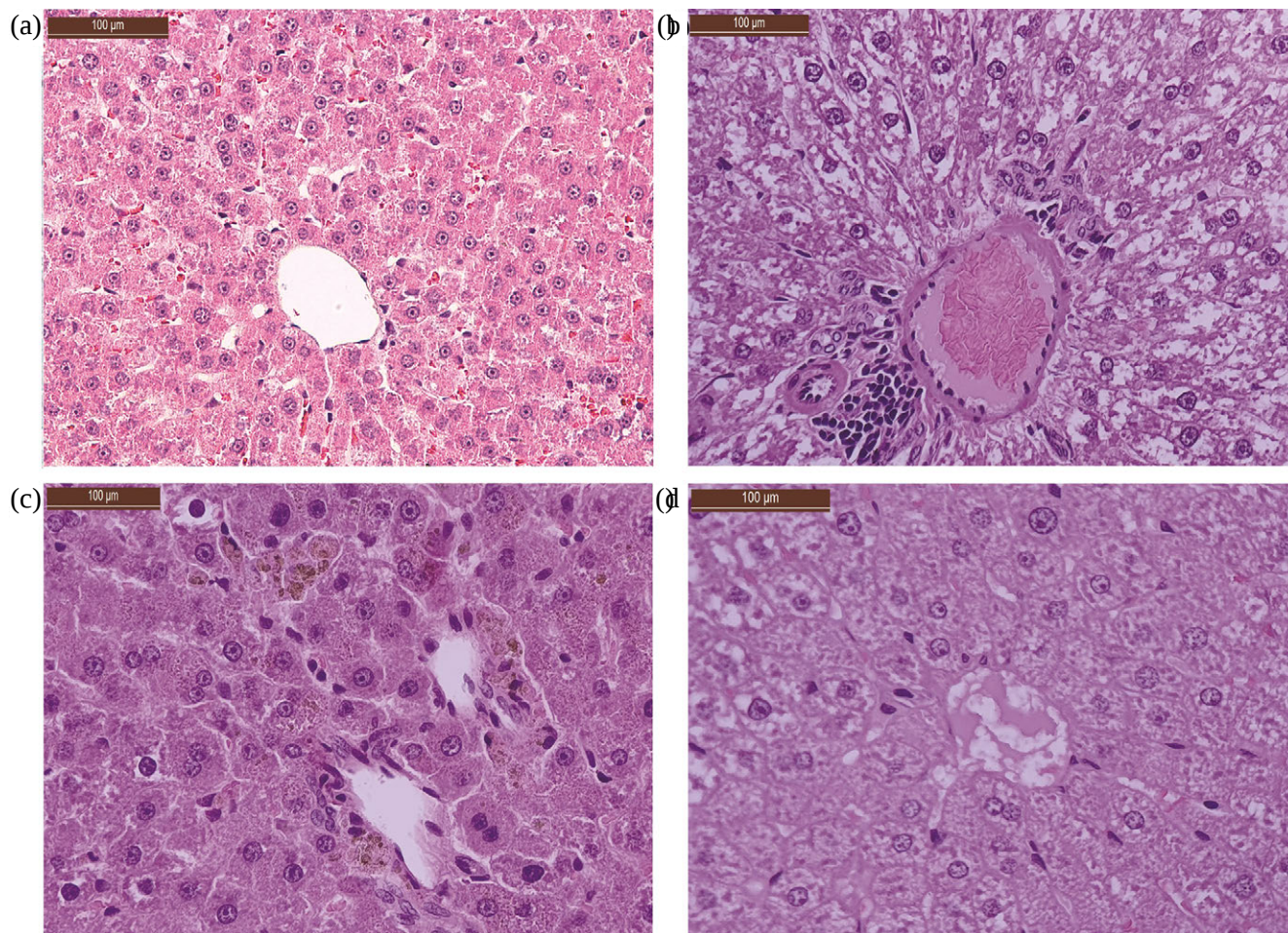


Рис. 8. Репрезентативные фотографии печени животных экспериментальных групп. (a) — контроль, нормальное строение; (b) — ДОКС, лимфоплазмочитарная инфильтрация портального тракта; (c) — ДОКС, холестаз цитоплазматический; (d) — ДОКС, кариорексис в гепатоцитах. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$.

недостаточности, с формированием воспалительных процессов, дистрофических и фиброзных изменений в почках, печени, легких. В настоящей работе на животной модели вышеуказанные эффекты ДОКС были подтверждены с помощью комплексной морфологической оценки с совместным использованием эхокардиографического метода. Более выраженное токсическое действие ДОКС было выявлено в сердце, почках и легких животных, менее выраженное в печени.

В ходе исследования было показано, что введение НР обеспечивает защитный эффект в отношении жизненно важных органов при развитии хронических кардиотоксических эффектов ДОКС. Для подтверждения протективных эффектов НР на модели хронической ДОКС-индуцированной кардиомиопатии использовались различные схемы его введения (сочетанная и превентивная). Сочетанный режим основан на одновременном применении ДОКС и протективного НР. Превентивный режим предполагал предварительное использование НР для реализации накопительного эффекта в клетках, и даль-

нейшее совместное применение его вместе с данным химиопрепаратом.

Используемые схемы введения НР обеспечивали протективный эффект, при этом наиболее выраженное защитное действие НР наблюдалось при использовании превентивного режима (НР/НР+ДОКС). На настоящий момент работы, направленные на исследование влияния НР на состояние различных систем органов, представлены в единичных количествах. Так, было показано, что никотинамид рибозид киназа-2 (NRK-2) играет критическую роль в снижении сердечной недостаточности после ишемического повреждения. На модели мышей с нокаутом NRK-2 было продемонстрировано увеличение дисфункции сердца и фиброза миокарда, а также повышенная экспрессия генов, предсердного натрийуретического пептида и мозгового натрийуретического пептида [30, 31]. В нашем исследовании было показано снижение относительной площади фиброза миокарда у животных групп НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС по сравнению с ДОКС. Также проявления токсических эффек-

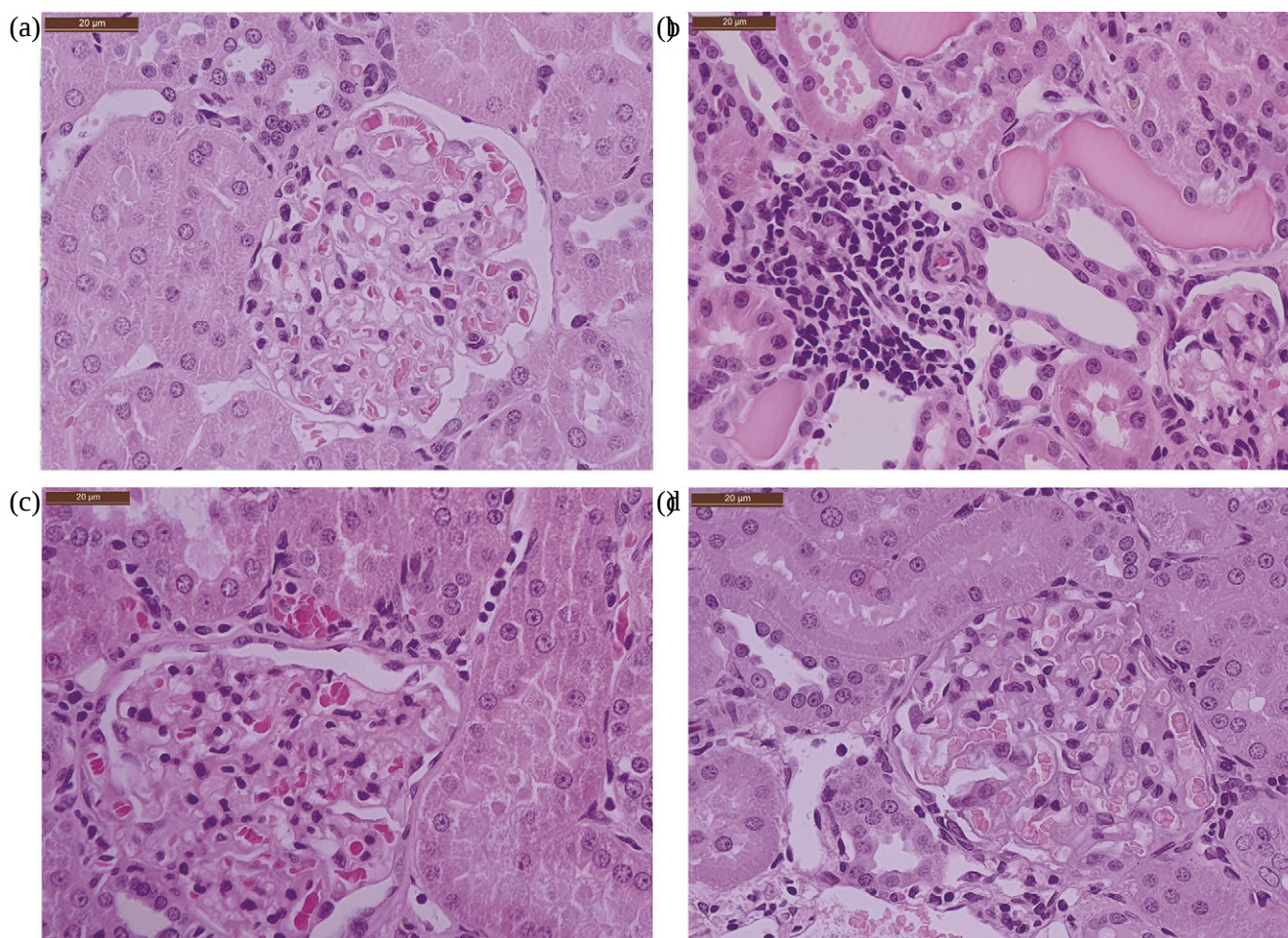


Рис. 9. Репрезентативные фотографии почки животных экспериментальных групп. (а) — контроль, нормальное строение; (б) — ДОКС, лимфоплазмочитарная инфильтрация, гиалиновые цилиндры, атрофия эпителия канальцев; (с) — НР+ДОКС, слабо выраженные дистрофические изменения эпителия канальцев; (д) — НР/НР+ДОКС, слабо выраженные дистрофические изменения эпителия канальцев. Окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$.

тов ДОКС в почках и легких было менее выражено у крыс, получавших НР, однако более выражен защитный эффект предшественника НАД⁺ при превентивной схеме введения.

Известно, что НР способен уменьшать накопление коллагена в печени, ингибировать активацию звездчатых клеток печени [32, 33]. Наши результаты, по патоморфологической оценке, повреждения печени согласуются с литературными данными. В данной работе количество перисинусоидальных клеток (в том числе звездчатых клеток) повышено в группе ДОКС по сравнению с контролем и достоверно снижается в группах НР+ДОКС и НР/НР+ДОКС.

Токсические эффекты в отношении бронхолегочной системы ДОКС менее изучены, чем кардиотоксические, так как они в меньшей степени выражены у онкологических пациентов. Экспериментальных работ представлено также небольшое количество [15, 34]. Токсическое воздействие ДОКС на легкие проявляется утолщением альвеолярных перегородок, снижением воздушности легочной ткани за счет отека, интерстициальной

воспалительной инфильтрации и увеличения количества коллагеновых волокон в ткани. Эти морфологические параметры были менее выражены в обеих группах, получавших НР.

ДОКС-индуцированная нефропатия является классической моделью почечной недостаточности у грызунов [35]. На этой модели показано, что ДОКС вызывает повреждение канальцев почек и почечных клубочков, в том числе с развитием фиброза, гломерулосклероза, тубулоинтерстициального воспаления, а также отложений мочевой кислоты в почечных канальцах [36]. При повреждении почек нарушается их выделительная функция — в сыворотке крови снижается концентрация альбумина, повышается содержание оксида азота и провоспалительных цитокинов — ИЛ-1 β , ФНО- α , ФНО- β и ИЛ-6, а также креатинина и мочевины [37]. Отмечается также снижение активности ферментов антиоксидантной защиты [38]. В ходе работы введение НР в обоих режимах оказало эффективное протективное действие на ткани почек. Дистрофические изменения эпителия ка-

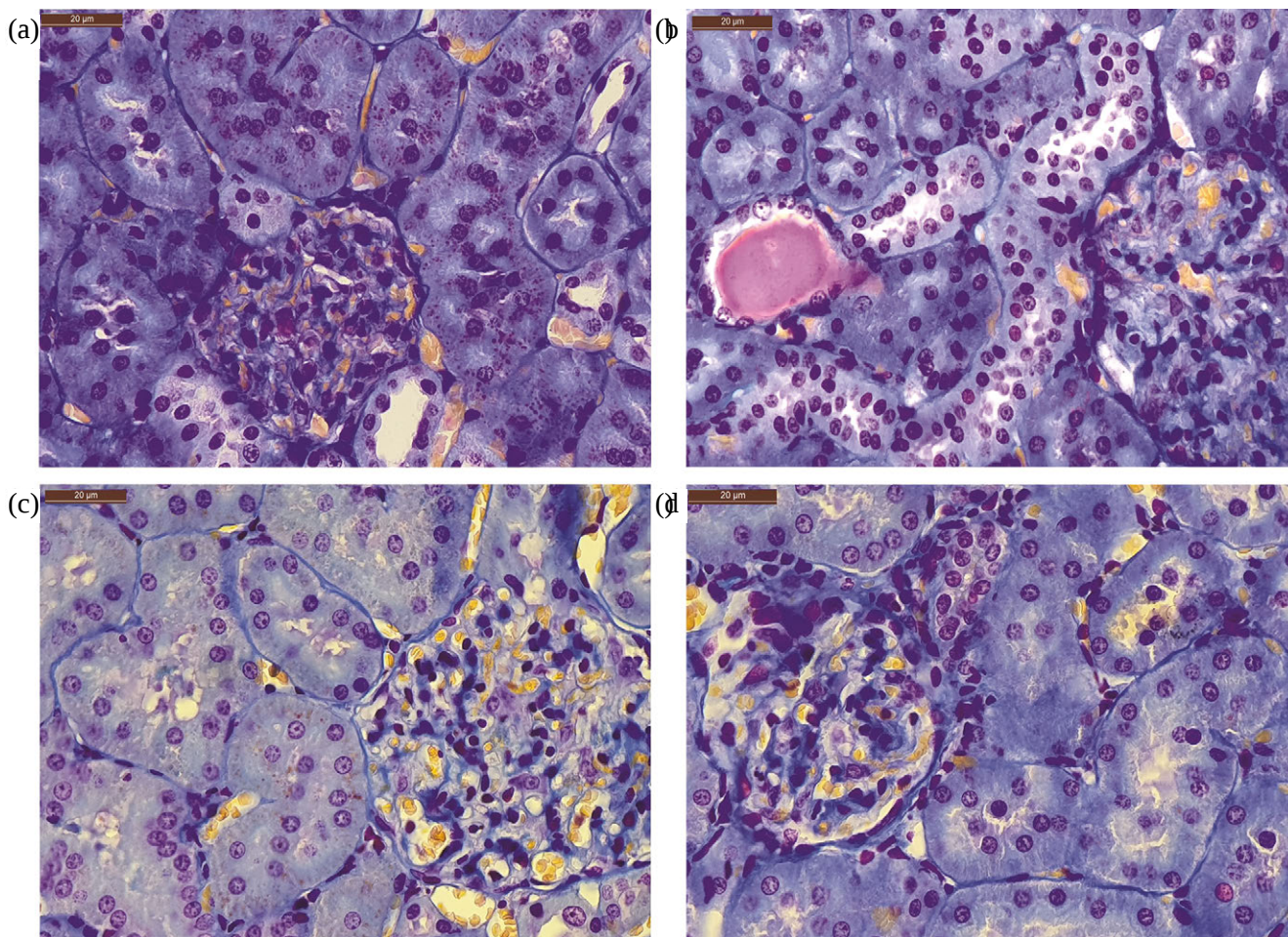


Рис. 10. Репрезентативные фотографии почек животных экспериментальных групп. Синим цветом окрашены коллагеновые волокна (a) – контроль; (b) – ДОКС; (c) – НР+ДОКС; (d) – НР/НР+ДОКС. Окраска по Маллори, $\times 400$.

нальцев и количество гиалиновых цилиндров было менее выражено в группе НР/НР+ДОКС по сравнению с группой ДОКС.

По результатам нашей работы можно предположить, что превентивный режим внутривенного введения НР обеспечивает более выраженное протективное действие по сравнению с сочетанным режимом благодаря реализации накопительного эффекта. Предварительное введение НР могло обеспечить увеличение уровней НАД⁺ в компартментах клетки до начала воздействия ДОКС. Это в свою очередь простимулировало активацию SIRT6, способных подавлять экспрессию TGF- β , Smad2/3, стимулировать forkhead box protein O (FOXO), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), PGC-1 α , тем самым, ослабило развитие сердечного фиброза [22], фиброза и воспаления печени [39], почек, легких [40, 41]. Играя огромную роль в клеточном гомеостазе, очевидна необходимость более детального исследования взаимодействия НР/НАД⁺/SIRT6, так как этот путь может стать новой выгодной терапевтической мишенью.

Таким образом, в условиях применения ДОКС наблюдается полиорганное поражение, которое проявляется в накапливающихся прогрессирующих морфологических изменениях в сердце, почках, легких, печени. Внутривенное введение НР обеспечивает снижение данных патологических изменений. При этом превентивный режим введения оказывает более выраженный эффект.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Я.Г.Т., Е.Ю.П.), сбор данных (Е.Ю.П., З.Е.А.), обработка данных (Е.Ю.П., Н.Ю.С.), написание и редактирование манускрипта (Е.Ю.П., Н.Ю.С., Я.Г.Т., В.А.Ц.).

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 декла-

рации и рекомендациям [комиссия по контролю содержания и использования лабораторных животных ФГБУ “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, IACUC, номер протокола-заявки: 20–09ПЗ#V2].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации “Создание новых препаратов для лечения и профилактики доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии” (№ 123021000147–5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hussen NH, Hasan AH, Muhammed GO, Yassin AY* (2023) Anthracycline in Medicinal Chemistry: Mechanism of Cardiotoxicity, Preventive and Treatment Strategies. *Curr Org Chem* 1–15. <https://doi.org/10.2174/1385272827666230423144150>
2. *Schirone L, D'ambrosio L, Forte M, Genovese R, Schiavon S, Spinosa G, Iacovone G, Valenti V, Frati G, Sciarretta S* (2022) Mitochondria and Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Complex Interplay. *Cells* 11:1–16. <https://doi.org/10.3390/cells11132000>
3. *Wenningmann N, Knapp M, Ande A, Vaidya TR, Ait-Oudhia S* (2019) Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: Molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. *Mol Pharmacol* 96:219–232. <https://doi.org/10.1124/mol.119.115725>
4. *Ma W, Wei S, Zhang B, Li W* (2020) Molecular Mechanisms of Cardiomyocyte Death in Drug-Induced Cardiotoxicity. *Front Cell Dev Biol* 8:1–17. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00434>
5. *Li N, Jiang W, Wang W, Xiong R, Wu X, Geng Q* (2021) Ferroptosis and its emerging roles in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res* 166:105466. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105466>
6. *Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P* (2009) Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol* 296:1466–1483. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00795.2008>
7. *Christidi E, Brunham LR* (2021) Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis* 12:. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03614-x>
8. *Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A* (2020) New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci* 250:117599. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117599>
9. *Alhowail AH, Bloemer J, Majrashi M, Pinky PD, Bhattacharya S, Yongli Z, Bhattacharya D, Eggert M, Woodie L, Buabeid MA, Johnson N, Broadwater A, Smith B, Dhanasekaran M, Arnold RD, Suppiramaniam V* (2019) Doxorubicin-induced neurotoxicity is associated with acute alterations in synaptic plasticity, apoptosis, and lipid peroxidation. *Toxicol Mech Methods* 29:457–466. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1600086>
10. *Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I* (2018) Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci* 200:26–30. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.023>
11. *Fujimura T, Yamagishi SI, Ueda S, Fukami K, Shibata R, Matsumoto Y, Kaida Y, Hayashida A, Koike K, Matsui T, Nakamura KI, Okuda S* (2009) Administration of pigment epithelium-derived factor (PEDF) reduces proteinuria by suppressing decreased nephrin and increased VEGF expression in the glomeruli of adriamycin-injected rats. *Nephrol Dial Transplant* 24:1397–1406. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn659>
12. *Ramadan R, Faour D, Awad H, Khateeb E, Cohen R, Yahia A, Torgovicky R, Cohen R, Lazari D, Kawachi H, Abassi Z* (2012) Early treatment with everolimus exerts nephroprotective effect in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 27:2231–2241. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr581>
13. *Aljobaily N, Viereckl MJ, Hydock DS, Aljobaily H, Wu TY, Busekrus R, Jones B, Alberson J, Han Y* (2021) Creatine alleviates doxorubicin-induced liver damage by inhibiting liver fibrosis, inflammation, oxidative stress, and cellular senescence. *Nutrients* 13:1–15. <https://doi.org/10.3390/nu13010041>
14. *Owumi SE, Lewu DO, Arunsi UO, Oyelere AK* (2021) Luteolin attenuates doxorubicin-induced derangements of liver and kidney by reducing oxidative and inflammatory stress to suppress apoptosis. *Hum Exp Toxicol* 40:1656–1672. <https://doi.org/10.1177/09603271211006171>
15. *Owumi SE, Nwozo SO, Arunsi UO, Oyelere AK, Odunola OA* (2021) Co-administration of Luteolin mitigated toxicity in rats' lungs associated with doxorubicin treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 411:115380. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115380>
16. *Podyacheva E, Toropova Y* (2022) SIRT1 activation and its effect on intercalated disc proteins as a way to reduce doxorubicin cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 13:1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1035387>
17. *Güven C, Sevgiler Y, Taskin E* (2018) Mitochondrial Dysfunction Associated with Doxorubicin. *Mitochondrial Dis*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80284>
18. *Santos-Alves E, Rizo-Roca D, Marques-Aleixo I, Coxito P, Martins S, Guimarães JT, Oliveira PJ, Torrella JR, Magalhães J, Ascensão A* (2019) Physical exercise positively modulates DOX-induced hepatic oxidative stress, mitochondrial dysfunction and quality control signaling. *Mitochondrion* 47:103–113. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.05.008>
19. *Podyacheva E, Toropova Y* (2021) Nicotinamide Riboside for the Prevention and Treatment of Doxorubicin Cardiomyopathy. Opportunities and Prospects. *Nutrients* 13:3435. <https://doi.org/10.3390/nu13103435>

20. Zheng D, Zhang Y, Zheng M, Cao T, Wang G, Zhang L, Brockman J, Zhong H, Fan G, Peng T, Sciences M, Health L, Centre S, Physiology S (2019) Nicotinamide riboside promotes autolysosome clearance in preventing doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Clin Sci (Lond)* 133:1505–1521.
<https://doi.org/10.1042/CS20181022>. Nicotinamide
21. Mazumder S, Barman M, Bandyopadhyay U, Bindu S (2020) Sirtuins as endogenous regulators of lung fibrosis: A current perspective. *Life Sci* 258:118201.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118201>
22. Liu ZH, Zhang Y, Wang X, Fan XF, Zhang Y, Li X, Gong Y sheng, Han LP (2019) SIRT1 activation attenuates cardiac fibrosis by endothelial-to-mesenchymal transition. *Biomed Pharmacother* 118:
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109227>
23. Masri S, Rigor P, Cervantes M, Ceglia N, Sebastian C, Xiao C, Roqueta-Rivera M, Deng C, Osborne TF, Mostoslavsky R, Baldi P, Sassone-Corsi P (2014) Partitioning circadian transcription by SIRT6 leads to segregated control of cellular metabolism. *Cell* 158:659–672.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.050>
24. Cai J, Liu Z, Huang X, Shu S, Hu X, Zheng M, Tang C, Liu Y, Chen G, Sun L, Liu H, Liu F, Cheng J, Dong Z (2020) The deacetylase sirtuin 6 protects against kidney fibrosis by epigenetically blocking β -catenin target gene expression. *Kidney Int* 97:106–118.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.08.028>
25. Ma W, Mao Q, Xia W, Dong G, Yu C, Jiang F (2019) Gut microbiota shapes the efficiency of cancer therapy. *Front Microbiol* 10:1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01050>
26. Podyacheva E, Semenova N, Zinserling V, Mukhametdinova D, Goncharova I, Zelinskaya I, Sviridov E, Martynov M, Osipova S, Toropova Y (2022) Intravenous Nicotinamide Riboside Administration Has a Cardioprotective Effect in Chronic Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 23:1–19.
<https://doi.org/10.3390/ijms232113096>
27. Toropova YG, Pechnikova NA, Zelinskaya IA, Zhuravsky SG, Korniyushin O V., Gonchar AI, Ivkin DY, Leonova YV., Karev VE, Karabak IA (2018) Nicotinamide riboside has protective effects in a rat model of mesenteric ischaemia-reperfusion. *Int J Exp Pathol* 99:304–311.
<https://doi.org/10.1111/iep.12302>
28. Podyacheva EY, Kushnareva EA, Karpov AA, Toropova YG (2021) Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. *Front Pharmacol* 12:1–12.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.670479>
29. Podyacheva E, Shmakova T, Kushnareva E, Onopchenko A, Martynov M, Andreeva D, Toropov R, Cheburkin Y, Levchuk K, Goldaeva A, Toropova Y (2022) Modeling Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy With Fibrotic Myocardial Damage in Wistar Rats. *Cardiol Res* 13:339–356.
<https://doi.org/10.14740/cr1416>
30. Ahmad F, Tomar D, Aryal A C S, Elmoselhi AB, Thomas M, Elrod JW, Tilley DG, Force T (2020) Nicotinamide riboside kinase-2 alleviates ischemia-induced heart failure through P38 signaling. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 1866:165609.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165609>
31. Shahzadi SK, Marzook H, Qaisar R, Ahmad F (2022) Nicotinamide riboside kinase-2 inhibits JNK pathway and limits dilated cardiomyopathy in mice with chronic pressure overload. *Clin Sci (Lond)* 136:181–196.
<https://doi.org/10.1042/CS20210964>
32. Jiang R, Zhou Y, Wang S, Pang N, Huang Y, Ye M, Wan T, Qiu Y, Pei L, Jiang X, Huang Y, Yang H, Ling W, Li X, Zhang Z, Yang L (2019) Nicotinamide riboside protects against liver fibrosis induced by CCl4 via regulating the acetylation of Smads signaling pathway. *Life Sci* 225:20–28.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.064>
33. Pham TX, Bae M, Kim MB, Lee Y, Hu S, Kang H, Park YK, Lee JY (2019) Nicotinamide riboside, an NAD⁺ precursor, attenuates the development of liver fibrosis in a diet-induced mouse model of liver fibrosis. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 1865:2451–2463.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.06.009>
34. Ikewuchi CC, Ikewuchi JC, Ifeanacho MO (2021) Aqueous leaf extracts of *Chromolaena odorata* and *Tridax procumbens* attenuated doxorubicin-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Biotechnologia* 102:387–398.
<https://doi.org/10.5114/BTA.2021.111096>
35. Grant MKO, Seelig DM, Sharkey LC, Choi WSV, Abdelgawad IY, Zordoky BN (2019) Sexual dimorphism of acute doxorubicin-induced nephrotoxicity in C57Bl/6 mice. *PLoS One* 14:1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212486>
36. Xiang C, Yan Y, Zhang D (2021) Alleviation of the doxorubicin-induced nephrotoxicity by fasudil in vivo and in vitro. *J Pharmacol Sci* 145:6–15.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.10.002>
37. Demir F, Demir M, Aygun H (2020) Evaluation of the protective effect of edaravone on doxorubicin nephrotoxicity by [99mTc]DMSA renal scintigraphy and biochemical methods. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393:1383–1390.
<https://doi.org/10.1007/s00210-020-01832-2>
38. Soltani Hekmat A, Chenari A, Alipanah H, Javanmardi K (2021) Protective effect of alamandine on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol Toxicol* 22:1–11.
<https://doi.org/10.1186/s40360-021-00494-x>
39. Zhang J, Li Y, Liu Q, Huang Y, Li R, Wu T, Zhang Z, Zhou J, Huang H, Tang Q, Huang C, Zhao Y, Zhang G, Jiang W, Mo L, Zhang J, Xie W, He J (2021) Sirt6 Alleviated Liver Fibrosis by Deacetylating Conserved Lysine 54 on Smad2 in Hepatic Stellate Cells. *Hepatology* 73:1140–1157.
<https://doi.org/10.1002/hep.31418>
40. Hong YA, Kim JE, Jo M, Ko GJ (2020) The role of sirtuins in kidney diseases. *Int J Mol Sci* 21:1–21.
<https://doi.org/10.3390/ijms21186686>
41. Cetrullo S, D'Adamo S, Tantini B, Borzi RM, Flamigni F (2015) MTOR, AMPK, and sirt1: Key players in metabolic stress management. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 25:59–75.
<https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGene-Expr.2015012975>

PATHOLOGY OF DOXORUBICIN-INDUCED ORGANOPATHIES UNDER DIFFERENT INTRAVENOUS NICOTINAMIDE RIBOSIDE ADMINISTRATION MODES

**E. Yu. Podyacheva[#], N. Yu. Semenova, Z. E. Artyukhina,
V. A. Zinserling and Ya. G. Toropova**

*Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, 197341,
Saint-Petersburg, Russian Federation*

[#]e-mail: ekaterinapodyachevaspb@gmail.com

Doxorubicin (DOX) is a potent chemotherapeutic drug, but its clinical use is hindered by significant side effects on vital organs like the heart, kidneys, lungs, liver, and intestines. Currently, there is a lack of effective drugs that can provide simultaneous cardioprotection and organ protection during chemotherapy. Nicotinamide riboside (NR) holds promise as a pharmacological agent capable of offering comprehensive protection against the systemic toxicity caused by DOX. This study aimed to comprehensively evaluate the morphological characteristics of vital organs (heart, lungs, liver, kidneys) in Wistar rats with chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy using various intravenous administration modes of NR as a protective agent. Sixty male SPF Wistar rats weighing 283 ± 22 g were divided into four groups: intact, control (DOX administered intraperitoneally), combined mode (the simultaneous use of DOX and NR) and preventive mode (the preliminary use of NR to realize the cumulative effect in cells, and its further joint use together with DOX) intravenous NR administration. Animal observation spanned two months after drug administration, followed by the collection of hearts, lungs, liver, and kidneys for morphological analysis. Echocardiographic assessment confirmed DOX cardiotoxicity. The study revealed that the hearts, kidneys and lungs exhibited more pronounced toxic effects of DOX compared to the liver. Both NR administration modes demonstrated protective effects, with the preventive regime showing the greatest efficacy in safeguarding vital organs.

Keywords: doxorubicin-induced cardiomyopathy, heart, kidneys, intravenous administration, liver, morphology, nicotinamide riboside

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ Eu^{3+}
НА СПОНТАННЫЕ СЕРДЕЧНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ© 2024 г. К. В. Соболев^{1,*}, С. М. Коротков¹, И. В. Шемарова¹, В. П. Нестеров¹¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: peer9@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 21.03.2024 г.

Негативные кумулятивные эффекты влияния лантаноидов на организм человека хорошо известны, они связаны, преимущественно, с токсическим воздействием редкоземельных металлов (РЗЭ) на мышечную ткань. Однако эффекты низких концентраций этих металлов на мышцы изучены значительно хуже. В своей работе мы выявили необычный стимулирующий эффект низкой концентрации европия (Eu^{3+}) на спонтанные сокращения препаратов предсердий сердечной мышцы лягушки. Целью настоящего исследования было изучение стимулирующего влияния европия (Eu^{3+}) на сокращение препаратов предсердий сердечной мышцы как в норме, так и в присутствии ингибитора митохондриального дыхания азида натрия (NaN_3). Исследование проводилось с использованием двух экспериментальных моделей: мышечных препаратов, полученных из изолированных предсердий сердца лягушки *Rana ridibunda*, и митохондрий, выделенных из сердца самцов крыс линии Вистар. В результате проведенных исследований установлено, что Eu^{3+} в концентрации 0.2 мМ при температуре 20°C потенцировал сокращения предсердий лягушки *in situ*, при этом увеличивалась как амплитуда, так и максимальная скорость нарастания силы одиночных спонтанных сокращений. Спонтанные сокращения предсердий становились более устойчивыми к воздействию 1мМ NaN_3 . При этом Eu^{3+} не влиял на дыхание энергизованных митохондрий (активированное АДФ (состояние 3) или 2,4-динитрофенолом (состояние 3Р_{днф})). Интенсивность этого дыхания снижалась в условиях кальциевой нагрузки митохондрий независимо от наличия в среде Eu^{3+} . Таким образом, на основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что ионы Eu^{3+} при низкой концентрации (0.2 мМ) стимулируют сокращение предсердий и оказывают положительное инотропное действие. Стимулирующий эффект низкой концентрации Eu^{3+} на сердце можно объяснить синергизмом в действии Ca^{2+} и Eu^{3+} на кальциевые каналы стимулирующей Ca^{2+} -зависимых процессов в кардиомиоцитах и отсутствием негативного эффекта на дыхание митохондрий.

Ключевые слова: лантаноиды, редкоземельные элементы, миокард, инотропное действие, сокращение, Eu^{3+} , Ca^{2+} , дыхание митохондрий

DOI: 10.31857/S0044452924030069, **EDN:** YXGPSW

ВВЕДЕНИЕ

Лантаноиды, в том числе европий (Eu^{3+}), широко применяются в современной медицине и диагностике [1–4]. Легированные Eu^{3+} наночастицы NaYF_4 используются в технологии направленной доставки нейротрансмиттеров в синапсомы для изучения потенциального токсического эффекта на эндотелиальные клетки [5]. Оксид Eu^{3+} служит также в качестве активатора люминофоров [6,7]. Лантаноиды могут стимулировать нейрогенез [8] и использоваться в качестве препаратов для терапии в современной медицине [9]. Кроме того, катионные люминесцентные комплексы Eu^{3+} используются для визуализации изменений концентрации

ряда биологически активных молекул, локальных температурных градиентов, а также структуры органелл при исследовании клеток *in vitro* [10–13]. В этой связи возникает необходимость тщательного и всестороннего изучения влияния лантаноидов на организм человека. Считается, что редкоземельные металлы, включая Eu^{3+} , малотоксичны [14], однако следует принять во внимание тот факт, что лантаноиды способны к биоаккумуляции, что может значительно увеличивать их токсичность [15]. На животных моделях было продемонстрировано, что лантаноиды в высокой концентрации токсичны для электровозбудимых клеток [16–19]. Ранее нами было показано, что в сердечной мышце лантаноиды в высокой концентрации обладают отрицательным

хроно- и инотропным действием, снижают энергетическую функцию митохондрий сердца [17–19]. Однако в некоторых работах отмечался положительный эффект лантаноидов на работу сердечной мышцы, что может быть связано с их влиянием на Ca^{2+} -зависимые процессы [20–24]. Ранее нами также отмечалось, что ионы Eu^{3+} при определенных экспериментальных условиях могут стимулировать спонтанные сердечные сокращения [19]. Поэтому целью данной работы являлось дальнейшее изучение этого эффекта *in situ* на спонтанные сокращения мышечных препаратов сердца как в норме, так и в присутствии ингибитора митохондриального дыхания азидид натрия, а также непосредственно на митохондрии, выделенные из сердца крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось с использованием двух экспериментальных моделей: мышечных препаратов, полученных из изолированных предсердий сердца самцов лягушки *Rana ridibunda* и митохондрий, выделенных из целого сердца самцов крыс линии Вистар. Выбор сердца лягушки *Rana ridibunda* в качестве экспериментальной модели связан, с одной стороны, с большей устойчивостью изолированных мышечных препаратов сердца лягушки, позволяющих, в отличие от аналогичных препаратов теплокровных животных, регистрировать спонтанные сокращения на протяжении длительного периода. С другой стороны, общность физиологических процессов, лежащих в основе сердечной деятельности холоднокровных и теплокровных животных [25], позволяет производить сравнение между разными типами животных. Выбор изолированных митохондрий сердца крысы обусловлен необходимостью визуализации энергетических процессов, происходящих в этих органеллах под воздействием изучаемых нами веществ. Эксперименты *in situ* проводили на взрослых самцах *Rana ridibunda* в феврале–марте.

Регистрацию сокращений осуществляли с помощью тензодатчиков, передающих сократительный сигнал с мышечного препарата на компьютер. Обработка сигнала от тензодатчиков производилась в программе WinPulse, сила сокращения выражалась в Ньютонах (Н). Учитывали следующие параметры сокращения: максимальное сокращение ($F_{\max}$, мН); частота сокращений (Hz); максимальная скорость нарастания силы сокращения ($V_{\max}$, мН/с); время, необходимое мышце для достижения максимальной силы сокращения (t , с), и период полурасслабления ($t_{1/2\text{rel}}$, с). Регистрацию сокращений предсердий проводили в изометрическом режиме при 20°C. Нитрат европия ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$) был приготовлен в виде 100 мМ сток-раствора, который добавляли в нормальный физиологический раствор для холод-

нокровных животных (раствор Рингера) перед экспериментом до конечных концентраций 0.2 мМ и 1 мМ. Инкубация предсердий с Eu^{3+} осуществлялась 6–7 мин. Параметры сокращений измеряли до аппликации Eu^{3+} и в конце инкубации с металлом. Параметры сокращений в одном опыте усреднялись из нескольких сокращений (около 30) в течение 1 мин. Инкубацию предсердий с азидом натрия (NaN_3) осуществляли около 9 мин в контроле и через 20 мин после отмывания 0.2 мМ Eu^{3+} . В работе было использовано 4 лягушки для каждого эксперимента.

Митохондрии выделяли по стандартной методике, описанной ранее [17, 18]. Для выделения одного препарата митохондрий сердца крысы (МСК) использовали 8 самцов линии Вистар массой 200–250 г. Суммарная масса сердечной ткани была около 10 г [18]. Было проведено три независимых эксперимента. Дыхание митохондрий в различных энергетических состояниях определяли полярографическим методом по изменению скоростей поглощения кислорода при 26°C. Детальное описание метода и состав сред приведены в работах [17, 18]. Концентрации Eu^{3+} и Ca^{2+} при изучении их эффектов на митохондрии выбирали по результатам ранее проведенных экспериментов с другими лантаноидами [17–19]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистической программы Microsoft Origin 6.0 с достоверностью $p < 0.05$. Достоверность различий между выборками определялась с помощью парного t-критерия Стьюдента в опытах с митохондриями и непарного в опытах по сокращению. В опытах по сокращению использовали относительные величины, соответствующие значения параметров в контроле принимались за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Действие Eu^{3+} на спонтанные сокращения предсердий

В четырех опытах при температуре 20°C нами было обнаружено, что ионы Eu^{3+} в концентрации 0.2 мМ могут оказывать стимулирующее действие на спонтанные сердечные сокращения. Однако при концентрации 1 мМ Eu^{3+} всегда вызывал отрицательный инотропный и хронотропный эффекты (рис. 1). Ранее нами был описан слабый ингибирующий эффект 0.2 мМ Eu^{3+} на сердечные сокращения при температуре 12°C. Однако и тогда в двух экспериментах из шести наблюдалась стимуляция сокращений [19]. Возможно, при низких температурах стимулирующий эффект низких концентраций Eu^{3+} проявляется с задержкой. Поэтому в данном исследовании мы используем температуру 20°C.

Феномен стимулирования спонтанных сокращений ионами Eu^{3+} в наибольшей степени проявлялся в отношении двух параметров: силы максимального сокращения (F_{max} , мН) и максимальной скорости нарастания силы сокращения (V_{max} , мН/с) (табл. 1).

Стимулирующий эффект ионов Eu^{3+} проявлялся в значительном увеличении амплитуды и скорости нарастания спонтанных сокращений предсердий, инкубируемых в среде с 0.2 мМ Eu^{3+} (рис. 1, табл. 1). На рис. 1б показана форма одиночных сокращений в контроле и при аппликации разных концентраций Eu^{3+} . Из представленных на рис. 1б данных видно, что амплитуда одиночного сокращения мышечного препарата в среде с 0.2 мМ Eu^{3+} почти в два раза выше, чем в контроле. После реаппликации 1 мМ Eu^{3+} положительные хроно- и инотропные эффекты 0.2 мМ Eu^{3+} подавлялись, как видно

из экспериментальных данных, представленных на рис. 1а.

Таким образом, ионы Eu^{3+} при концентрации 0.2 мМ могут оказывать стимулирующее действие на сердечные сокращения. Чтобы выяснить, насколько эти сокращения устойчивы к ингибиторам дыхания митохондрий, мы использовали азид натрия (NaN_3) – ингибитор 4-го митохондриального комплекса. На рис. 2 представлены данные, свидетельствующие об ингибирующем влиянии 1 мМ NaN_3 на сердечные сокращения в контроле и через 20 мин после отмывания предсердия от 0.2 мМ Eu^{3+} .

Представленные на рис. 2 результаты демонстрируют ингибирующий эффект 1 мМ NaN_3 на параметры мышечного сокращения. Аппликация 5 мМ NaN_3 вызывала в наших условиях необратимое подавление сокращений и последующую контрактуру предсердий. Как видно из рис. 2, аппликация 0.2 мМ Eu^{3+} увеличивала устойчивость

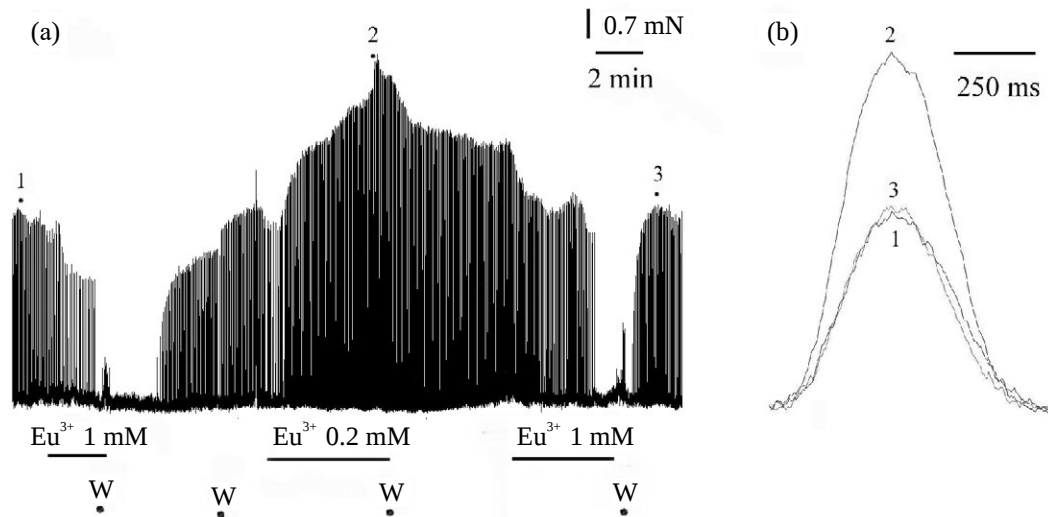


Рис. 1. Эффект двух различных концентраций Eu^{3+} (0.2 мМ и 1 мМ) на сокращения предсердий лягушки при температуре омывающего раствора 20°C. (а) – показана полная схема опыта; (б) – одиночные сокращения, соответствующие сокращениям, помеченными черными кружками на полной схеме опыта. W – отмывание предсердий от Eu^{3+} . Концентрации Eu^{3+} и продолжительность инкубации с Eu^{3+} помечены горизонтальной линией под сокращениями. Горизонтальными метками вверху справа показано время, мин (а), миллисекунды (б). Сила, развиваемая предсердиями, откалибрована вертикальной меткой миллиНьютоны (mN).

Таблица 1. Эффекты 0.2 мМ Eu^{3+} на сокращения предсердий *Rana ridibunda* при температуре омывающего раствора 20°C

Концентрация Eu^{3+} , мМ	Hz, %	F_{max} , %	V_{max} , %	t, %	$t_{1/2\text{rel}}$, %
0.2 (n = 4)	102 ± 7	171 ± 22 *	191 ± 19 *	95 ± 2	98 ± 7

Примечание: Hz – частота спонтанных сокращений; F_{max} – амплитуда спонтанных сокращений; V_{max} – максимальная скорость нарастания силы одиночных сокращений; t – время, необходимое мышце для достижения максимальной силы сокращения; $t_{1/2\text{rel}}$ – время полурасслабления. Соответствующие значения параметров в контроле, в физиологическом растворе без Eu^{3+} , приняты за 100 %. Количество независимых экспериментов (n) равно 4. Достоверность отличия от контроля: * $p < 0.05$ (непарный t-критерий).

сердечных сокращений к токсическому действию 1 мМ NaN_3 . Так, при аппликации 1 мМ NaN_3 , в четырех независимых экспериментах, амплитуда спонтанных сокращений в контроле уменьшалась больше, чем в опыте после воздействия 0.2 мМ Eu^{3+} ($50 \pm 4\%$, $n = 4$, контроль vs. $27 \pm 3\%$ $n = 4$, 0.2 мМ Eu^{3+} , $p < 0.01$, непарный t -тест) (рис. 2). Аналогичный эффект наблюдался в отношении $V_{\max}$. В контроле, в растворе Рингера с 1 мМ NaN_3 , $V_{\max}$ уменьшалась на $42 \pm 6\%$ ($n = 4$), а после воздействия 0.2 мМ Eu^{3+} всего на $21 \pm 1\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$, непарный t -тест). Таким образом, помимо потенцирования сердечных сокращений, аппликация 0.2 мМ Eu^{3+} увеличивает устойчивость сердечных сокращений к влиянию азидата натрия — ингибитора митохондриального дыхания.

Для дальнейшего изучения механизма действия Eu^{3+} на сердечные клетки и непосредственно на энергетическую функцию мы изучали влияние Eu^{3+}

на дыхание изолированных митохондрий сердца крысы (рис. 3).

На рис. 3 видно, что дыхание митохондрий сердца крысы, энергизованных субстратами 1-го (G+M) или 2-го (Succ) дыхательных комплексов, в состоянии 3 (субстрат и АДФ в среде) или в состоянии $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ (в присутствии разобшителя 2,4-динитрофенола) практически не изменялось в опытах с Eu^{3+} . При этом, дыхание митохондрий в этих состояниях заметно уменьшалось в аналогичных экспериментах с нагруженными кальцием митохондриями, независимо от наличия в среде Eu^{3+} (рис. 3). Минимальный эффект Ca^{2+} и Eu^{3+} наблюдался для энергизованных сукцинатом митохондрий в опытах с ДНФ (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В подавляющем числе работ, начиная с самых первых, отмечается негативное влияние лантано-

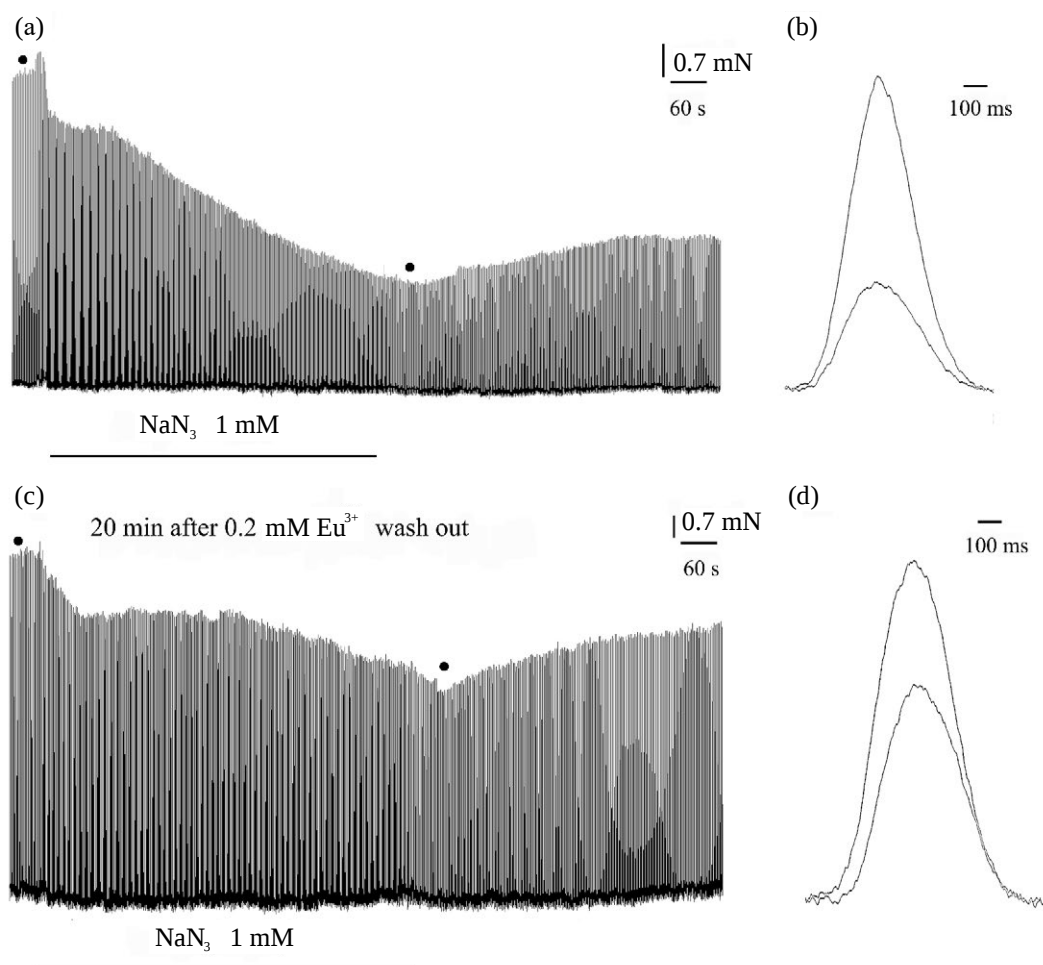


Рис. 2. Влияние NaN_3 на сокращения предсердий лягушки при температуре омывающего раствора 20°C . Показаны полные схемы опыта (a, c) и соответствующие им одиночные сокращения (b, d), помеченные черными кружками на полной схеме опыта. (a) — контрольное сокращение, (c) — сокращение после аппликации 0.2 мМ Eu^{3+} ; через 20 мин после отмыкания предсердия от 0.2 мМ Eu^{3+} добавили 1 мМ NaN_3 . Концентрация NaN_3 и продолжительность инкубации с NaN_3 помечены горизонтальной линией под сокращениями. Горизонтальными метками вверху справа показано время, секунды (a, c), миллисекунды (b, d). Сила, развиваемая предсердиями, откалибрована вертикальной меткой (mN).

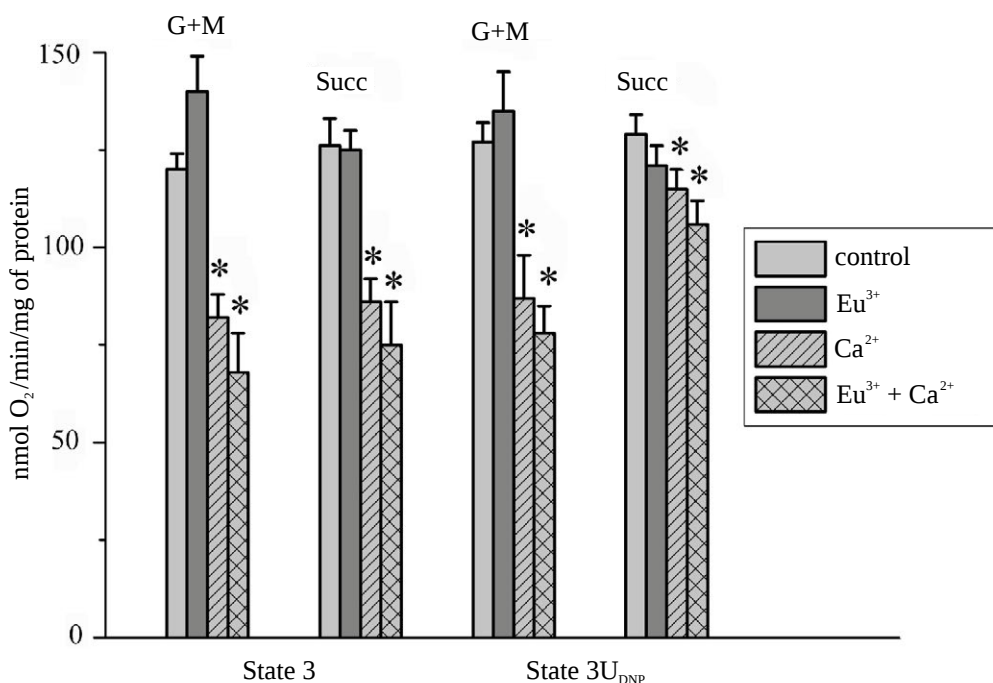


Рис. 3. Влияние Eu^{3+} и Ca^{2+} на скорость потребления кислорода митохондриями сердца крысы. Митохондрии (1 мг/мл белка) вносили в среду, содержащую 125 мМ KCl, 20 мМ Трис-МОРS (pH 7,3) и 3 мМ Трис- PO_4 , а также (где указано) 10 мМ глутамат с 2 мМ малат (G+M), 5 мМ сукцинат с 2 мМ ротенона (Succ), 50 мкМ Eu^{3+} (Eu^{3+}) и 200 мкМ Ca^{2+} (Ca^{2+}). По оси ординат отмечены скорости потребления кислорода (нмоль O_2 /мин/мг белка) в состоянии 3 и состоянии $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$. Для индукции состояния 3 и состояния $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ в среду, содержащую энергизованные митохондрии сердца крысы, последовательно добавляли вещества до концентраций 130 мкМ АДФ и 30 мкМ ДНФ. Обозначениями под осью абсцисс показаны состояние 3 (State 3) и состояние $3\text{P}_{\text{ДНФ}}$ (State 3U_{DNP}). Звездочками отмечены достоверные отличия от контроля, опыты без Eu^{3+} и Ca^{2+} ($p < 0.05$, парный t-тест). Представлены средние значения результатов для трех независимых экспериментов.

идов на мышечные сокращения. Ингибирующее действие лантана объясняется тем, что он может блокировать Ca^{2+} каналы, препятствуя входу Ca^{2+} в клетку [26, 27], ингибировать как Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны [28, 29], так и Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулума (СР) [30], а также работу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (NCX) [31, 32]. Лантан способен проникать внутрь клетки [29], например, через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник [29], замещать Ca^{2+} во внутриклеточных компартментах и снижать концентрацию Ca^{2+} внутри клетки [33–35]. При изучении механизмов влияния лантаноидов на мышечные структуры было установлено, что основными мишенями лантаноидов являются NCX [31, 32], Ca -АТ-Фазы [20, 30] и рианодиновые рецепторы (RyR) [21, 24]. Однако ответ сердечной мышцы на аппликацию лантаноидов зависит не только от свойств редкоземельного металла и силы его связывания с ферментом, в частности с Ca^{2+} -АТФазой или с сайтом связывания в каналобразующем белке, но и от его действующей концентрации, что определяет характер влияния редкоземельного металла на сокращение. Существует ограниченное число работ, в которых отмечены стимулирующие эффекты малых концентраций лантаноидов на мышцу. Так, La^{3+} в концентрациях 0.05–0.3 мМ до-

зо-независимо потенцировал одиночное сокращение скелетных мышц. Было показано увеличение амплитуды, скорости развития и времени релаксации одиночного сокращения скелетного мышечного волокна лягушки [36]. Однако аппликация высоких концентраций лантана (больше 0.5 мМ) приводила к потере возбудимости и ингибированию сокращения скелетных мышц [36]. Авторы предполагают, что этот эффект связан с синергизмом в действии ионов лантана и сходного по размерам и свойствам ионов кальция, в связи с чем ионы La^{3+} могут замещать Ca^{2+} в процессе сокращения, связываясь с теми же регуляторными сайтами, что и кальций [36]. Установлено, что La^{3+} в концентрации 1 мМ усиливал безнатриевую контрактуру сердечных клеток цыпленка [22]. Причем это усиление было обусловлено увеличением высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} из СР и нарушением кальциевого барьера плазматической мембраны [22]. В работе других авторов было показано, что La^{3+} и Gd^{3+} в концентрациях 0.1–0.2 мМ ингибируют сердечные сокращения, однако при отмывании лантаноидов отмечалось необычное усиление одиночных сердечных сокращений [23]. Причем данный эффект проявлялся в большей степени в сердечной мышце лягушки по сравнению с таковым в сердце тепло-

кровных и мог наблюдаться длительное время [23]. Авторы объясняют этот эффект действием лантаноидов на плазматическую мембрану клетки, в частности, ингибированием работы NCX [23]. Недавно было показано, что лантаноиды при малых концентрациях могут действовать как агонисты Ca^{2+} каналов, в том числе и рианодиновых рецепторов [21, 24]. Так было отмечено, что при низкой концентрации кальция Eu^{3+} активировал RyR2 , а при высокой — блокировал [21, 24].

Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что Eu^{3+} в низкой концентрации может стимулировать сердечные сокращения. При стимуляции сокращений при малых концентрациях Eu^{3+} мы наблюдали положительный инотропный эффект (табл. 1), который мы объясняем синергизмом в действии Ca^{2+} и Eu^{3+} и возможной стимуляцией Ca^{2+} -зависимых процессов в кардиомиоцитах (электрохимического сопряжения). На рисунке 1 видно, что после аппликации 0.2 мМ Eu^{3+} за ранним падением амплитуды следует значительное увеличение силы сокращений. Аналогичный эффект наблюдался при аппликации трехвалентного алюминия (3.75 мМ) при электрической стимуляции предсердий лягушки [37]. Потенциацию сокращения авторы объясняют увеличением высвобождения Ca^{2+} из СР под влиянием алюминия, поскольку кофеин, опустошая СР, ингибировал потенциацию [37]. Вполне вероятно, что при воздействии низких концентраций Eu^{3+} также происходит увеличение высвобождения Ca^{2+} из СР кардиомиоцитов при каждом акте сокращения, возможно, за счет стимуляции Eu^{3+} RyR2 .

La^{3+} уже в низких концентрациях ингибирует Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны [28, 29], что также может способствовать медленному увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , который начинает закачиваться в СР. Однако на Ca^{2+} -АТФазу СР в наших экспериментах низкие концентрации Eu^{3+} практически не влияли, поскольку время полурелаксации одиночного сокращения менялось незначительно. С помощью методов электронной микроскопии было установлено, что лантан вытесняет кальций преимущественно из сарколеммальных участков и Ca^{2+} перераспределяется в СР [38]. Не исключено, что в наших экспериментах с Eu^{3+} происходило аналогичное перераспределение Ca^{2+} в СР. Лантаноиды также могут эффективно ингибировать NCX [31, 32], который является доминирующим механизмом оттока кальция из кардиомиоцитов [39]. NCX играет важную роль в регуляции гомеостаза кальция, влияя на процессы его депонирования, в частности, в СР [39]. Поэтому NCX оказывает огромное влияние на сократимость сердечной мышцы [39]. Не исключено, что небольшие концентрации Eu^{3+} в наших экспериментах начи-

нают ингибировать работу NCX, что приводит к постепенному увеличению кальция в СР и стимуляции сокращений.

При высоких концентрациях лантаноидов происходит значительное блокирование Ca^{2+} -зависимых процессов в сердечных клетках и, как следствие, ингибирование сердечных сокращений [17–19, 34, 35]. На различных биологических моделях показано, что лантаноиды обладают низкой токсичностью [14], но в высоких концентрациях могут замещать Ca^{2+} и тем самым снижать показатели сократимости сердечной мышцы [17–19]. Это связано, главным образом, с их блокирующим действием на потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы кардиомиоцитов [26, 27].

В ходе данной работы мы также оценили влияние Eu^{3+} на функцию митохондрий. В опытах на изолированных из сердца крысы митохондриях было показано, что дыхательная функция митохондрий (скорость поглощения кислорода фосфорилирующими энергизованными митохондриями, находящимися в состоянии 3 по Чансу) в присутствии низких концентраций Eu^{3+} меняется незначительно и в нашей модели потенцирования/ингибирования сокращения влияние Eu^{3+} на митохондрии можно не учитывать.

В последние десятилетия спрос на редкоземельные элементы значительно вырос как в промышленности, медицине, так и в других сферах их применения. Как правило, РЗЭ в почве, воде и атмосфере содержатся в низких концентрациях, однако они могут накапливаться в окружающей среде, особенно в неблагополучных районах, где наблюдается техническое загрязнение РЗЭ [40]. Поэтому возможно медленное накопление этих элементов в окружающей среде и проявление их токсического действия на организм человека [40]. Механизмы и отдаленные эффекты токсического действия лантаноидов изучены пока недостаточно.

В своей работе мы показали, что в низкой концентрации Eu^{3+} может стимулировать сердечные сокращения за счет перераспределения внутриклеточного Ca^{2+} и в этом случае увеличивать устойчивость сердечной мышцы к влиянию азида натрия — ингибитора митохондриального дыхания. При этом, как нами показано, Eu^{3+} не оказывает значительного токсического действия на дыхание митохондрий *in vitro*. Eu^{3+} в миллимолярных концентрациях может блокировать первоначальный вход Ca^{2+} в сердечную клетку, тем самым нарушая систему электро-механического сопряжения в миокарде [19]. Полученные данные важны для понимания механизмов действия лантаноидов на сердечную мышцу и могут быть полезны в разработке заместительной терапии, а также для исследования Ca^{2+} -сенсоров и Ca^{2+} -каналов в качестве диагностических зондов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С.М.К. осуществлял планирование, сбор и обработку данных, исследовал дыхание митохондрий и участвовал в редактировании статьи. К.В.С. исследовал сократительные характеристики препаратов сердечной мышцы лягушки *Rana ridibunda* и участвовал в написании соответствующих разделов и в редактировании статьи. И.В.Ш. осуществляла литературный поиск, участвовала в анализе полученных данных и в написании статьи. В.П.Н. осуществлял общее руководство работы над статьей и участвовал в ее редактировании.

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 ИЭФБ РАН по уходу и использованию лабораторных животных протоколы #6-5/2022 и # 6-6/2022 от 23.06.2022 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в ИЭФБ РАН с использованием средств государственного бюджета по госзаданию № 075-00264-24-00.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.В. Брайловскую за помощь при полярографическом измерении скоростей поглощения кислорода митохондриями.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Darghal N, Garnier-Suillerot A, Bouchemal N, Gras G, Geraldès CF, Salerno M (2010) Accumulation of Eu^{3+} chelates in cells expressing or not P-glycoprotein: implications for blood-brain barrier crossing. *J Inorg Biochem* 104:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.09.026>
2. Chen YC, Huang SC, Wang YK, Liu YT, Wu TK, Chen TM (2013) Ligand-functionalization of BPEI-coated YVO₄:Bi³⁺, Eu³⁺ nanophosphors for tumor-cell-targeted imaging applications. *Chem Asian J* 8:2652–2659. <https://doi.org/10.1002/asia.201300570>
3. Jin Y, Chen S, Duan J, Jia G, Zhang J (2015) Europium-doped Gd₂O₃ nanotubes cause the necrosis of primary mouse bone marrow stromal cells through lysosome and mitochondrion damage. *J Inorg Biochem* 146:28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.02.006>
4. Wu L, Yang F, Xue Y, Gu R, Liu H, Xia D, Liu Y (2023) The biological functions of europium-containing biomaterials: A systematic review. *Mater Today Bio* 19:100595. <https://doi.org/10.1016/j.mtmbio.2023.100595>
5. Chen S, Zhang C, Jia G, Duan J, Wang S, Zhang J (2014) Size-dependent cytotoxicity of europium doped NaYF₄ nanoparticles in endothelial cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 43:330–342. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.029>
6. Alpturk O, Rusin O, Fakayode SO, Wang W, Escobedo JO, Warner IM, Crowe WE, Krall V, Pruet JM, Strongin RM (2006) Lanthanide complexes as fluorescent indicators for neutral sugars and cancer biomarkers. *Proc Natl Acad USA* 103(26): 9756–9760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603758103>
7. Londhe S, Patra CR (2022) Biomedical applications of europium hydroxide nanorods. *Nanomedicine (Lond)* 17:5–8. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0351>
8. Wiatrak B, Sobierajska P, Szandruk-Bender M, Jawien P, Janeczko M, Dobrzynski M, Pistor P, Szlag A, Wiglusz RJ (2021) Nanohydroxyapatite as a Biomaterial for Peripheral Nerve Regeneration after Mechanical Damage-In Vitro Study. *Int J Mol Sci* 22:4454. <https://doi.org/10.3390/ijms22094454>
9. Alicka M, Sobierajska P, Kornicka K, Wiglusz RJ, Marycz K (2019) Lithium ions (Li⁺) and nanohydroxyapatite (nHAp) doped with Li⁺ enhance expression of late osteogenic markers in adipose-derived stem cells. Potential theranostic application of nHAp doped with Li⁺ and co-doped with europium (III) and samarium (III) ions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 99:1257–1273. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.073>
10. Smith DG, Pal R, Parker D (2012) Measuring equilibrium bicarbonate concentrations directly in cellular mitochondria and in human serum using europium/terbium emission intensity ratios. *Chemistry* 18:11604–11613. <https://doi.org/10.1002/chem.201201738>
11. Sun J, Song B, Ye Z, Yuan J (2015) Mitochondria Targetable Time-Gated Luminescence Probe for Singlet Oxygen Based on a β -Diketone-Europium Complex. *Inorg Chem* 54:11660–11668. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02458>
12. Liu X, Tang Z, Song B, Ma H, Yuan J (2017) A mitochondria-targeting time-gated luminescence probe for hypochlorous acid based on a europium complex. *J Mater Chem B* 5:2849–2855. <https://doi.org/10.1039/c6tb02991d>
13. Mailhot R, Traviss-Pollard T, Pal R, Butler SJ (2018) Cationic Europium Complexes for Visualizing Fluctuations in Mitochondrial ATP Levels in Living Cells. *Chemistry* 24:10745–10755. <https://doi.org/10.1002/chem.201801008>
14. Hirano S, Suzuki KT (1996) Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect.* 104(Suppl 1):85–95. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s185>
15. Pagano G, Aliberti F, Guida M, Oral R, Siciliano A, Trifuoggi M, Tommasi F (2015) Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities. *Environ Res* 142:215–220. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.039>

16. Das T, Sharma A, Talukder G (1988) Effects of lanthanum in cellular systems. A review. *Biol Trace Elem Res* 18:201–228. <https://doi.org/10.1007/BF02917504>
17. Korotkov SM, Sobol KV, Shemarova IV, Furaev VV, Shumakov AR, Nesterov VP (2016) A comparative study of the effects of Pr^{3+} and La^{3+} ions on calcium dependent processes in frog cardiac muscle and rat heart mitochondria. *Biophysics* 61:733–740. <https://doi.org/10.1134/S0006350916050122>
18. Коротков СМ, Соболев КВ, Шемарова ИВ, Новожилов АВ, Никитина ЕР, Нестеров ВП (2020). Влияние Gd^{3+} и Ca^{2+} на сократимость сердечной мышцы лягушки и дыхание, набухание и потенциал внутренней мембраны митохондрий сердца крысы. *ЖЭБФ* 56:99–106. [Korotkov SM, Sobol KV, Shemarova IV, Novozhilov AV, Nikitina ER, Nesterov VP (2020) Effects of Gd^{3+} and Ca^{2+} on frog heart muscle contractility and respiration, swelling and inner membrane potential of rat heart mitochondria. *J Evol Biochem Phys* 56: 99–106. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044452920060054>
19. Korotkov SM, Sobol KV, Novozhilov AV, Nesterov VP (2022) Effect of Eu^{3+} on Calcium-Dependent Processes in Vertebrate Myocardium. *J Evol Biochem Phys* 58(Suppl 1): S52–S62. <https://doi.org/10.1134/S0022093022070067>
20. Joshi NB, Shamoo AE (1987) Binding of Eu^{3+} to cardiac sarcoplasmic reticulum (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase-laser excited Eu^{3+} spectroscopic studies. *Biophys J* 51:185–191. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83324-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83324-6).
21. Sárközi S, Komáromi I, Jóna I, Almásy J (2017) Lanthanides Report Calcium Sensor in the Vestibule of Ryanodine Receptor. *Biophys J* 112:2127–2137. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.023>
22. Mead RH, Clusin WT (1985) Paradoxical electromechanical effect of lanthanum ions in cardiac muscle cells. *Biophys J* 48:695–700. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83827-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83827-3)
23. Kawata H, Ohba M, Hatae J, Kishi M (1983) Paradoxical after-potential of the myocardial contractility by lanthanum. *Jpn J Physiol* 33:1–17. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.33.1>
24. Magyar ZÉ, Bauer J, Bauerová-Hlinková V, Jóna I, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Almásy J (2023) Eu^{3+} detects two functionally distinct luminal Ca^{2+} binding sites in ryanodine receptors. *Biophys J* 122: 3516–3531. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.07.029>
25. Rumberger E, Reichel H (1972) The force-frequency relationship: a comparative study between warm- and cold-blooded animals. *Pflug Arch Eur J Physiol* 332: 206–217.
26. Hatae J (1982) Effects of lanthanum on the electrical and mechanical activities of frog ventricular muscle. *Jpn J Physiol* 32:609–625. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.32.609>
27. Nathan RD, Kanai K, Clark RB, Giles W (1988) Selective block of calcium current by lanthanum in single bullfrog atrial cells. *J Gen Physiol* 91:549–572. <https://doi.org/10.1085/jgp.91.4.549>
28. Shimizu H, Borin ML, Blaustein MP (1997) Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in arterial myocytes. *Cell calcium* 21:31–41. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(97\)90094-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(97)90094-4)
29. Peeters GA, Kohmoto O, Barry WH (1989) Detection of La^{3+} influx in ventricular cells by indo-1 fluorescence. *Am J Physiol* 256:C351–C357. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.256.2.C351>
30. Fujimori T, Jencks WP (1990) Lanthanum inhibits steady-state turnover of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by replacing magnesium as the catalytic ion. *J Biol Chem* 265: 16262–16270.
31. Zhang YH, Hancox JC (2000) Gadolinium inhibits Na^{+} - Ca^{2+} exchanger current in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 130:485–488. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703353>
32. Trosper TL, Philipson KD (1983) Effects of divalent and trivalent cations on Na^{+} - Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta* 731:63–68. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90398-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90398-x)
33. Zha X, Morrison GH (1995) Ion microscopy evidence that La^{3+} releases Ca^{2+} from Golgi complex in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 269(4 Pt 1):C923–C928. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.4.C923>
34. Langer GA, Frank JS (1972) Lanthanum in heart cell culture. Effect on calcium exchange correlated with its localization. *J Cell Biol* 54:441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.54.3.441>
35. Sanborn WG, Langer GA (1970) Specific uncoupling of excitation and contraction in mammalian cardiac tissue by lanthanum. *J Gen Physiol* 56:191–217. <https://doi.org/10.1085/jgp.56.2.191>
36. Andersson KE, Edman KA (1974) Effects of lanthanum on the coupling between membrane excitation and contraction of isolated frog muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 90:113–123. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1974.tb05569.x>
37. Meiri H, Shimoni Y (1991) Effects of aluminium on electrical and mechanical properties of frog atrial muscle. *Br J Pharmacol* 102:483–491. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12198.x>
38. Miller TW, Tormey JM (1993) Calcium displacement by lanthanum in subcellular compartments of rat ventricular myocytes: characterisation by electron probe microanalysis. *Cardiovasc Res* 27:2106–2112. <https://doi.org/10.1093/cvr/27.12.2106>
39. Ottolia M, Torres N, Bridge JH, Philipson KD, Goldhaber JJ (2013) Na/Ca exchange and contraction of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 61:28–33. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.06.001>
40. Turra C (2018) Sustainability of rare earth elements chain: from production to food – a review. *Int J Environ Health Res* 28:23–42. <https://doi.org/10.1080/09603123.2017.1415307>

STIMULATING EFFECT OF LOW CONCENTRATIONS OF Eu^{3+} ON SPONTANEOUS CARDIAC CONTRACTIONS

K. V. Sobol^{a, #}, S. M. Korotkov^a, I. V. Shemarova^a and V. P. Nesterov^a

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

[#]*e-mail: peep9@yandex.ru*

The negative cumulative effects of lanthanides on the human body are well known; they are associated mainly with the toxic effects of rare earth metals (REE) on muscle tissue. However, the effects of low concentrations of these metals on muscle are less understood. In our work, we found out an unusual stimulating effect of low concentrations of europium (Eu^{3+}) on spontaneous contractions of atria of a frog. The purpose of this study was to study the stimulating effect of Eu^{3+} on the contraction of atria, both normally and in the presence of the mitochondrial respiration inhibitor sodium azide (NaN_3). The study was carried out using two experimental models: muscle preparations obtained from isolated atria of the heart of the frog *Rana ridibunda* and mitochondria isolated from the heart of male Wistar rats. As a result of the studies, it was established that Eu^{3+} in a concentration of 0.2 mM, at a temperature of 20°C, potentiated contractions of the frog atria in situ; both the amplitude and the maximum rate of increase of single spontaneous contractions increased. Spontaneous atrial contractions became more resistant to the effects of 1 mM NaN_3 . At the same time, Eu^{3+} did not affect the respiration of energized mitochondria (activated by ADP (state 3) or 2,4-dinitrophenol (state 3 $_{\text{DNP}}$)). The intensity of this respiration decreased after the calcium load of mitochondria, regardless of the presence of Eu^{3+} in the medium. Thus, Eu^{3+} ions at low concentrations (0.2 mM) stimulated atrial contraction and had a positive inotropic effect. The stimulating effect of low concentrations of Eu^{3+} on the heart can be explained by the synergism in the action of Ca^{2+} and Eu^{3+} on calcium channels, stimulation of Ca^{2+} -dependent processes in cardiomyocytes and the absence of a negative effect on mitochondrial respiration.

Keywords: lanthanides, rare earth elements, myocardium, inotropic effect, contraction, Eu^{3+} , Ca^{2+} , mitochondrial respiration

ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ОТВЕТЫ НА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ МОГУТ ВКЛЮЧАТЬ СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВОЙ ПРОТЕАЗЫ АПОПТОЗА КАСПАЗЫ-3 В СТВОЛЕ МОЗГА

© 2024 г. А. В. Баннова^{1, *}, Г. Т. Шишкина¹, Н. Н. Дыгало¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 16.04.2024 г.

Принята к публикации 18.04.2024 г.

Активация микроглии провоспалительными стимулами, включающими липополисахарид (ЛПС), рассматривается среди факторов риска нейродегенерации, однако ЛПС может оказывать также нейропротективный эффект, что обуславливает дальнейший анализ взаимосвязи микроглиальной активации и регуляторов клеточной гибели. В настоящей работе было проведено сравнительное исследование экспрессии белков маркера активированной микроглии Iba-1 и исполнительной протеазы апоптоза каспазы-3 в стволе мозга и префронтальной коре крыс в зависимости от дозы и режима внутрибрюшинного введения эндотоксина. Через сутки после ЛПС в дозе 0.5 мг/кг, однократно, экспрессии Iba-1 и каспазы-3 в обеих структурах не отличались от контрольных значений. Введение эндотоксина в этой же дозе четырехкратно в течение 7-ми дней (1 раз в 2 дня) привело через сутки после последнего введения к значительному увеличению уровня Iba-1 в стволе мозга, которому сопутствовало достоверное уменьшение экспрессии каспазы-3. Такие же эффекты в этой структуре наблюдались и через 7 дней после однократного введения ЛПС в более высокой дозе — 5 мг/кг. В 7-дневном эксперименте во фронтальной коре, в отличие от ствола мозга, не было обнаружено изменений в экспрессии каспазы-3, а увеличение экспрессии Iba-1 наблюдалось только после однократного введения ЛПС в высокой дозе. Выявленное снижение уровня каспазы-3 в стволе мозга в условиях нейровоспаления может отражать развитие адаптивных нейропротективных процессов, особенно важных для структуры, отвечающей за такие ключевые функции организма, как дыхание, артериальное давление и сердцебиение.

Ключевые слова: липополисахарид, активная каспаза-3, Iba-1, ствол мозга, префронтальная кора

DOI: 10.31857/S0044452924030071, **EDN:** YXBZRE

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время среди патофизиологических механизмов нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, постишемические психопатологии, значительное внимание привлекает нейровоспаление. Развитие этого состояния связывают с дисфункцией микроглиальных клеток — резидентной популяции макрофагов центральной нервной системы (ЦНС) [1–6]. Активированная микроглия участвует в распознавании и фагоцитарном удалении дегенерирующих нейронов, однако длительная активация этих клеток может повредить и нормальные нейроны [7]. Для моделирования нейровоспаления в экспериментальных работах на животных наиболее часто используют липополисахарид (ЛПС) [8], представляющий собой иммуностимулирующий эндотоксин клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Источником ЛПС в системной циркуляции челове-

ка и животных являются патогенные бактерии желудочно-кишечного тракта [9]. Уровень эндотоксина в крови может быстро повышаться при различных патологических состояниях. Например, повышенный уровень ЛПС, ассоциируемый с развитием постишемических неврологических расстройств, наблюдался уже через сутки у больных, перенесших инсульт [10, 11]. В экспериментальных исследованиях на грызунах обнаружено, что внутрибрюшинные инъекции ЛПС приводят к активации микроглии и митохондриально-зависимых путей апоптоза в отделах мозга, а также возникновению специфических симптомов, таких как нарушение двигательной функции и способности к обучению, сходных с клиническими симптомами нейродегенеративных психиатрических расстройств [12, 13]. Ключевая роль в реализации процесса клеточной гибели в ЦНС принадлежит исполнительной протеазе апоптоза каспазе-3 [14, 15]. На связь индуцированных ЛПС повышений активности микроглии и экс-

прессии каспазы-3 указывает наблюдаемая на грызунах синхронность этих изменений в гиппокампе и префронтальной коре через сутки после однократных [16, 17] и повторных [18, 19] внутрибрюшинных введений эндотоксина. Однако в некоторых условиях ЛПС может оказывать и нейропротективное действие. Например, предварительное введение ЛПС ослабляло апоптоз нейронов, вызванный травматическим повреждением мозга [20], а также снижало уровни мРНК и белка каспазы-3, повышенные ишемическим воздействием [21]. Предварительное введение ЛПС мышам в низких дозах ослабляло активацию микроглии, а также развитие депрессивно-подобного поведения при последующих введениях высоких доз эндотоксина [22]. Таким образом, ЛПС может провоцировать не только негативные нейродегенеративные, но и адаптивные нейропротективные изменения в мозге, включающие влияние на экспрессию каспазы-3, однако опосредуется ли это влияние через изменение активности микроглии в структурах мозга, остается неясным.

Нейроны разных областей мозга различаются по чувствительности к индуцируемой ЛПС нейродегенерации. Например, однократное введение ЛПС в гиппокамп, кору или черную субстанцию приводило через 7 дней к гибели клеток только в черной субстанции, в то время как нейроны коры и гиппокамп не реагировали даже на значительно более высокие, чем вводимые в черную субстанцию дозы [23]. Целью нашего исследования явилось дальнейшее выяснение связи между изменениями экспрессии маркера микроглиальной активации и уровня каспазы-3 в префронтальной коре и стволе мозга крыс после периферического введения ЛПС в разных дозах и режимах. Полученные в рамках достижения этой цели результаты могут быть полезны для исследователей в области изучения нейровоспаления.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента

В работе использовали 2-месячных самцов крыс линии Wistar. Животных содержали поодиночке в поликарбонатных клетках (27,7 × 44 × 15 см = ш × д × в) при температуре 22–24°C и свободном доступе к воде и корму. Условия содержания животных и примененные воздействия соответствовали рекомендациям Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.) и рекомендациям Минздрава России (приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 г.), а также директивам Совета Европы (86/609/ЕЕС).

Нейровоспаление индуцировали липополисахаридом из *Escherichia coli*, серотип O55:B5 (Sigma-

Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), который животные получали внутрибрюшинно (рис. 1) в дозах 0.5 мг/кг (однократно и четырехкратно 1 раз в 2 дня в течение 7 дней) и 5 мг/кг (однократно). Контрольные животные получали соответствующие инъекции физиологического раствора. В каждой экспериментальной группе было по 5–6 животных. Животных, получавших ЛПС в дозе 0.5 мг/кг, выводили из эксперимента путем быстрой декапитации через сутки после последнего введения, 5 мг/кг — через 7 дней. Выделенные образцы префронтальной коры (срез префронтальной коры толщиной 1.5–3.0 мм в координатах от +3.20 до +2.70 мм относительно брегмы) и ствола мозга (задний мозг и область моста — весь блок ткани каудальнее задних бугров четверохолмия и роstralнее овального отверстия до –10.5 мм относительно брегмы без мозжечка) были быстро заморожены в жидком азоте.

Вестерн блот анализ

Уровни белков определяли методом Вестерн блота как описано ранее [24]. Ткани мозга гомогенизировали в лизирующем буфере (150 mM NaCl, 50 mM Трис, 1% Тритон X-100, 2 mM PMSF, 2 мкг/мл леупептина, 2 мкг/мл пепстатина и 2 мкг/мл апротинина). Супернатант, содержащий 50 мкг белка, разделяли методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с SDS (система Mini-Protean 3 Dodeca Cell, Bio-Rad, США). Белки переносили на 0.45 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с помощью системы Trans-Blot (Bio-Rad, США). Мембраны инкубировали в присутствии антител: первичных Iba-1 (1:500, rabbit monoclonal antibodies, EPR16589, ab178847, Abcam, США), активной каспазы-3 (1:500, rabbit monoclonal antibodies, #9664, Cell Signaling, США), β-актина (1:20000, rabbit polyclonal antibodies, I-19, sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, США) и вторичных, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:1000 для Iba-1 и активной каспазы-3 или 1:10000 для β-актина, goat anti-rabbit IgG antibody, Bio-Rad, США). Хемилюминисцентный сигнал усиливали с помощью набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 1 мин. Интенсивность окрашивания полос определяли после сканирования мембран (Chemidoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad, США) с последующей компьютерной денситометрией (программа Scion Image 4.0.3.2 Scion Corporation, США). Количество белка Iba-1 и активной каспазы-3 оценивали в относительных единицах к β-актину того же образца.

Реактивы

Помимо вышеуказанных, все реактивы, используемые в работе, были производства компании «Sigma-Aldrich», США.

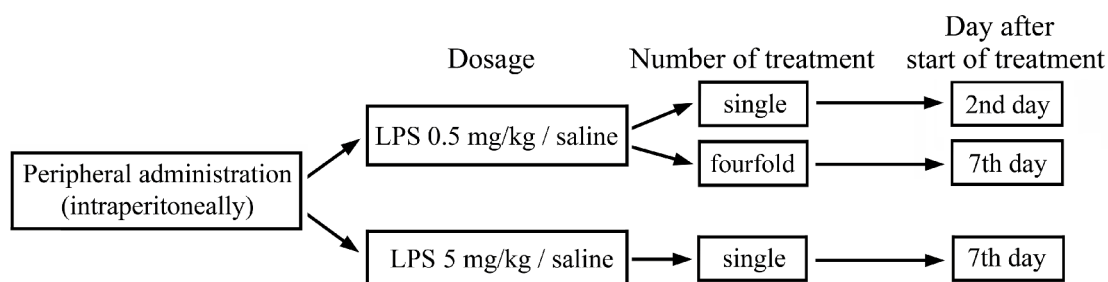


Рис. 1. Схема эксперимента. Взрослым самцам крыс внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозах 0.5 мг/кг (однократно и четырехкратно 1 раз в 2 дня в течение 7 дней, животных выводили из эксперимента через сутки после последнего введения) и 5 мг/кг (однократно, животных выводили из эксперимента через 7 дней после введения препаратов). Контрольные животные получали соответствующие инъекции физиологического раствора.

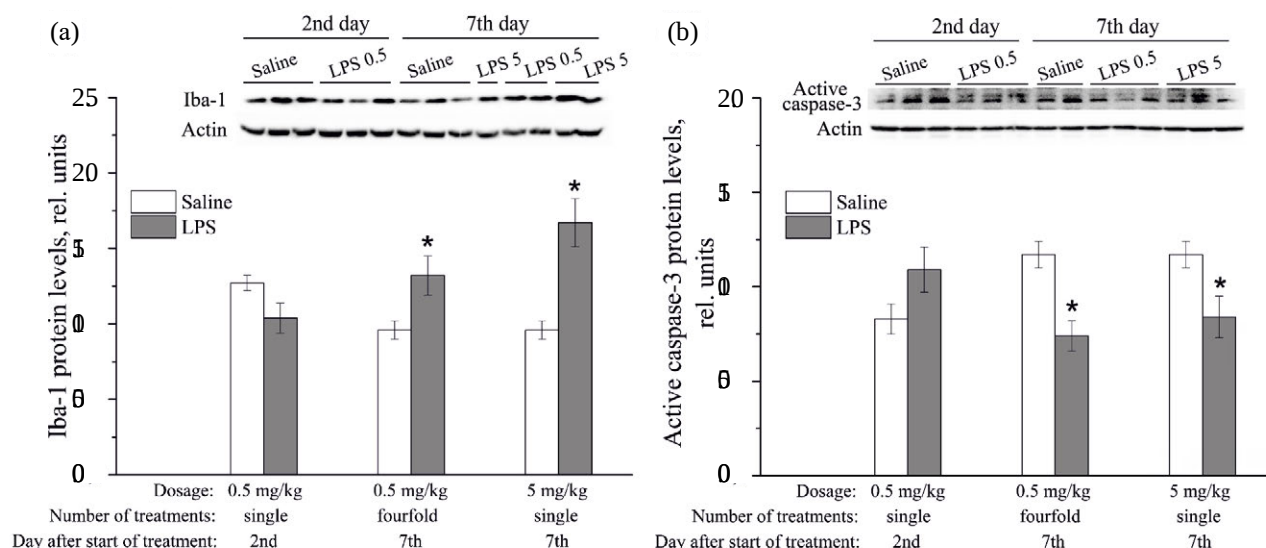


Рис. 2. Уровень белков Iba-1 (a) и активной каспазы-3 (b) в стволе мозга взрослых крыс после периферического введения ЛПС в разных дозах и режимах. $M \pm m$, выраженные в условных единицах относительно уровня белка β -актина, $n = 5-6$ животных на группу. * — $p < 0.05$ по сравнению группой, получавшей инъекцию физиологического раствора (one-way ANOVA, критерий LSD).

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Результаты представлены как $M \pm m$; межгрупповые различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ЛПС на уровень белков Iba-1 и активной каспазы-3 в стволе мозга взрослых крыс после внутрибрюшинного введения эндотоксина

В стволе мозга однократное внутрибрюшинное введение ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не повлияло на измеренную через сутки экспрессию маркерного бел-

ка активированной микроглии Iba-1 ($F_{(1,8)} = 3.73$, $p < 0.09$) (рис. 2a). Однако уровень этого белка был достоверно повышен через сутки после окончания повторных в течение недели инъекций эндотоксина (1 раз в 2 дня; 4 инъекции) ($F_{(1,8)} = 6.35$, $p < 0.05$). Уровень Iba-1 в стволе мозга был также повышен через неделю после однократной инъекции ЛПС в более высокой дозе (5 мг/кг) ($F_{(1,8)} = 17.29$, $p < 0.01$). Эти данные свидетельствуют, что внутрибрюшинное введение эндотоксина вызывает активацию микроглии в стволе мозга при применении высокой дозы ЛПС, как однократной, так и суммарной (повторные инъекции).

В стволе мозга через 24 ч после однократного введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не наблюдалось отличий от контрольных значений в уровне экспрессии ключевой исполнительной протеазы апоптоза

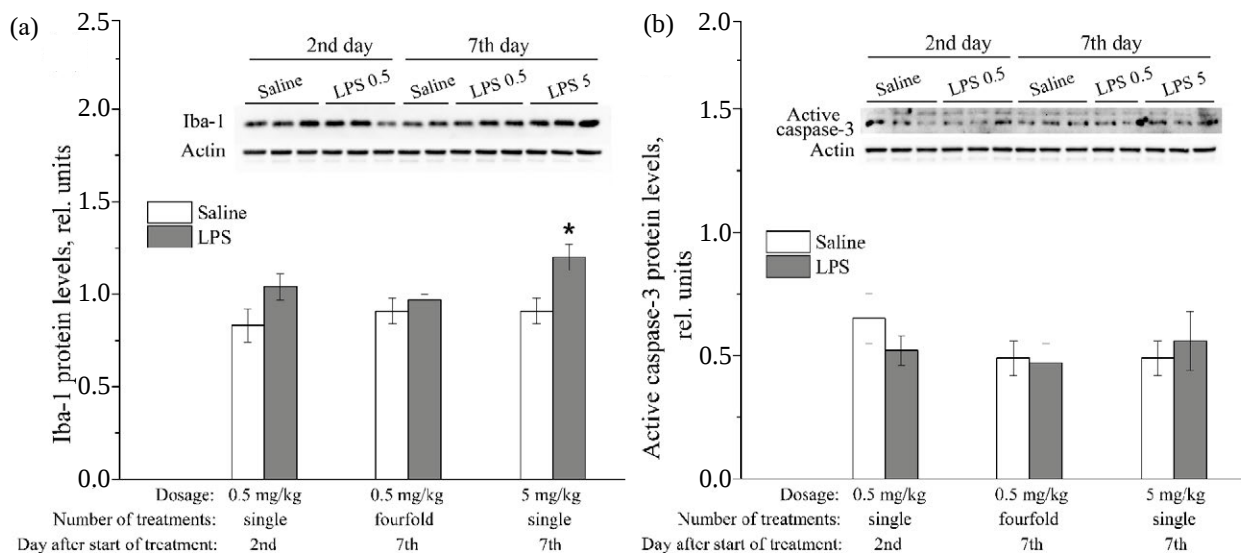


Рис. 3. Уровень белков Iba-1 (а) и активной каспазы-3 (б) в префронтальной коре взрослых крыс после периферического введения ЛПС в разных дозах и режимах. $M \pm m$, выраженные в условных единицах относительно уровня белка β -актина, $n = 5-6$ животных на группу. * — $p < 0.05$ по сравнению группой, получавшей инъекцию физиологического раствора (one-way ANOVA, критерий LSD).

(активной каспазы-3) (рис. 2b). Однако вопреки нашему ожиданию, при увеличении числа инъекций ЛПС в этой дозе до 4 в стволе обнаружено достоверное снижение уровня активной каспазы-3 ($F_{(1,8)} = 14.72$, $p < 0.01$). Снижение экспрессии активной каспазы-3 наблюдалось также через неделю после однократного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг ($F_{(1,9)} = 5.47$, $p < 0.05$).

Влияние ЛПС на уровень белков Iba-1 и активной каспазы-3 в префронтальной коре взрослых крыс после внутрибрюшинного введения эндотоксина

В префронтальной коре, внутрибрюшинное введение ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не влияло на экспрессии белка Iba-1, измеренные через сутки после окончания как однократного, так и повторяющихся каждые 2 дня в течение недели воздействий (рис. 3а). Через неделю после однократного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг в коре мозга обнаружено повышение уровня белка Iba-1 ($F_{(1,8)} = 8.99$, $p < 0.05$).

Уровень активной формы каспазы-3 в префронтальной коре не изменялся после всех использованных в работе доз и режимов воздействий эндотоксином (рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом работы явилось обнаружение противоположных изменений экспрессий

белков маркера активированной микроглии Iba-1 и исполнительный протеазы апоптоза каспазы-3 в стволе мозга после периферического воздействия провоспалительным стимулом. Увеличение уровня белка Iba-1 в этой структуре как через сутки после окончания повторных введений ЛПС (0.5 мг/кг; 1 раз в 2 дня в течение 7 дней), так и через 7 дней после однократного введения эндотоксина в более высокой дозе (5 мг/кг) сопровождалось достоверным снижением экспрессии активной формы каспазы-3. Хотя активацию микроглии рассматривают среди факторов индукции нейродегенеративных процессов [5, 8, 25], полученные нами данные свидетельствуют, что в стволе мозга под воздействием провоспалительного стимула, помимо микроглии, также активируются механизмы, связанные с подавлением апоптоза через снижение экспрессии каспазы-3. Повышенная экспрессия каспазы-3 описана при инсульте, травме спинного мозга, травме головы и болезни Альцгеймера, в то время как ингибиторы каспаз предотвращали потерю нейронов на животных моделях этих патологий [26]. Выявленное в нашей работе снижение экспрессии каспазы-3 в стволе мозга в ответ на системную индукцию воспаления может указывать на развитие в структуре нейроадаптивных защитных изменений, обеспечивающих нейроны ствола мозга большей устойчивостью к повреждающим провоспалительным стимулам. Одним из таких защитных изменений может быть переключение микроглии с M1 на M2-противовоспалительный фенотип [5, 27–29]. Ствол мозга отвечает за такие ключевые для орга-

низма функции как дыхание, артериальное давление и сердцебиение [30], кроме того, там расположен главный источник норадреналина — *Locus coeruleus*, участвующий в регуляции циркадных ритмов, внимания и поведения, а также некоторых аспектов памяти и обучения [31]. Поэтому устойчивость клеток ствола мозга к повреждающим воздействиям, в том числе и активирующим нейровоспаление, является жизненно важной.

Хотя в условиях наших экспериментов описанный эффект (повышение экспрессии Iba-1 и снижение экспрессии каспазы-3) обнаружен только в стволе, свидетельства защиты от индуцированной гибели клеток в результате острой активации иммунной системы опубликованы также и для других структур, прежде всего для гиппокампа. Введение крысам ЛПС внутривентрально в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг за 5 дней до травматического повреждения мозга снижало экспрессию каспазы-3 и число погибших нейронов в областях гиппокампа через 4 и 12 ч после травмы [20]. Однократная инъекция ЛПС (0.1 мг/кг) двухдневным крысам за 14 ч до гипоксии-ишемии эффективно защищала мозг от повреждений, связанных с патологическим воздействием [32]. Ослабление апоптоза нейронов после предварительного введения ЛПС обнаружено также на экспериментальных моделях церебральной ишемии (ишемия/реперфузия) [21] и травматического повреждения спинного мозга [33] у взрослых животных. Среди механизмов анти-нейродегенеративного влияния ЛПС рассматривают эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) [32], PI3K/Akt/FoxO1 путь [21], снижение экспрессии матриксной металлопротеазы-9 [34]. Важное значение для нейропротективного эффекта может иметь ингибирование каскада каспаз именно в клетках микроглии [35].

В отличие от ствола мозга, в префронтальной коре не было обнаружено активации микроглии и изменений в экспрессии активной каспазы-3 через сутки ни после однократного внутривентрального введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг, ни после четырехкратного введения эндотоксина в этой же дозе в течение недели. Повышение экспрессии маркера активированной микроглии белка Iba-1 было обнаружено только через 7 дней после однократного введения ЛПС в высокой дозе 5 мг/кг, что указывает на зависимость эффекта от дозы вводимого эндотоксина. Существенный вклад в развитие эффекта вносит, очевидно, и продолжительность введения. ЛПС, вводимый в дозе 0.5 мг/кг один раз в два дня в течение не одной, а двух недель, достоверно увеличивал экспрессию Iba-1 в префронтальной коре [13]. Способность ЛПС индуцировать активацию микроглии в этой структуре согласуется с данными также и других авторов [8, 36, 37]. Несмотря

на то, что имеется множество свидетельств прямой связи между активностью микроглии и повышением экспрессии каспазы-3 в префронтальной коре [16–19, 38], в нашем исследовании такой связи не выявлено. Отличия в эффектах ЛПС в коре мозга от данных других исследователей могли быть обусловлены различиями в используемых дозах эндотоксина, способах и продолжительности его введения, временем, прошедшим после воздействия ЛПС, а также видом экспериментальных животных [8, 39].

Выявленные региональные различия в ответах исследованных белков на ЛПС могут быть связаны с неоднородностью распределения микроглии в структурах мозга [40–42]. Кроме того, на взрослых крысах обнаружены региональные отличия в восприимчивости к нейротоксичности, индуцированной ЛПС. В этих исследованиях введение бактериального эндотоксина непосредственно в гиппокамп, кору или черную субстанцию вызывало спустя неделю нейродегенерацию только в черной субстанции, в то время как нейроны коры и гиппокампа оставались нечувствительными к ЛПС даже при значительно более высоких концентрациях эндотоксина [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом обнаруженное в работе снижение уровня активной формы каспазы-3 в стволе мозга в условиях индуцированной эндотоксином микроглиальной активации указывает на развитие нейроадаптивных процессов, направленных на повышение устойчивости нейронов ствола мозга к повреждающим провоспалительным стимулам.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Г.Т.Ш., Н.Н.Д.), сбор и обработка данных (А.В.Б., Г.Т.Ш.), написание и редактирование рукописи (А.В.Б., Г.Т.Ш., Н.Н.Д.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии Института Цитологии и Генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG* (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285–1291. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.8.1285>
2. *Nguyen MD, Julien JP, Rivest S* (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3:216–227. <https://doi.org/10.1038/nrn752>
3. *Leng F, Edison P* (2021) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 17:157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
4. *Shishkina GT, Kalinina TS, Gulyaeva NV, Lanshakov DA, Dygalo NN* (2021) Changes in Gene Expression and Neuroinflammation in the Hippocampus after Focal Brain Ischemia: Involvement in the Long-Term Cognitive and Mental Disorders. *Biochemistry (Mosc)* 86:657–666. <https://doi.org/10.1134/S0006297921060043>
5. *Guo S, Wang H, Yin Y* (2022) Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 14:815347. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>
6. *Xu Y, Gao W, Sun Y, Wu M* (2023) New insight on microglia activation in neurodegenerative diseases and therapeutics. *Front Neurosci* 17:1308345. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1308345>
7. *Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS* (2001) Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* 77:182–189. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00216.x>
8. *Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP* (2019) Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 20:2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
9. *Kalyan M, Tousif AH, Sonali S, Vichitra C, Sunanda T, Praveenraj SS, Ray B, Goranila VR, Rungratanawanich W, Mahalakshmi AM, Qoronfleh MW, Monaghan TM, Song BJ, Essa MM, Chidambaram SB* (2022) Role of Endogenous Lipopolysaccharides in Neurological Disorders. *Cells* 11:4038. <https://doi.org/10.3390/cells11244038>
10. *Klimiec E, Pera J, Chrzanowska-Wasko J, Golenia A, Slowik A, Dziedzic T* (2016) Plasma endotoxin activity rises during ischemic stroke and is associated with worse short-term outcome. *J Neuroimmunol* 297:76–80. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.006>
11. *Klimiec E, Pasinska P, Kowalska K, Pera J, Slowik A, Dziedzic T* (2018) The association between plasma endotoxin, endotoxin pathway proteins and outcome after ischemic stroke. *Atherosclerosis* 269:138–143. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.12.034>
12. *Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW* (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
13. *Shishkina GT, Bannova AV, Komysheva NP, Dygalo NN* (2020) Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala. *Stress* 23:708–714. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1793943>
14. *Morris G, Walker AJ, Berk M, Maes M, Puri BK* (2018) Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. *Mol Neurobiol* 55:5767–5786. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0793-y>
15. *Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M* (2019) Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* 8:(F1000 Faculty Rev):111. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>
16. *Yeh CH, Hsieh LP, Lin MC, Wei TS, Lin HC, Chang CC, Hsing CH* (2018) Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *PLoS One* 13: e0191070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191070>
17. *Chen PL, Xu GH, Li M, Zhang JY, Cheng J, Li CF, Yi LT* (2023) Yamogenin Exhibits Antidepressant-like Effects via Inhibition of ER Stress and Microglial Activation in LPS-Induced Mice. *ACS Chem Neurosci* 14:3173–3182. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00306>
18. *Khan MS, Ali T, Abid MN, Jo MH, Khan A, Kim MW, Yoon GH, Cheon EW, Rehman SU, Kim MO* (2017) Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the cortex and hippocampus of the adult rat brain. *Neurochem Int* 108:343–354. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.008>
19. *Muhammad T, Ikram M, Ullah R, Rehman SU, Kim MO* (2019) Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. *Nutrients* 11:648. <https://doi.org/10.3390/nu11030648>
20. *Eslami M, Alizadeh L, Morteza-Zadeh P, Sayyah M* (2020) The effect of Lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on hippocampal apoptosis in traumatic rats. *Neurol Res* 42:91–98. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1709139>
21. *He F, Zhang N, Lv Y, Sun W, Chen H* (2019) Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats. *Mol Med Rep* 19:1443–1452. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9827>
22. *Yu H, Kan J, Tang M, Zhu Y, Hu B* (2023) Lipopolysaccharide preconditioning restricts microglial Overactivation and alleviates inflammation-induced depressive-like behavior in mice. *Brain Sci* 13:549. <https://doi.org/10.3390/brainsci13040549>
23. *Kim WG, Mohnney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS* (2000) Regional difference in susceptibility

- to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309–6316.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06309.2000>
24. *Bannova AV, Menshanov PN, Dygalo NN* (2019) The Effect of Lithium Chloride on the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Neonatal Brain. *Neurochem J* 13:344–348.
<https://doi.org/10.1134/S1819712419030048>
 25. *Marogianni C, Sokratous M, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Bogdanos D, Xiromerisiou G* (2020) Neurodegeneration and Inflammation-An Interesting Interplay in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 21:8421.
<https://doi.org/10.3390/ijms21228421>
 26. *Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB* (2000) Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathol* 10:283–292.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x>
 27. *Tang Y, Le W* (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53:1181–1194.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
 28. *Kwon HS, Koh SH* (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9:42.
<https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
 29. *Sangaran PG, Ibrahim ZA, Chik Z, Mohamed Z, Ahmadi-ani A* LPS (2021) Preconditioning Attenuates Apoptosis Mechanism by Inhibiting NF- κ B and Caspase-3 Activity: TLR4 Pre-activation in the Signaling Pathway of LPS-Induced Neuroprotection. *Mol Neurobiol* 58:2407–2422.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02227-3>
 30. *Nicholls JG, Paton JFR* (2009) Brainstem: neural networks vital for life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2447–2451.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0064>
 31. *Minné D, Marnewick JL, Engel-Hills P* (2023) Early Chronic Stress Induced Changes within the Locus Coeruleus in Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 20:301–317.
<https://doi.org/10.2174/1567205020666230811092956>
 32. *Lu D, Evangelou AV, Shankar K, Dewji FI, Lin J, Levison SW* (2023) Neuroprotective effect of lipopolysaccharides in a dual-hit rat pup model of preterm hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett* 795:137033.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.137033>
 33. *Hu J, Huang K, Bao F, Zhong S, Fan Q, Li W* (2023) Low-dose lipopolysaccharide inhibits spinal cord injury-induced neuronal apoptosis by regulating autophagy through the lncRNA MALAT1/Nrf2 axis. *PeerJ* 11: e15919.
<https://doi.org/10.7717/peerj.15919>
 34. *Wang TH, Xiong LL, Yang SF, You C, Xia QJ, Xu Y, Zhang P, Wang SF, Liu J* (2017) LPS pretreatment provides neuroprotective roles in rats with subarachnoid hemorrhage by downregulating MMP9 and Caspase3 associated with TLR4 signaling activation. *Mol Neurobiol* 54:7746–7760.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0259-7>
 35. *Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B* (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472:319–324.
<https://doi.org/10.1038/nature09788>
 36. *Ji MH, Lei L, Gao DP, Tong JH, Wang Y, Yang JJ* (2020) Neural network disturbance in the medial prefrontal cortex might contribute to cognitive impairments induced by neuroinflammation. *Brain Behav Immun* 89:133–144.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.001>
 37. *Bowyer JF, Sarkar S, Burks SM, Hess JN, Tolani S, O'Callaghan JP, Hanig JP* (2020) Microglial activation and responses to vasculature that result from an acute LPS exposure. *Neurotoxicology* 77:181–192.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.01.014>
 38. *Badshah H, Ali T, Kim MO* (2016) Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NF κ B signaling pathway. *Sci Rep* 6:24493.
<https://doi.org/10.1038/srep24493>
 39. *Lopes PC* (2016) LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology* 24:291–293.
<https://doi.org/10.1007/s10787-016-0283-2>
 40. *Savchenko VL, Nikonenko IR, Skibo GG, McKanna JA* (1997) Distribution of microglia and astrocytes in different regions of the normal adult rat brain. *Neurophysiology* 29:343–351.
 41. *Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR, Skibo GG* (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96:195–203.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00538-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00538-2)
 42. *Tan YL, Yuan Y, Tian L* (2020) Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* 25:351–367.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>

CENTRAL RESPONSES TO PERIPHERAL INFLAMMATION MAY INCLUDE DECREASED EXPRESSION OF KEY APOPTOTIC PROTEASE CASPASE-3 IN BRAINSTEM

A. V. Bannova^{a, #}, G. T. Shishkina^a and N. N. Dygalo^a

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

[#]*e-mail: anitik@bionet.nsc.ru*

Microglia activation by proinflammatory stimuli, including lipopolysaccharide (LPS), is considered among the risk factors for neurodegeneration, but the LPS treatment may also have a neuroprotective effect, which leads to further analysis of the relationship between microglial activation and regulators of cell death. In the present work, a comparative study was carried out on proteins expression of marker for activated microglia Iba-1 and the apoptotic executor protease caspase-3 in the brainstem and prefrontal cortex of rats injected intraperitoneally with endotoxin at different doses and schedules. One day after LPS at a dose of 0.5 mg/kg, single, the Iba-1 and caspase-3 expression in both structures did not differ from control values. Endotoxin administration fourfold at the same dose over 7 days (once every 2 days) led one day after the last injection to a significant increase in the Iba-1 level in the brainstem, which was accompanied by a significant decrease in the expression of caspase-3. The same effects in this structure were observed 7 days after a single injection of LPS at a higher dose of 5 mg/kg. In a 7-day experiment, in contrast to the brainstem, no changes in caspase-3 expression were found in the frontal cortex, and an increase in Iba-1 expression was observed only after a single injection of LPS at a high dose. The detected decrease of caspase-3 level in the brain stem under neuroinflammatory conditions may reflect the development of neuroprotective processes, especially important for the structure responsible for such key body functions as respiration, blood pressure and heartbeat.

Keywords: lipopolysaccharide, active caspase-3, Iba-1, brainstem, prefrontal cortex

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СИСТЕМЫ ПАРВАЛЬБУМИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В СПИННОМ МОЗГЕ НОВОРОЖДЁННЫХ КОШЕК

© 2024 г. А. А. Вещицкий, А. В. Беляев, Н. С. Меркулева*

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

**e-mail: merkulyevan@infran.ru*

Поступила в редакцию 26.02.2024 г.

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к публикации 18.04.2024 г.

Проведено исследование особенностей экспрессии кальций-связывающего белка парвальбумина в пояснично-крестцовом отделе спинного мозга новорождённых и взрослых кошек. В отличие от взрослых животных, у новорожденных иммунонегативность к парвальбумину выявлено главным образом в афферентных волокнах, расположенных в дорзальных рогах и медиальной части промежуточного серого вещества. Локализация этих волокон частично повторяет положение ядер Кларка, но не ограничена их классическими границами, охватывая всю протяжённость поясничного отдела и переходя в предполагаемое ядро Штиллинга, расположенное в крестцовом отделе. Таким образом, парвальбумин-иммунопозитивные проприоцептивные волокна у новорожденных, в отличие от взрослых, представляют собой единую систему. Полагаем, что с возрастом в связи с созреванием и разрастанием элементов поясничного утолщения, связанных, в первую очередь, с локомоторной функцией, происходит перестройка этой непрерывной системы волокон с выделением локальных элементов, таких как ядра Кларка и Штиллинга. Единственными спинальными нейронами, маркированными парвальбумином у новорожденных, являются премооторные интернейроны, расположенные вдоль кривизны пластины IX. Для этих клеток характерно полное или частичное отсутствие экспрессии нейронального белка NeuN, что свидетельствует об особенностях нейробиохимического статуса таких нейронов.

Ключевые слова: кальций-связывающий белок, парвальбумин, спинной мозг, спинно-мозжечковые тракты, ядро Кларка, ядро Штиллинга

DOI: 10.31857/S0044452924030082, EDN: YWXRTY

ВВЕДЕНИЕ

Проприоцепция — неосознанное чувство положения частей тела в пространстве, необходимое для координированной моторики [1]. Проприоцепцию связывают с работой таких рецепторов, как мышечные веретена, сухожильные органы Гольджи и суставные рецепторы [2]. Информации от этих рецепторов поступает в спинной мозг и оттуда напрямую, через пучки Голля и Бурдаха — в продолговатый мозг [3] или через серию переключений в мозжечок в составе дорзального и вентрального спинно-мозжечковых трактов [2, 4–6]. В каудальной части спинного мозга основными источниками спинно-мозжечковых трактов являются 3 области серого вещества: ядра Кларка, расположенные у хищных, грызунов и приматов на уровне ниже-грудных и верхне-поясничных сегментов [7–11]; ядро Штиллинга, расположенное у грызунов в крестцовых и копчиковых сегментах [12, 13], у приматов — со среднепоясничного по крестцовый отдел [14].

Для хищных существование этого ядра окончательно не определено [15, 16]. Третий тип — пограничные клетки, залегающие вдоль вентро-латеральной границы серого и белого вещества [6, 17, 18]. У хищных и грызунов пограничные клетки выявлены в ниже-грудных и поясничных сегментах [16, 19, 20], у приматов — в нижнепоясничном отделе [21, 22].

Селективным маркером проприоцептивных нейронов спинальных ганглиев принято считать кальций-связывающий белок парвальбумин [23–29]. В белом веществе спинного мозга мыши иммунопозитивные аксоны этих клеток заметны в составе восходящих пучков дорзального канатика [3]. В пределах серого вещества крысы и кошки иммунонегативность к парвальбумину главным образом выявлено в пределах ядер Кларка [30–33]. При этом у кошки парвальбумин-иммунопозитивные нейроны также выявлены вне границ этого ядра: в более каудальных поясничных сегментах, где они распо-

жены разрозненно или формируют кластеры [33]. В целом эти области совпадают с локализацией нейронов, принадлежащих дорзальному спинно-мозжечковому тракту, расположенных у кошки за пределами исторических границ ядра Кларка [4, 5, 18, 34, 35]. Более того, скопление иммунопозитивного нейропиля и нейронов наблюдается и в крестцовых сегментах мыши и кошки [32, 36]; у мыши это соответствует положению ядра Штиллинга [36]. Мы предположили, что перечисленные парвальбумин-экспрессирующие элементы могут быть частью единой системы, организующей проекции к мозжечку в составе дорзального спинно-мозжечкового тракта. Поскольку развитие системы парвальбумин-позитивных нейронов спинного мозга происходит очень рано — главным образом во время пренатального и раннего постнатального периода, мы провели сравнительное картирование парвальбумин-иммунопозитивных элементов пояснично-крестцового отдела спинного мозга у новорождённых животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы образцы поясничного отдела спинного мозга от 3 нормально пигментированных взрослых кошек (весом 2.5–3.5 кг) и от 3 новорождённых котят в возрасте 0–4 дней. Образцы головного мозга всех животных также были использованы в иных исследованиях [37–39]. Картирование парвальбумин-иммунопозитивных элементов у взрослых было проведено ранее [32, 33], поэтому в данной работе мы не останавливаемся на нём подробно, но только в сравнительном аспекте.

Под глубоким наркозом (5% изофлюран) 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% натрия хлорид, 700–800 мл/кг, pH 7.4), фиксацию тканей — 4% раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4, 600–700 мл/кг). После перфузии спинной мозг извлекали из позвоночника и последовательно выдерживали в 20% и 30% растворах сахарозы до погружения. Деление спинного мозга на сегменты (L1–S3) проводили, ориентируясь на дорзальные корешки. На замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали поперечные и горизонтальные срезы толщиной 50 мкм.

Выявление антигенов проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода на свободно плавающих срезах. В начале выполнения протокола и между всеми процедурами срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (Биолот, Россия) 3 раза по 10 мин. Демаскировку антигенов проводили в 1% NaBH_4 в течение 15 мин.

Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем получасовой инкубации в 0.3% H_2O_2 . Неспецифическую реакцию антител подавляли 1.5% нормальной сывороткой козы (NGS, Vector Labs, Великобритания) (90 минут). Затем, не промывая, срезы инкубировали в течение 72 ч при +4°C в растворе первичных поликлональных антител кролика к парвальбумину (Abcam, Великобритания, Cat.# ab11427, RRID: AB_298032, разведение 1:10000) и первичных моноклональных антител мыши к NeuN (Millipore, США, Cat.# MAB377, RRID: AB_2298772; разведение 1:5000) с добавлением, 0.05% тритона X-100, 1.5% NGS и консерванта 0.1% NaN_3 . Затем срезы инкубировали в растворах вторичных конъюгированных с флуорохромом антител коза анти-кролик (Alexa Fluor568, Abcam, Великобритания, Cat.# ab150113, RRID: AB_2576207, разведение 1:500) и коза анти-мышь (Alexa Fluor488, Abcam, Великобритания, Cat.# ab175471, RRID: AB_2576208, разведение 1:500). К раствору вторичных антител добавляли 1% NGS и 0.1% тритон X-100. Инкубацию проводили в термостате при температуре +37°C в течение 2 ч. После промывки в дистиллированной воде срезы монтировали на желатинизированные предметные стекла, высушивали и заключали в 80% глицерин.

Срезы с выявленным антигеном оцифровывали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Германия) в Ресурсном центре молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского государственного университета (РЦ РМиКТ СПбГУ). Корректировку контраста и яркости проводили в свободном программном комплексе Fiji [40]. Для точного определения локализации нейронов в пределах пластин, использовали NeuN-иммуноочечение. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистического анализа не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех анализируемых сегментах у новорождённых и взрослых животных парвальбумин-иммунопозитивная (ПВ+) метка выявлена как в соме нейронов, так и в нейропиле. Особенности распределения ПВ+ нейронов в сером веществе спинного мозга новорождённых и взрослых животных были получены при анализе поперечных срезов и представлены в таблице 1.

Вне зависимости от сегмента, у взрослых кошек областью максимальной локализации ПВ+ нейронов и ПВ+ нейропиля является медиальная часть пластин V–VII и область вокруг мотонейронных пулов. В верхнепоясничном отделе первая область соответствует локализации ядер Кларка. В нижнепоясничных сегментах также выявлены скопления

ПВ+ нейронов: в тех же областях серого вещества, что и в вышележащих сегментах. значительно число ПВ+ нейронов у животных обоих возрастов выявлено в области вокруг мотонейронных пулов. Редкие ПВ+ нейроны также выявляются в пластинах II–III, но только у взрослых животных. Таким образом, единственными ПВ+ нейронами у новорождённых являются нейроны пластин VII–IX вокруг мотонейронных пулов (площадь сомы нейронов: 317 ± 106 мкм²).

Для новорожденных котят, в отличие от взрослых, характерно наличие пучков ПВ+ волокон в медиальной половине дорзальных рогов; эти волокна следуют от дорзального канатика белого вещества к локусам с высокой плотностью ПВ+ нейропиля в симметричных относительно центрального канала областях медиальной части пластин V–VI и пластины VII (рис. 1). Если у взрослых подобный нейропилъ выявлен главным образом на уровне сегментов L1–L5 и S1–S3, то у новорождённых он наблюдается в пределах каждого из исследованных сегментов, и снижение интенсивности иммуномечения выявлено только для самого каудального уровня: границы сегментов S3 и Co1 (рис. 1, S3). Таким образом, у новорождённых, в отличие от взрослых, слабо выражено иммуномечение сомы, но доминирует иммуномечение нейропиля. В целом у новорождённых ПВ+ элементы медиальной части пластин V–VII представляют собой единую систему, проходящую через весь пояснично-крестцовый отдел спинного мозга.

Для получения полной картины ростокаудального распределения ПВ+ волокон у новорожденных, исследовали горизонтальные срезы, проходящие через пояснично-крестцовый отдел спинного мозга. В этой плоскости очень хорошо видна регулярная упорядоченность во входах проприоцептивных волокон в спинной мозг в виде пучков (рис. 2).

Расстояние между отдельными пучками составило 101 ± 29 мкм.

В процессе идентификации нейронов спинного мозга мы провели двойное иммуномечение, используя общий нейрональный маркер — белок NeuN [41]. Как видно из рис. 3, ПВ+ нейроны в области вокруг мотонейронных пулов или являются иммуно-негативными к NeuN, или имеют очень слабое иммуномечение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У взрослых и новорождённых животных наибольшая выраженность парвальбумин-иммунопозитивной реакции выявлена в медиальной части пластин V–VII. При этом у новорожденных кошек, в отличие от взрослых, она охватывает не только верхнепоясничные и нижнекрестцовые сегменты, что соответствует локализации ядер Кларка и Штиллинга [32, 33, 42, 43], но полностью все сегменты пояснично-крестцового отдела. При этом анализ локализации парвальбумин-иммунопозитивных нейронов у взрослых позволяет увидеть, что их скопления в той же области пластин V–VII соответствует областям, в которых у новорожденных выявлено интенсивное иммуномечение нейропиля. Полученные данные частично сходны с таковыми, что были получены на взрослых мышях в [36]. При использовании комбинации ретроградного трейсирования и иммуномечения, показано, что спинальные нейроны, инициирующие проекции к мозжечку и иммунопозитивные к кальций-связывающим белкам, в большей степени, парвальбумину, расположены вдоль всего протяжения спинного мозга, а не только в ядрах Кларка и Штиллинга. Полагаем, что с возрастом, в результате значительного снижения иммунопозитивной метки нейропиля,

Таблица 1. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных нейронов в сером веществе спинного мозга новорождённых и взрослых кошек

	Новорождённые	Взрослые
Пластина I	—	Мелкие биполярные нейроны
Пластины II–III	—	Мелкие веретеновидные нейроны
Пластины V–VII, медиальная область	—*	Мелкие овальные или мелкие и крупные мультиполярные нейроны
Пластины VII, вентромедиальная область	—	Мелкие и крупные мультиполярные нейроны
Пластины VII–IX	Мультиполярные нейроны	Мелкие и крупные мультиполярные нейроны

* невозможно определить из-за маскирующего мечения нейропиля

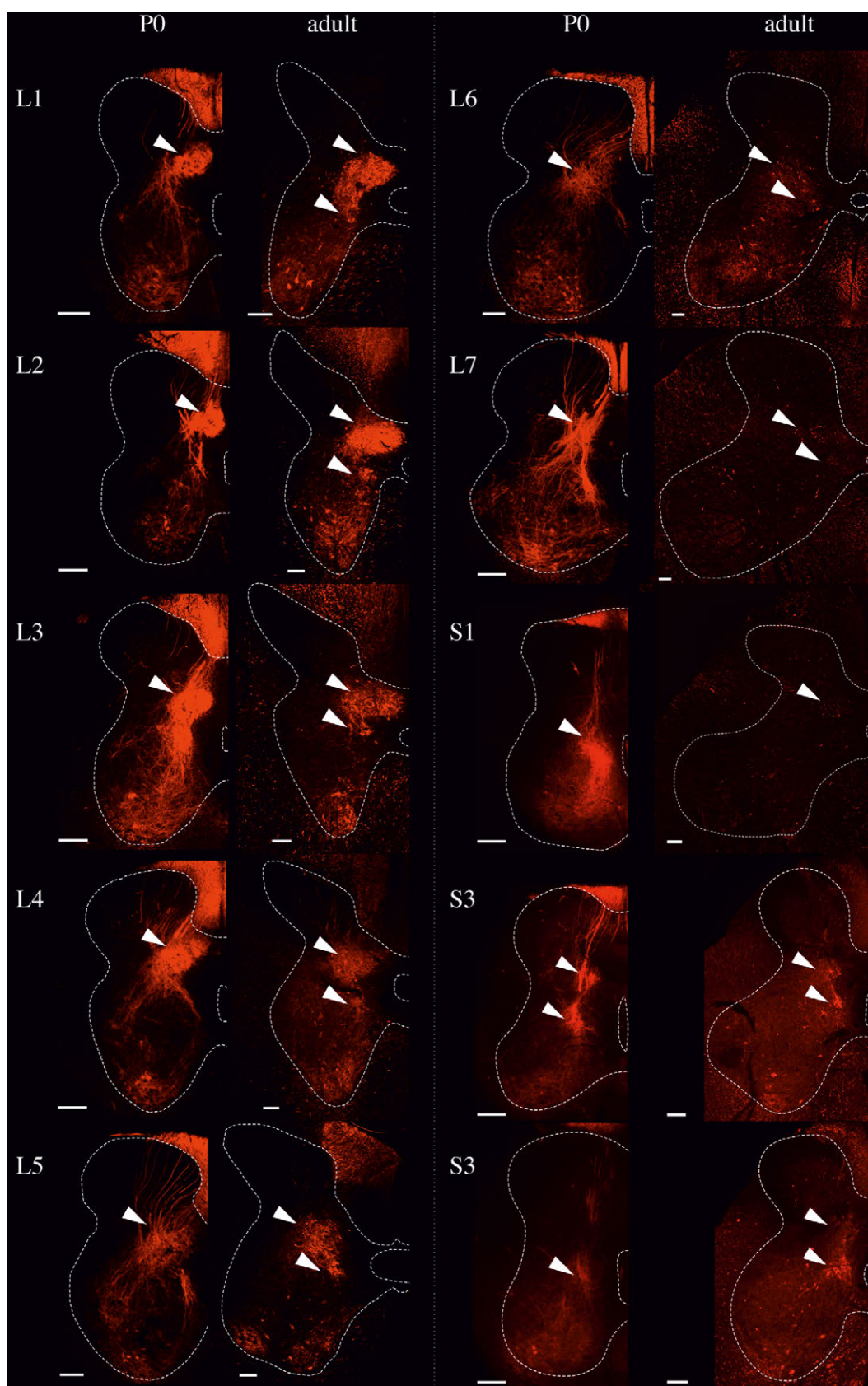


Рис. 1. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных элементов на поперечных срезах спинного мозга новорожденных и взрослых кошек. L1–L7 — поясничные сегменты, S1–S3 — крестцовые сегменты. Белые контурные линии маркируют границы серого вещества.

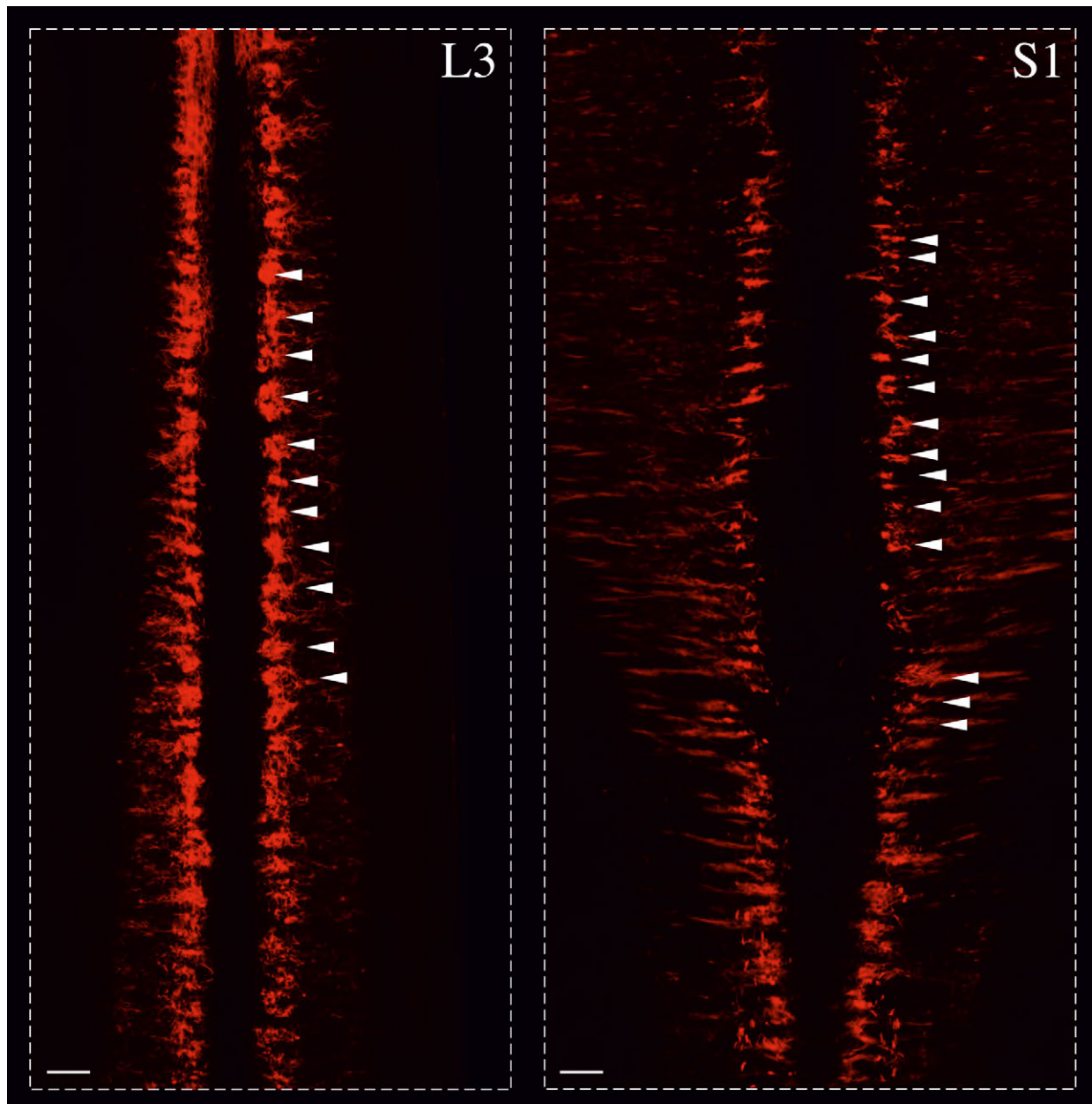


Рис. 2. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных элементов на горизонтальных срезах спинного мозга новорожденных кошек. L3, S1 — поясничный и крестцовый сегменты. Белыми стрелками обозначены отдельные пучки волокон.

данная единая система парвальбумин-позитивных элементов начинает казаться не непрерывной.

Данные о развитии спинальных элементов, синтезирующих парвальбумин, практически отсутствуют; есть лишь единичные работы. Например, на иллюстрациях работы [44] видны парвальбумин-иммунопозитивные волокна, входящие в дорзальные рога и следующие к мотонейронам, а также парвальбумин-иммунопозитивные нейроны в пластинах VIII и III у котят в возрасте 3 недель.

Таким образом, интенсивно меченые волокна, которые мы видим у новорожденных, сохраняются как минимум до 3-недельного возраста. Сходное интенсивное иммуномечение афферентных волокон и сходный паттерн их входа в спинной мозг в виде пучков волокон (*fasciculi*) были ранее показаны у грызунов [30] и приматов [45].

Мы отметили значительно меньшее число парвальбумин-иммунопозитивных нейронов у новорожденных животных и их преимущественную

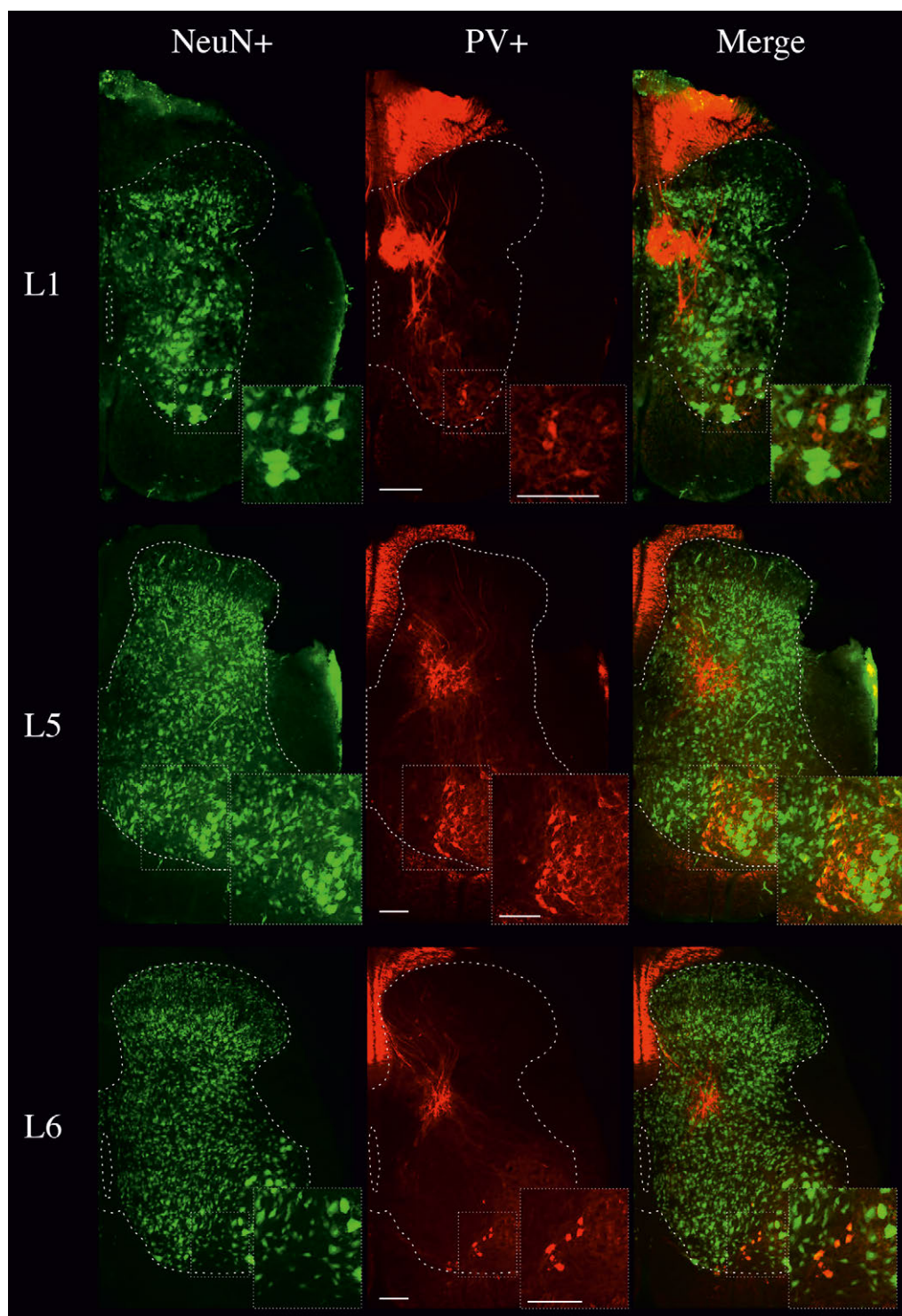


Рис. 3. Распределение парвальбумин- и NeuN-иммунопозитивных элементов на поперечных срезах спинного мозга новорожденных кошек. L1, L5, L6 — поясничные сегменты. Белые контурные линии маркируют границы серого вещества.

локализацию в области вокруг мотонейронных пулов. Данный факт связан с отсроченным развитием иммуномечения сомы нейронов по сравнению с иммуномечением волокон, что было показано

на модели грызунов [46, 47]. Согласно [46], первыми начинают синтезировать парвальбумин нейроны, расположенные вокруг мотонейронных пулов. Нейроны мелкого размера, экспрессирующие пар-

вальбумин, появляются в дорзальных рогах возрасте у крыс в возрасте P14–P21 [30, 31]. Вероятно, по этой причине мы не смогли визуализировать парвальбумин-иммунопозитивные нейроны в дорзальных рогах новорождённых кошек.

Отметим также, что в данной работе мы выявили слабое иммуномечение к общему нейрональному белку NeuN (или даже его отсутствие) у парвальбумин-иммунопозитивных нейронов вентральных рогов спинного мозга. Ранее NeuN-иммунонегативность была показана для ряда нейрональных популяций головного мозга (см. обзор [48]) и гамма-мотонейронов спинного мозга [49]. Поскольку гамма-мотонейроны иннервируют интрафузальные мышечные веретена [50], полагаем, что выявленная особенность нейрoхимического статуса может быть характерной для ряда нейронов спинного мозга, вовлеченных в контроль проприоцепции. Отметим также, что ранее мы выявили NeuN-иммунонегативность нейронов среднемозгового ядра тройничного нерва, также являющегося элементом проприоцептивной системы [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, основными результатами данной работы является:

1. Выявление единой сети, тянущейся вдоль всего пояснично-крестцового отдела, парвальбумин-иммунопозитивных элементов спинного мозга. Наиболее явно эта сеть визуализируется у новорождённых животных, у которых локомоторные способности ещё незрелы и соответствующие нейронные сети спинного мозга, расположенные в поясничном утолщении, не развиты. Полученные данные позволяют предположить общность механизмов формирования проприоцептивной системы и связанных с ней спинальных сетей в широком ряду млекопитающих.

2. Иммунонегативность парвальбумин-позитивных нейронов вентральных рогов спинного мозга к общему нейрональному белку NeuN, что указывает на специфичность нейрoхимии этих нейронных популяций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской де-

кларации и рекомендациям этического комитета Института физиологии РАН (протокол #30/01/2020).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411653-4-3.1.8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sherrington CS, Laslett EE* (1903) Observations on some spinal reflexes and the interconnection of spinal segments. *J Physiol* 29:58–96.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000946>
2. *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>
3. *Niu J, Ding L, Li JJ, Kim H, Liu J, Li H, Moberly A, Badea TC, Duncan ID, Son Y-J, Scherer SS, Luo W* (2013) Modality-based organization of ascending somatosensory axons in the direct dorsal column pathway. *J Neurosci* 33:17691–17709.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3429-13.2013>
4. *Matsushita M, Yaginuma H* (1989) Spinocerebellar projections from spinal border cells in the cat as studied by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 288:19–38.
<https://doi.org/10.1002/cne.902880103>
5. *Stecina K, Fedirchuk B, Hultborn H* (2013) Information to cerebellum on spinal motor networks mediated by the dorsal spinocerebellar tract. *J Physiol* 591:5433–5443.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.249110>
6. *Shrestha SS, Bannatyne BA, Jankowska E, Hammar I, Nilsson E, Maxwell DJ* (2012) Excitatory inputs to four types of spinocerebellar tract neurons in the cat and the rat thoraco-lumbar spinal cord. *J Physiol* 590:1737–1755.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226852>
7. *Clarke JAL* (1997) 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>
8. *Hogg ID* (1944) The development of the nucleus dorsalis (Clarke's column). *J Comp Neurol* 81:69–95.
<https://doi.org/10.1002/cne.900810105>
9. *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)

10. *Molander C, Xu Q, Grant G* (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230:133–141. [https://doi.org/ 10.1002/cne.902300112](https://doi.org/10.1002/cne.902300112)
11. *Akopian A, Runyan SA, Phelps PE* (2003) Expression of L1 decreases during postnatal development of rat spinal cord. *J Comp Neurol* 467:375–388. [https://doi.org/ 10.1002/cne.10956](https://doi.org/10.1002/cne.10956)
12. *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](https://doi.org/10.1002/cne.903050112)
13. *Sengul G, Watson C, Tanaka I, Paxinos G* (2012) Atlas of the spinal cord: mouse, rat, rhesus, marmoset, and human. Elsevier Science
14. *Mott F* (1888) Microscopical examination of Clarke's column in man, the monkey, and the dog. *J Anat Physiol* 22:479–495
15. *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](https://doi.org/10.1002/cne.901810409)
16. *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](https://doi.org/10.1002/cne.901840106)
17. *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](https://doi.org/10.1002/cne.901330204)
18. *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](https://doi.org/10.1007/BF00250601)
19. *Petrus 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* 173:693–716. [https://doi.org/ 10.1002/cne.901730405](https://doi.org/10.1002/cne.901730405)
20. *Zhang Y, Luo Y, Sasamura K, Sugihara I* (2021) Single axonal morphology reveals high heterogeneity in spinocerebellar axons originating from the lumbar spinal cord in the mouse. *J Comp Neurol* 529:3893–3921. [https://doi.org/ 10.1002/cne.25223](https://doi.org/10.1002/cne.25223)
21. *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](https://doi.org/10.1093/brain/63.2.123)
22. *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](https://doi.org/10.1152/jn.1953.16.5.464)
23. *Celio MR* (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375–475. [https://doi.org/ 10.1016/0306-4522\(90\)90091-h](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-h)
24. *Ren K, Ruda MA* (1994) A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Rev* 19:163–179. [https://doi.org/ 10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
25. *Clowry GJ, Arnott GA, Clement-Jones M, Fallah Z, Gould S, Wright C* (2000) Changing pattern of expression of parvalbumin immunoreactivity during human fetal spinal cord development. *J Comp Neurol* 423:727–735
26. *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](https://doi.org/10.1038/nn.2637)
27. *John A, Brylka H, Wiegrefe C, Simon R, Liu P, Jüttner R, Crenshaw EB, Luyten FP, Jenkins NA, Copeland NG, Birchmeier C, Britsch S* (2012) Bcl11a is required for neuronal morphogenesis and sensory circuit formation in dorsal spinal cord development. *Dev Camb Engl* 139:1831–1841. [https://doi.org/ 10.1242/dev.072850](https://doi.org/10.1242/dev.072850)
28. *Dallman MA, Ladle DR* (2013) Quantitative analysis of locomotor defects in neonatal mice lacking proprioceptive feedback. *Physiol Behav* 120:97–105. [https://doi.org/ 10.1016/j.physbeh.2013.07.005](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.07.005)
29. *Ni Y, Nawabi H, Liu X, Yang L, Miyamichi K, Tedeschi A, Xu B, Wall NR, Callaway EM, He Z* (2014) Characterization of long descending premotor propriospinal neurons in the spinal cord. *J Neurosci* 34:9404–9417. [https://doi.org/ 10.1523/JNEUROSCI.1771-14.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1771-14.2014)
30. *Zhang JH, Morita Y, Hironaka T, Emson PC, Tohyama M* (1990) Ontological study of calbindin-D28k-like and parvalbumin-like immunoreactivities in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 302:715–728. [https://doi.org/ 10.1002/cne.903020404](https://doi.org/10.1002/cne.903020404)
31. *Clowry GJ, Fallah Z, Arnott G* (1997) Developmental expression of parvalbumin by rat lower cervical spinal cord neurones and the effect of early lesions to the motor cortex. *Dev Brain Res* 102:197–208. [https://doi.org/ 10.1016/s0165-3806\(97\)00098-9](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(97)00098-9)
32. *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](https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1034395)
33. *Veshchitskii A, Musienko P, Merkulyeva N* (2023) Distribution of parvalbumin-expressing neuronal populations in the cat cervical and lumbar spinal cord gray matter. *J Evol Biochem Physiol* 59(4): 1100–1111.
34. *Aoyama M, Hongo T, Kudo N* (1988) Sensory input to cells of origin of uncrossed spinocerebellar tract located below Clarke's column in the cat. *J Physiol* 398:233–257. [https://doi.org/ 10.1113/jphysiol.1988.sp017040](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017040)
35. *Matsushita M* (1988) Spinocerebellar projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments in the cat, as studied by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 274:239–254. [https://doi.org/ 10.1002/cne.902740208](https://doi.org/10.1002/cne.902740208)
36. *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](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.002)
37. *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](https://doi.org/10.1007/s10571-018-0585-6)

38. *Mikhalkin A, Nikitina N, Merkulyeva N* (2021) Heterochrony of postnatal accumulation of nonphosphorylated heavy-chain neurofilament by neurons of the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 529:1430–1441. [https://doi.org/ 10.1002/cne.25028](https://doi.org/10.1002/cne.25028)
39. *Merkulyeva N, Mikhalkin A* (2024) Transient expression of heavy-chain neurofilaments in the perigeniculate nucleus of cats. *Brain Struct Funct.* [https://doi.org/ 10.1007/s00429-023-02752-6](https://doi.org/10.1007/s00429-023-02752-6)
40. *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](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019)
41. *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](https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201)
42. *Rexed B* (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 100:297–379. [https://doi.org/ 10.1002/cne.901000205](https://doi.org/10.1002/cne.901000205)
43. *Réthelyi M, Szentágothai J* (1973) Distribution and connections of afferent fibres in the spinal cord. In: Iggo A (ed) *Somatosensory System*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 207–252
44. *Chakrabarty S, Shulman B, Martin JH* (2009) Activity-dependent codevelopment of the corticospinal system and target interneurons in the cervical spinal cord. *J Neurosci* 29:8816–8827. [https://doi.org/ 10.1523/JNEUROSCI.0735-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-09.2009)
45. *Knyihár-Csillik E, Rakic P, Csillik B* (1999) Illusive transience of parvalbumin expression during embryonic development of the primate spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 17:79–97. [https://doi.org/ 10.1016/s0736-5748\(98\)00090-2](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(98)00090-2)
46. *Siembab VC, Smith CA, Zagoraiou L, Berrocal MC, Mentis GZ, Alvarez FJ* (2010) Target selection of proprioceptive and motor axon synapses on neonatal V1-derived Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells. *J Comp Neurol* 518:4675–4701. [https://doi.org/ 10.1002/cne.22441](https://doi.org/10.1002/cne.22441)
47. *Floyd TL, Dai Y, Ladle DR* (2018) Characterization of calbindin D28k expressing interneurons in the ventral horn of the mouse spinal cord. *Dev Dyn* 247:185–193. [https://doi.org/ 10.1002/dvdy.24601](https://doi.org/10.1002/dvdy.24601)
48. *Alekseeva OS, Gusel'nikova VV, Beznin GV, Korzhevskii DE* (2015) Prospects for the application of the NeuN nuclear protein as a marker of the functional state of nerve cells in vertebrates. *J Evol Biochem Physiol* 51(5): 357–369.
49. *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](https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-42)
50. *Taylor A, Ellaway PH, Durbaba R* (1999) Why are there three types of intrafusal muscle fibers? *Prog Brain Res* 123:121–131. [https://doi.org/ 10.1016/s0079-6123\(08\)62849-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62849-6)
51. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Nikitina N* (2020) Characteristics of the neurochemical state of neurons in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in cats. *Neurosci Behav Physiol* 50(4): 511–515.

A COMPARATIVE DISTRIBUTION OF PARVALBUMIN-IMMUNOPosITIVE NEURAL ELEMENTS IN THE SPINAL CORD OF NEWBORN AND ADULT CATS

A. A. Veshchitskii, A. V. Belyaev and N. S. Merkulyeva#

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

e-mail: merkulyevan@infran.ru

We analyzed characteristic features of the parvalbumin-immunostaining within the lumbosacral spinal cord of newborn kittens. In contrast to the adults, parvalbumin-immunostaining was mainly revealed for the sensory fibers located within the dorsal horns and in the medial part of the intermediate gray matter. The location of these fibers partially resembles the location of Clarke's nuclei, but lasted throughout the total length of the lumbar spinal cord and merged with the presumptive Stilling's nuclei in the sacral region. Therefore, in newborns, in contrast to adults, the parvalbumin-immunostaining proprioceptive fibers seem like a single unit. We propose that with maturation, this system is restructured because of the spread of the neuronal and neuropil elements of the lumbar enlargement responsible for the locomotor control. As a result, two local nuclear complexes: Clarke's and Stilling's are retained. A single population of parvalbumin-immunostaining neurons in newborns are premotor interneurons located around the lamina IX. These neurons are characterized by the low or absent NeuN-immunostaining. We believe that this neurochemical feature may be inherent for these cells.

Keywords: calcium-binding proteins, parvalbumin, spinal cord, spino-cerebellar tracts, Clarke's nucleus, Stilling nucleus

ИЗМЕНЕНИЯ КРОВОТОКОВ В КРАНИАЛЬНОЙ И КАУДАЛЬНОЙ ПОЛЫХ ВЕНАХ У КРОЛИКОВ ПРИ ПОСТУРАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОПРАНОЛОЛА, БИСОПРОЛОЛА И МЕТИЛДОФЫ

© 2024 г. В. И. Евлахов^{1,2,*}, Т. П. Березина¹, Т. В. Сергеев¹,
М. В. Куропатенко¹, И. З. Поясов¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: viespbru@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 04.04.2024 г.

Принята к публикации 26.04.2024 г.

Для лечения гиперadrenergической формы синдрома постуральной ортостатической тахикардии в клинической практике применяются блокатор $\beta_{1,2}$ -адренорецепторов пропранолол, β_1 -блокатор бисопролол и центральный агонист тормозных пресинаптических α_2 -адренорецепторов - метилдофа. Сведения о влиянии указанных препаратов на кровотоки в полых венах при постуральных воздействиях в литературе отсутствуют. В острых опытах на наркотизированных кроликах мы изучали изменения кровотоков в краниальной и каудальной полых венах при ортостатическом (угол наклона стола головой вверх на 25°) и антиортостатическом (угол наклона стола головой вниз на -25°) воздействиях в течение 20 с на фоне предварительного внутривенного введения пропранолола, бисопролола и метилдофы. До применения указанных препаратов в ответ на ортостаз на 4 и 20 с отмечено снижение кровотоков в краниальной и каудальной полых венах. При антиортостазе на 4 с кровоток в каудальной вене возрастал, а к 20 с снижался до исходного значения; кровоток в краниальной вене на 4 с уменьшался, а к 20 с — был больше исходного. В ответ на применение пропранолола кровоток в каудальной полый вене снижался в большей степени, чем при внутривенном введении бисопролола и метилдофы. После применения метилдофы при ортостазе к 20 с кровоток в краниальной полый вене уменьшался более выражено, чем в каудальной, тогда как на фоне действия пропранолола и бисопролола в условиях ортостаза кровотоки в полых венах снижались примерно в равной степени. При антиортостазе к 20 с на фоне применения пропранолола кровоток в каудальной полый вене возрастал больше, чем в краниальной. В условиях применения бисопролола и метилдофы в ответ на антиортостаз кровоток в краниальной полый вене возрастал не только в большей степени, чем в каудальной, но и более выражено по сравнению с его приростом у кроликов исходно. Следовательно, при постуральных воздействиях на фоне применения указанных препаратов проявляются различия механизмов перераспределений кровотоков в бассейнах краниальной и каудальной полых вен.

Ключевые слова: кровоток в краниальной полый вене, кровоток в каудальной полый вене, ортостаз, анти-ортостаз, пропранолол, бисопролол, метилдофа

DOI: 10.31857/S0044452924030093, **EDN:** YWVNPB

ВВЕДЕНИЕ

В клинической кардиологии известен синдром постуральной ортостатической тахикардии (POTS) [1]. Указанный синдром также отмечен у больных, перенесших COVID-19 [2, 3]. В патофизиологии развития постуральной тахикардии выделяют нейропатический, гиповолемический и гиперadrenergический механизмы [3, 4]. В последнем случае для фармакологической коррекции отмеченного выше синдрома применяются неселективный блокатор

$\beta_{1,2}$ -адренорецепторов — пропранолол, β_1 -блокатор бисопролол, а также центральный агонист тормозных пресинаптических α_2 -адренорецепторов — метилдофа [4]. Вместе с тем, из клинической практики известно также, что занятия хатха-йогой, в частности, поза сарвангасана (антиортостатическое воздействие) способствуют адаптации сердечно-сосудистой системы к ортостатическим нагрузкам [5]. Можно поэтому полагать, что сочетание фармакологической коррекции наряду с указанными выше периодическими антиортостатическими воз-

действиями могло бы явиться одним из методов лечения синдрома постуральной ортостатической тахикардии. Однако в литературе представлены лишь фрагментарные сведения об эффектах упомянутых выше бета-блокаторов и метилдофы на систему кровообращения в условиях ортостаза [6–8], тогда как данные о влиянии этих препаратов на кровотоки в полых венах в условиях антиортостаза в литературе отсутствуют. Практически в единственной работе [9] изучали эффекты пропранолола на артериальное давление и частоту сердечных сокращений на испытуемых-добровольцах в условиях антиортостаза. Авторы показали, что величины снижения артериального давления и частоты сердечных сокращений при антиортостатическом воздействии на фоне применения пропранолола явились физиологическими для здоровых добровольцев.

Особо следует отметить, что возможности анализа изменений кровотоков в верхней и нижних полых венах у человека в ответ на постуральные воздействия являются весьма ограниченными, поскольку неинвазивные эхокардиографические методы являются малоточными [10]. Кроме того, они не позволяют оценить временную динамику изменений указанных показателей при гравитационных нагрузках. Например, в работе [11] при измерении кровотока в нижней полой вене и центрального объема крови в условиях выполнения орто- и антиортостатических проб у человека показано, что существуют две индифферентные точки для давления и объема: гидростатически индифферентная точка — на уровне диафрагмы, тогда как объемная индифферентная точка — ниже печени. Из сказанного следует, что анализ механизмов изменений венозной и системной гемодинамики в ответ на постуральные воздействия можно выполнить только при моделировании последних на животных с непрерывной регистрацией кровотоков в полых венах, сердечного выброса и артериального давления. Однако это также сопряжено с большими методическими трудностями. Даже при изучении механизмов развития постуральной тахикардии и гипотензии в исследованиях [12, 13] у кроликов измеряли только артериальное давление и частоту сердечных сокращений. Целью работы явилось изучение характера и величины изменений кровотоков в полых венах, венозного возврата и сердечного выброса у кроликов при проведении ортостатического и антиортостатического воздействий в условиях применения блокатора $\beta_{1,2}$ -адренорецепторов пропранолола, β_1 -блокатора биспролола и центрального агониста тормозных пресинаптических α_2 -адренорецепторов метилдофы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 17 кроликах *Chinchilla* массой 3.5–4.5 кг (питомник “Рапполо-

во”, Ленинградская область) под наркозом (уретан + хлоралоза (Sigma Chemical Co., США) 500 и 50 мг/кг соответственно, внутривенно). Вначале животных переводили на искусственную вентиляцию легких (частота дыхания 30–40 циклов/мин, дыхательный объем 15–20 см³/кг) с помощью аппарата “Фаза-9” (Россия), затем вскрывали грудную клетку. Газовый состав артериальной крови контролировали газоанализатором ABL-50 (Radiometer, Дания). Напряжение кислорода и углекислого газа в артериальной крови (в левой сонной артерии) составляли соответственно 94 ± 4 мм рт.ст. и 37 ± 2 мм рт.ст., а pH — 7.36 ± 0.02 и оставались практически неизменными в течение опыта.

Кровотоки в правой краниальной и каудальной полых венах измеряли манжеточными датчиками двухканального ультразвукового расходомера T-206 (Transonic, США). Сердечный выброс (в восходящей аорте) определяли манжеточным датчиком электромагнитного расходомера MFV-2100 (Nihon Kohden, Япония). Артериальное давление у кроликов измеряли в левой сонной артерии тензодатчиком TSD104A (BIOPAC Systems, Inc., США). Частоту сердечных сокращений определяли при помощи программы AcqKnowledge (версия 4.0.0, BIOPAC Systems, Inc., США) по сигналу артериального давления. Венозный возврат крови к сердцу рассчитывали по сумме кровотоков в краниальной и каудальной полых венах, общее периферическое сопротивление сосудов — по упрощенной формуле Пуазейля — делением величины среднего артериального давления на величину сердечного выброса. Реактивность сердечно-сосудистой системы у животных проверялась по наличию прессорного синотрофического рефлекса (пережатие правой сонной артерии на 10–15 с). Во всех опытах указанное воздействие приводило у кроликов к повышению артериального давления на 15–20 мм рт.ст.

Для изучения сдвигов показателей системной гемодинамики при ортостатическом и антиортостатическом воздействиях был сконструирован поворотный стол длиной 800 мм, шириной 320 мм из фанеры толщиной 15 мм, на котором фиксировалось животное в положении на спине. Головной конец стола прикреплялся с помощью разъемных петель к неподвижному основанию, а ножной — перемещался. Постуральные воздействия у кроликов осуществляли следующим образом: вначале из горизонтального положения ножной конец стола плавно наклоняли вниз на угол 25° в течение 5 с (ортостатическое воздействие). Затем, через 20 с столик возвращали в горизонтальное положение. Далее через 20 с ножной конец стола поднимали вверх в течение 5 с на угол –25° и удерживали в этом положении в течение 20 с (антиортостатическое воздействие), после чего животное перемещали в горизонтальное положение. Указанные по-

стуральные пробы выполняли 3 раза с интервалом 5–10 мин после стабилизации исследуемых гемодинамических параметров. Таким образом, в каждом опыте величины изменений гемодинамических показателей при постуральных воздействиях оценивали трижды. Угол наклона стола был выбран таким образом, чтобы с одной стороны — имели место сдвиги венозного кровотока, а с другой — исключалось смещение датчиков. Скорость поворота стола подобрана, исходя из инерционности изменений кровотоков в полых венах, а также данных литературы [14].

Дизайн эксперимента был следующим: после установки датчиков и стабилизации исследуемых гемодинамических показателей осуществляли постуральные воздействия. Далее в левую яремную вену болюсно, в течение 5–10 с, вводили препараты, растворенные в 3 мл физиологического раствора. Через 10 мин после их применения снова выполняли ортостатическое и антиортостатическое воздействия также 3 раза с измерением величин гемодинамических показателей. Проведено 3 серии экспериментов. В первой из них (6 кроликов) ортостаз и антиортостаз осуществляли на фоне предварительного введения пропранолола (1.5 мг/кг) [15], во второй — (6 кроликов) — на фоне применения биспролола (1 мг/кг) [16], в третьей (5 кроликов) — после применения метилдофы (50 мг/кг) [17]. Биспролол предварительно растворяли в физиологическом растворе, а метилдофу — в физиологическом растворе с рН 4–5, слегка подкисленном 0.05 н соляной кислотой [18]. Кислотность раствора определяли с помощью портативного рН-метра Piccolo Plus (Hanna Instruments, Португалия). Растворы указанных препаратов, а также пропранолола доводили до необходимой концентрации путем добавления физиологического раствора. Производители препаратов: пропранолол — ALPHARMA-ISIS, GmbH & Co.KG, ФРГ; биспролол — ООО “Нанолек”, Россия; метилдофа — EGIS Pharmaceuticals PLC, Венгрия, соляная кислота — АО “Уралхиминвест”, Россия.

Электрические сигналы измеряемых показателей системной гемодинамики записывали на жесткий диск компьютера IBM PC после аналого-цифрового преобразования платой L-783 (L-Card, Россия) с последующим определением расчетных параметров и анализом по программе ACTest (версия 1.6.59, ООО “Лаборатория автоматизированных систем”, Россия). Изменения исследуемых показателей гемодинамики сравнивали на 4 и 20 с ортостатического и антиортостатического воздействий. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программы S-Plus 2000 (Professional release, версия 1.0, Math Soft Inc., США). Проверку опытных данных на нормальное распределение проводили с использованием кри-

терия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение было нормальным ($p = 0.135$), то различия исходных величин параметров венозной и системной гемодинамики проверяли с использованием парного t -критерия Стьюдента [19, 20]. Гипотезу отличий сдвигов исследуемых показателей от нуля проверяли с использованием t критерия Стьюдента [19, 20]. За нулевой уровень принимали исходные значения показателей или фон после применения бета-блокаторов и метилдофы. Вместе с тем, учитывая малые размеры выборки, для дополнительной проверки правомерности применения t критерия нами также был проведен анализ различий величин исследуемых гемодинамических показателей с использованием непараметрического критерия Уилкоксона [19]. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходные значения исследуемых гемодинамических параметров в горизонтальном положении животных в проведенных сериях экспериментов представлены в таблице 1.

Из данных табл. 1 следует, что между исходными величинами исследуемых показателей системной гемодинамики у животных в 3 сериях опытов практически не было статистически достоверных различий. Так, например, для величин артериального давления у животных I и II серий, соответственно 98 ± 4 мм рт.ст. и 102 ± 5 мм рт.ст., t -критерий составил -1.21 , $p = 0.25$, при анализе различий с помощью непараметрического критерия Уилкоксона $p = 0.12$.

В таблице 2 представлены данные о характере изменений гемодинамических параметров относительно исходного уровня у кроликов, находящихся в горизонтальном положении, после внутривенного введения бета-блокаторов и метилдофы.

Из данных этой таблицы следует, что при внутривенном введении пропранолола и биспролола снижение артериального давления и частоты сердечных сокращений было примерно одинаковым. Однако на фоне применения блокатора $\beta_{1,2}$ -адренорецепторов пропранолола кровотоки в каудальной полой вене снижались больше, чем в краниальной. В ответ на внутривенное применение β_1 -блокатора биспролола и метилдофы кровотоки в каудальной полой вене снижались в меньшей степени, чем в краниальной (табл. 2). Это могло быть обусловлено сохраняющимися в первом случае констрикторными реакциями сосудов региона каудальной полой вены при активации симпатическими нервами α_1 -адренорецепторов.

Доказательством этого предположения явились опыты с применением метилдофы, в которых депрессорные сдвиги артериального давления были обусловлены снижением общего периферического сопротивления сосудов, а также сердечного выброса

в результате уменьшения венозного возврата и некоторого снижения (на $-6 \pm 2\%$, $p > 0.05$) частоты сердечных сокращений (табл. 2).

Следует отметить, что в проведенных опытах при постуральных воздействиях у кроликов в I–III сериях до применения указанных выше препаратов, сдвиги исследуемых гемодинамических показателей были примерно одинаковыми. Так, на 4 с ортостаза артериальное давление у животных I серии опытов снижалось на $-32 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) относительно исходного уровня, т. е. с 98 ± 4 мм рт.ст. до 67 ± 7 мм рт.ст. Важно отметить, что при анализе разностей этих величин с помощью t -критерия, $p = 0.002$, а с помощью непараметрического критерия Уилкоксона $p = 0.0187$, что свидетельствует о правомерности применения t -критерия Стьюдента, который и был использован нами в дальнейшем.

У кроликов II и III серий экспериментов на 4 с ортостатического воздействия артериальное давление уменьшалось соответственно на $-31 \pm 4\%$ ($p < 0.01$) и $-30 \pm 2\%$ ($p < 0.01$) относительно уровня при горизонтальном положении животных. Поэтому далее в тексте и в табл. 3–5 приведены данные изменений параметров венозной и системной гемодинамики, относительно значений при горизонтальном положении животных, указанных в табл. 1, только для кроликов I серии опытов.

Из данных табл. 3 следует, что до применения бета-блокаторов и метилдофы у кроликов при ортостатическом воздействии на 4 с кровотоки в каудальной и краниальной полых венах уменьшались соответственно на $-39 \pm 8\%$ ($p < 0.05$) и $-15 \pm 6\%$ ($p < 0.05$). Однако к 20 с ортостаза кровоток в каудальной вене был снижен на $-20 \pm 4\%$ ($p < 0.05$),

Таблица 1. Исходные значения венозной и системной гемодинамики у кроликов в горизонтальном положении

Показатель, размерность	Исходные значения показателей		
	I серия $n = 6$	II серия $n = 6$	III серия $n = 5$
Кровоток в краниальной вене, мл/мин	19 ± 3	23 ± 5	22 ± 8
Кровоток в каудальной вене, мл/мин	143 ± 10	162 ± 18	165 ± 21
Венозный возврат, мл/мин	162 ± 13	185 ± 11	187 ± 10
Сердечный выброс, мл/мин	167 ± 23	192 ± 18	190 ± 16
Среднее артериальное давление, мм рт.ст.	98 ± 4	102 ± 5	92 ± 3
Частота сердечных сокращений, уд/мин	258 ± 7	255 ± 8	235 ± 7
Общее периферическое сопротивление сосудов, $\text{дин} \times \text{с} \times \text{см}^{-5}$	782 ± 38	708 ± 35	645 ± 24

Значения показателей представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая значений показателей, m — стандартная ошибка среднего значения, n — количество животных.

Таблица 2. Направленность и величина изменений венозной и системной гемодинамики у кроликов в горизонтальном положении в ответ на применение пропранолола, бисопролола и метилдофы

Показатель	Изменение показателей в процентах относительно исходного уровня после применения:		
	пропранолола I серия $n = 6$	бисопролола II серия $n = 6$	метилдофы III серия $n = 5$
Кровоток в краниальной вене	-5 ± 3	$-9 \pm 2^*$	$-13 \pm 4^*$
Кровоток в каудальной вене	$-15 \pm 4^*$	-3 ± 1	-5 ± 2
Венозный возврат	$-14 \pm 3^*$	-4 ± 1	$-7 \pm 2^*$
Сердечный выброс	$-8 \pm 2^*$	-4 ± 2	$-14 \pm 6^*$
Среднее артериальное давление	$-9 \pm 3^*$	$-8 \pm 2^*$	$-24 \pm 6^*$
Частота сердечных сокращений	$-22 \pm 6^*$	$-17 \pm 3^*$	-6 ± 2
Общее периферическое сопротивление сосудов	-1 ± 4	-3 ± 2	$-12 \pm 4^*$

Изменения показателей в процентах представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая значений показателей, m — стандартная ошибка среднего значения. Цифры со знаком (–) — снижение показателя; * — $p < 0.05$. Отсутствие звездочки — недостоверные изменения показателя, n — количество животных.

т. е. он возрос по сравнению с величиной на 4 с, а кровоток в краниальной полой вене снижался на $-32 \pm 7\%$ ($p < 0.05$), т. е. уменьшился по сравнению с его величиной на 4 с (табл. 3). Можно поэтому полагать, что при ортостатическом воздействии проявляются механизмы перераспределений кровотоков в бассейнах указанных вен.

В опытах также было отмечено, что на 4 с ортостаза артериальное давление снижалось на $-32 \pm 3\%$ ($p < 0.01$), однако к 20 с ортостаза его депрессорные сдвиги составляли $-18 \pm 5\%$, т. е. оно возросло по сравнению с его значением на 4 с. Аналогичная закономерность отмечена и для величин венозного возврата, сердечного выброса и расчетного показателя общего периферического сопротивления сосудов (табл. 3). Это свидетельствует о проявлении компенсаторных реакций системы кровообращения. Частота сердечных сокращений на 4 с возрастала на $10 \pm 2\%$ ($p < 0.05$) относительно значений при горизонтальном положении животных, а к 20 с ее прирост составил $5 \pm 1\%$ ($p < 0.05$), т. е. она несколько уменьшилась.

В ответ на антиортостатическое воздействие на 4 с сдвиги артериального давления, сердечного выброса и общего периферического сопротивления сосудов были недостоверными (табл. 3). Однако кровоток в каудальной полой вене возрастал на $26 \pm 5\%$ ($p < 0.05$), тогда как кровоток в краниальной вене уменьшался на $-20 \pm 7\%$ ($p < 0.05$), что можно объяснить взаимодействием встречных потоков. При этом венозный возврат увеличивался на $20 \pm 3\%$ ($p < 0.05$), а частота сердечных сокращений снижалась на $-9 \pm 3\%$ ($p < 0.05$) относительно значений при горизонтальном положении животных. К 20 с антиортостатического воздействия артериальное давление возрастало на $22 \pm 7\%$ ($p < 0.05$), общее периферическое сопротивление сосудов — на

$13 \pm 4\%$ ($p < 0.05$), а сердечный выброс — не изменялся. Вместе с тем, кровоток в каудальной полой вене снизился практически до исходных значений (сдвиги на $2 \pm 4\%$ были не достоверными ($p > 0.05$), тогда как кровоток в краниальной полой вене, напротив, возрастал на $16 \pm 5\%$ ($p < 0.05$). Следовательно, как и в условиях ортостаза, при антиортостазе к 20 с имело место перераспределение кровотоков в бассейнах указанных вен. Частота сердечных сокращений в указанное время была близка к исходной, т. е. она возросла по сравнению с величиной на 4 с антиортостаза (табл.3). Таким образом, данные опытов свидетельствуют, что уже к 20 с постуральных воздействий проявляются рефлекторные реакции сердца и сосудов. Нами поэтому был проведен анализ изменений исследуемых гемодинамических параметров в ответ на ортостаз и антиортостаз после применения пропранолола, бисопролола и метилдофы в указанное время.

В табл. 4 представлены величины изменений показателей венозной и системной гемодинамики на 20 с ортостатического воздействия у кроликов до и после внутривенного введения пропранолола, бисопролола и метилдофы.

Из данных табл. 4 следует, что при ортостазе в условиях применения метилдофы артериальное давление снижалось на $-18 \pm 3\%$ ($p < 0.05$), т. е. на такую же величину, как и у кроликов в исходном состоянии (табл.4). При ортостатическом воздействии на фоне внутривенного введения пропранолола и бисопролола депрессорные сдвиги артериального давления составляли соответственно $-24 \pm 5\%$ ($p < 0.05$) и $-28 \pm 4\%$ ($p < 0.05$), т. е. были примерно одинаковыми, хотя и несколько больше, чем у кроликов в исходном состоянии. Вместе с тем, как при ортостазе исходно, так и на фоне применения метилдофы, кровоток в краниальной полой ве-

Таблица 3. Изменения показателей венозной и системной гемодинамики у кроликов I серии ($n = 6$) при орто- и антиортостатическом воздействиях до применения пропранолола, бисопролола и метилдофы

Показатель	Ортостатическое воздействие		Антиортостатическое воздействие	
	4 с	20 с	4 с	20 с
Кровоток в краниальной вене	$-15 \pm 4^*$	$-32 \pm 7^*$	$-20 \pm 6^*$	$16 \pm 5^*$
Кровоток в каудальной вене	$-39 \pm 8^*$	$-20 \pm 4^{**}$	$26 \pm 5^*$	2 ± 4
Венозный возврат	$-37 \pm 8^*$	$-22 \pm 3^{**}$	$20 \pm 3^*$	2 ± 5
Сердечный выброс	$-22 \pm 4^*$	$-13 \pm 4^*$	5 ± 2	3 ± 4
Среднее артериальное давление	$-32 \pm 3^{**}$	$-18 \pm 5^*$	4 ± 6	$22 \pm 7^*$
Частота сердечных сокращений	$10 \pm 2^*$	$5 \pm 1^*$	$-9 \pm 3^*$	1 ± 2
Общее периферическое сопротивление сосудов	$-14 \pm 5^*$	-6 ± 3	-2 ± 2	$13 \pm 4^*$

Изменения показателей представлены в процентах относительно значений при горизонтальном положении животных в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая значений показателей, m — стандартная ошибка среднего значения. Цифры со знаком (—) — снижение показателя; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$, n — количество животных.

не уменьшался в несколько большей степени, чем в каудальной, тогда как в условиях ортостатического воздействия на фоне применения пропранолола и биспролола кровотоки в краниальной и каудальной полых венах снижались примерно в равной степени (табл.4).

В опытах также был отмечен факт дисбаланса величин сердечного выброса и венозного возврата, за исключением ортостаза на фоне применения биспролола, когда дисбаланса не было. При ортостазе исходно, а также на фоне применения пропранолола сердечный выброс снижался менее выражено, чем венозный возврат, т. е. величина сердечного выброса была больше, чем венозного возврата. В случае же ортостаза в условиях действия метилдофы, напротив, сердечный выброс был меньше, чем венозный возврат (табл. 4). Полученные данные позволяют полагать о различиях сдвигов емкостной функции легочных сосудов при ортостатической пробе на фоне применения этих препаратов.

Результаты опытов, в которых проводили антиортостатическое воздействие на фоне действия бета-блокаторов и метилдофы, представлены в табл. 5.

Из данных табл. 5 следует что исходно, т. е. до применения указанных выше препаратов, на 20 с антиортостатического воздействия сдвиги венозного возврата ($2 \pm 5\%$) и кровотока в каудальной поллой вене ($2 \pm 4\%$) были статистически недостоверными ($p > 0.05$), хотя при этом кровоток в краниальной поллой вене возрастал на $16 \pm 5\%$ ($p < 0.05$). К 20 с антиортостаза прессорные сдвиги артериаль-

ного давления исходно и в условиях применения указанных препаратов, были примерно одинаковыми и составляли 22–28%. Вместе с тем, обратил на себя внимание факт увеличения кровотока в каудальной вене на 11–13% (за исключением применения метилдофы), чего не было отмечено на 20 с антиортостаза исходно, т.е. до применения этих препаратов (табл.5). Особо следует отметить, что на фоне применения биспролола и метилдофы при антиортостатическом воздействии в указанное время выражено возрастал кровоток в краниальной вене (соответственно на $51 \pm 11\%$ ($p < 0.05$) и $42 \pm 16\%$, $p < 0.05$), тогда как исходно в ответ на антиортостаз прирост этого показателя составлял $16 \pm 5\%$, $p < 0.05$) (табл. 5).

Важно подчеркнуть также, что до применения на бета-блокаторов и метилдофы на 20 с антиортостатического воздействия величины сердечного выброса и венозного возврата были близки к таковым при горизонтальном положении животных (их сдвиги на $3 \pm 4\%$ и $2 \pm 5\%$ были статистически недостоверными ($p > 0.05$)). При антиортостазе на фоне применения биспролола эти показатели возрастали на 13–18%, т.е. дисбаланс их величин практически отсутствовал, как и в случае ортостаза (табл. 4 и 5). Однако при антиортостазе в условиях применения пропранолола величина сердечного выброса была меньше, чем венозного возврата. На фоне же действия метилдофы при антиортостатическом воздействии сердечный выброс, напротив, возрастал в большей степени, чем венозный возврат (табл. 5). Следовательно, дисбаланс величин

Таблица 4. Характер и величина изменений показателей венозной и системной гемодинамики у кроликов при ортостатической пробе на фоне применения пропранолола, биспролола и метилдофы

Показатель	Изменение гемодинамических показателей на 20 с ортостатического воздействия относительно значений при горизонтальном положении			
	До применения препаратов	На фоне внутривенного введения		
		пропранолола I серия $n = 6$	биспролола II серия $n = 6$	метилдофы III серия $n = 5$
Кровоток в краниальной вене	$-32 \pm 7^*$	$-26 \pm 7^*$	$-42 \pm 6^{**}$	$-16 \pm 5^*$
Кровоток в каудальной вене	$-20 \pm 4^{**}$	$-36 \pm 8^*$	$-48 \pm 9^*$	$-9 \pm 2^*$
Венозный возврат	$-22 \pm 3^{**}$	$-34 \pm 6^*$	$-48 \pm 9^*$	$-10 \pm 3^*$
Сердечный выброс	$-13 \pm 4^*$	$-13 \pm 3^*$	$-46 \pm 4^{**}$	$-22 \pm 9^*$
Среднее артериальное давление	$-18 \pm 5^*$	$-24 \pm 5^*$	$-28 \pm 4^*$	$-18 \pm 3^*$
Частота сердечных сокращений	$5 \pm 1^*$	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2
Общее периферическое сопротивление сосудов	-6 ± 3	$-12 \pm 3^*$	$14 \pm 3^*$	7 ± 5

Изменения показателей представлены в процентах к исходному уровню (во 2 столбце) и к фону после применения препаратов (3–5 столбцы) в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая значений показателей, m — стандартная ошибка среднего значения. Цифры со знаком (–) — снижение показателя; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$. Отсутствие звездочки — недостоверные изменения показателя. n — количество животных.

Таблица 5. Направленность и величина изменений показателей венозной и системной гемодинамики у кроликов при антиортостатической пробе на фоне применения пропранолола, бисопролола и метилдофы

Показатель	Изменение гемодинамических показателей на 20 с антиортостатического воздействия относительно значений при горизонтальном положении			
	До применения препаратов	На фоне внутривенного введения:		
		пропранолола I серия <i>n</i> = 6	бисопролола II серия <i>n</i> = 6	метилдофы III серия <i>n</i> = 5
Кровоток в краниальной вене	16 ± 5*	5 ± 3	51 ± 11*	42 ± 16*
Кровоток в каудальной вене	2 ± 4	13 ± 4*	11 ± 3*	−3 ± 4
Венозный возврат	2 ± 5	11 ± 3*	18 ± 5*	6 ± 3
Сердечный выброс	3 ± 4	1 ± 3	13 ± 4*	32 ± 12*
Среднее артериальное давление	22 ± 7*	17 ± 4*	21 ± 3**	28 ± 3**
Частота сердечных сокращений, уд/мин	1 ± 2	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2
Общее периферическое сопротивление сосудов	13 ± 4*	17 ± 4*	7 ± 3	−9 ± 5

Обозначения те же, что в табл. 4.

указанных показателей был противоположен таковому в ответ на ортостатическое воздействие (табл. 4). Можно поэтому полагать, что и при антиортостатическом воздействии в условиях применения указанных препаратов также имели место различия в сдвигах емкостной функции сосудов малого круга кровообращения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При изучении влияния ортостатического и антиортостатического воздействий на систему кровообращения в современных физиологических и клинических исследованиях, как правило, измеряют венозный и артериальный кровоток у человека ультразвуковыми методами [21, 22]. Кроме того, применяется математическое моделирование сдвигов системной гемодинамики при постуральных нагрузках [23, 24]. Однако эти исследования не позволяют в полной мере изучать механизмы регуляции системы кровообращения в указанных условиях, и, тем более, проводить поиск новых лекарственных средств для лечения гемодинамических нарушений. При изучении постуральных воздействий на животных традиционно оценивают сдвиги артериального давления и частоты сердечных сокращений [12, 13, 25, 26], поскольку непрерывное измерение кровотоков в полых венах, а также сердечного выброса представляет сложную методическую задачу. В проведенном нами исследовании впервые проведен сравнительный анализ изменений не только артериального давления, но и кровотоков в каудальной и краниальной полых венах, венозного возврата, а также сердечного выброса у кроликов

при орто- и антиортостатическом воздействиях на фоне внутривенного введения пропранолола, бисопролола и метилдофы — препаратов, применяющихся для лечения гиперadreнергической формы синдрома постуральной тахикардии.

Как отмечено выше, исходно, т.е. до применения указанных выше препаратов, при ортостазе на 4 с артериальное давление снижалось на $-32 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) в результате уменьшения сердечного выброса и венозного возврата соответственно на $-22 \pm 4\%$ ($p < 0.05$) и $-37 \pm 8\%$ ($p < 0.05$), а также общего периферического сопротивления сосудов на $-14 \pm 5\%$ ($p < 0.05$) по сравнению с их величинами при горизонтальном положении животных. Однако к 20 с ортостаза снижение артериального давления составило $-18 \pm 5\%$ ($p < 0.05$), сердечного выброса и венозного возврата соответственно $-13 \pm 4\%$ ($p < 0.05$) и $-22 \pm 3\%$ ($p < 0.05$). Величина общего периферического сопротивления сосудов была близка к исходной (сдвиги на $-6 \pm 3\%$ были статистически недостоверными, $p > 0.05$), а частота сердечных сокращений возрастала на $10 \pm 2\%$ ($p < 0.05$). Следовательно, в указанное время величины указанных показателей были больше, чем на 4 с ортостаза, что свидетельствует о проявлении компенсаторных реакций сердечно-сосудистой системы.

Из литературы хорошо известно, что в ответ на ортостатическое воздействие при уменьшении венозного возврата, сердечного выброса и артериального давления имеет место возбуждение барорецепторов дуги аорты и каротидного синуса, что приводит к активации симпатической нервной системы. В результате повышается общее перифери-

ческое сопротивление сосудов, частота сердечных сокращений, сократимость миокарда, а также имеет место мобилизация центрального объема крови из легких, что компенсирует снижение венозного притока [27, 28]. О сдвигах емкостной функции сосудов малого круга кровообращения в указанных условиях свидетельствовало отмеченное в проведенных нами экспериментах превалирование величины сердечного выброса над венозным возвратом (соответственно $-13 \pm 4\%$, $p < 0.05$ и $-22 \pm 3\%$, $p < 0.05$), т.е. их дисбаланс. Таким образом, используемая нами модель ортостазы на кроликах была приемлемой для анализа механизмов изменений системной гемодинамики несмотря на то, что условия вскрытия грудной клетки и искусственной вентилиации легких не являются полностью физиологическими.

Моделирование антиортостатического воздействия также применяется на кроликах [29, 30]. Например, в работе [29] показано, что антиортостатическое воздействие при угле наклона стола -45° не вызывало у животных достоверных сдвигов мозгового кровотока. В исследовании [30] установлено, что в условиях антиортостазы у кроликов среднее артериальное давление и кровоток в сонной артерии достоверно не изменялись, частота сердечных сокращений уменьшалась, тогда как внутриглазное давление возрастало. В работе [31] на испытуемых людях-добровольцах также показано, что антиортостатическое воздействие сопровождается повышением внутриглазного давления.

В проведенных нами экспериментах на 4 с антиортостазы изменения артериального давления, сердечного выброса и общего периферического сопротивления сосудов были не достоверными. Однако при этом кровоток в каудальной вене возрастал на $26 \pm 5\%$ ($p < 0.05$), тогда как кровоток в краниальной вене уменьшался на $-20 \pm 7\%$ ($p < 0.05$), что можно объяснить взаимовлиянием встречных потоков. Суммарный венозный возврат крови к сердцу возрастал на $20 \pm 3\%$ ($p < 0.05$). Таким образом, в указанное время было отмечено превалирование величины венозного возврата над сердечным выбросом, т.е. дисбаланс указанных показателей, что могло свидетельствовать о депонировании крови в легких. Вместе с тем, к 20 с антиортостазы величины указанных показателей были близки к исходным при горизонтальном положении животных, тогда как артериальное давление возрастало на $22 \pm 7\%$ ($p < 0.05$), а кровоток по краниальной вене — на $16 \pm 5\%$ ($p < 0.05$). Кровоток же по каудальной вене возвращался к исходным значениям (табл. 5). Следовательно, в отличие от ортостатического воздействия, когда кровотоки в краниальной и каудальных венах одновременно уменьшались, при антиортостазе имело место изменения характера сдвигов кровотоков в краниальной и каудальной

полых венах: первоначальное возрастание кровотока в каудальной вене сменилось его возвращением к исходным значениям, а снижение кровотока в краниальной вене — возрастанием.

Из литературы известно, что антиортостаз способствует повышению артериального давления в верхней половине туловища в результате гидростатического эффекта и перемещения крови к голове при увеличении венозного притока. В результате активируются барорецепторы, что сопровождается снижением активности симпатической нервной системы [32]. Однако в исследовании [33] на человеке методами магнитно-резонансной томографии показано, что при антиортостазе (угол наклона -6° , -12° и -18°) в течение 4.5 ч кровоток во внутренней сонной артерии и отток крови по внутренним яремным и вертебральным венам уменьшались. Аналогичные результаты были получены и в работе [34]. Вместе с тем, в работе [35] методами траскраниальной доплеровской сонографии установлено, что в ответ на антиортостатическое воздействие в течение 10 мин (угол наклона стола -10° и -30°) мозговой кровоток не изменялся, что, по мнению авторов, свидетельствует о механизмах его ауторегуляции. Таким образом, неинвазивные инерционные методы исследований изменений мозгового кровотока у человека в ответ на антиортостатическое воздействие не позволяют ответить на вопрос о механизмах его регуляции при более быстрых изменениях положения тела.

Поэтому нами были проведены дополнительные опыты, в которых измеряли кровоток в правой сонной артерии. Их результаты показали, что при антиортостазе у кроликов указанный показатель возрастал практически на такую же величину, что и кровоток в краниальной поллой вене. Следовательно, возрастание кровотока в последней в условиях антиортостатического воздействия явилось следствием увеличения кровотока в сонной артерии, т.е. притока крови к головному мозгу. В работе [36] показано, что после 8-дневного антиортостатического воздействия (угол наклона стола -45°) констрикторные ответы базилярных артерий в ответ на применение норадреналина уменьшались. Можно, однако, полагать, что в проведенных нами экспериментах увеличение кровотока в правой сонной артерии и соответствующее этому возрастание кровотока в краниальной вене у кроликов на 20 с антиортостазы было обусловлено снижением активности симпатической нервной системы в ответ на активацию барорецепторов на фоне увеличения кровотока в каудальной поллой вене и повышения артериального давления.

Внутривенное введение пропранолола и бисопролола, вызывая снижение частоты сердечных сокращений, приводило к уменьшению сердечного выброса и артериального давления, тогда как об-

щее периферическое сопротивление сосудов не изменялось. В случае же применения метилдофы, как отмечено выше, снижение артериального давления было обусловлено уменьшением общего периферического сопротивления сосудов, а также сердечного выброса, в результате уменьшения венозного возврата и некоторого снижения (на $-6 \pm 2 \%$, $p > 0.05$) частоты сердечных сокращений (табл. 2). Полученные результаты согласуются с данными литературы [37–39].

Результаты проведенных опытов показали, что на фоне применения метилдофы при ортостазе артериальное давление уменьшалось на такую же величину, как и в исходном состоянии животных. При этом кровотоки в краниальной и каудальной венах, а также суммарный венозный возврат снижались в меньшей степени, чем исходно (табл. 4). В физиологической литературе имеются сведения, что ортостатическое воздействие у крыс (угол наклона 90°) в условиях действия метилдофы не вызывало изменений реакций сердца и сосудов по сравнению с исходными, т.е. до применения указанного препарата [40]. Однако, в обзорной клинической работе [41] представлены данные, что применение метилдофы у человека может вызывать ортостатическую гипотензию. Вместе с тем, нельзя исключить, что отмеченные в наших опытах эффекты метилдофы (меньшее снижение венозного кровотока и венозного возврата) могут быть обусловлены не только ее центральным действием на тормозные пресинаптические α_2 -рецепторы симпатических нейронов, но также и на постсинаптические α_2 -рецепторы гладкомышечных клеток сосудов, активация которых вызывает вазоконстрикцию [42]. Однако для проверки этого предположения необходимо проведение дополнительных исследований.

В ответ на ортостатическое воздействие у кроликов имело место различие характера дисбаланса величин сердечного выброса и венозного возврата (табл. 4). При ортостазе исходно, а также на фоне применения пропранолола сердечный выброс снижался в меньшей степени, чем венозный возврат, что могло свидетельствовать о мобилизации центрального резерва крови из легких в ответ на активацию симпатической нервной системы [27, 28]. В случае же ортостатического воздействия в условиях действия метилдофы, напротив, сердечный выброс уменьшался более выраженно, чем венозный возврат, что могло быть результатом депонирования крови в легких на фоне снижения активности симпатической нервной системы.

На 20 с антиортостатического воздействия в условиях внутривенного введения пропранолола и бисопролола у животных отмечено увеличение кровотока в каудальной вене, чего не было при антиортостазе исходно, т.е. до применения указанных препаратов (табл. 5). Это могло быть обуслов-

лено ослаблением констрикторных симпатических влияний на артериальные сосуды региона указанной вены. В физиологической литературе имеются сведения, что блокада β_1 -рецепторов уменьшает высвобождение норадреналина из симпатических нервных окончаний [43]. Вместе с тем в ответ на антиортостаз в условиях действия бисопролола и метилдофы более выраженно возрастал кровоток в краниальной полой вене по сравнению с его приростом у кроликов исходно, т.е. до применения этих препаратов (табл. 5). Как отмечено выше, исходно при антиортостазе увеличение кровотока в краниальной полой вене было следствием возрастания кровотока в правой сонной артерии в результате снижения активности симпатической нервной системы в ответ на активацию барорецепторов на фоне увеличения кровотока в каудальной полой вене и повышения артериального давления. Можно поэтому полагать, что выраженное увеличение кровотока в краниальной полой вене при антиортостазе на фоне применения бисопролола и метилдофы явилось результатом значительного ослабления симпатических констрикторных влияний на артериальные сосуды головного мозга.

В опытах было также отмечено, что при антиортостазе в условиях применения пропранолола величина сердечного выброса была меньше, чем венозного возврата (табл. 5), что могло свидетельствовать о депонировании крови в легких на фоне снижения констрикторных влияний симпатических нервов. При антиортостатическом воздействии на фоне действия метилдофы сердечный выброс, напротив, возрастал в большей степени, чем венозный возврат (табл. 5), что, по-видимому, явилось результатом мобилизации центрального резерва крови из легких. Как отмечено выше, метилдофа могла активировать постсинаптические α_2 -рецепторы гладкомышечных клеток легочных сосудов, вызывая вазоконстрикцию. Следовательно, дисбаланс величин указанных показателей был противоположен таковому в ответ на ортостатическое воздействие (табл. 4). Можно поэтому полагать, что при постуральных нагрузках в условиях применения указанных препаратов имели место различия в сдвигах емкостной функции сосудов малого круга кровообращения.

Вместе с тем, рассматривая механизмы изменений легочного кровотока в указанных условиях нельзя также исключить сдвигов фильтрационно-абсорбционного равновесия, капиллярного гидростатического давления и коэффициента капиллярной фильтрации. Однако сведения об их изменениях при постуральных нагрузках в литературе практически отсутствуют. Лишь в работе [44] при измерении легочного кровотока в условиях антиортостаза у человека (наклон стола -30°) авторы предположили, что гетерогенность указанного по-

казателя может быть результатом увеличения капиллярного гидростатического давления.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что у кроликов на 20 с ортостатического воздействия артериальное давление, сердечный выброс и венозный возврат снижались, тогда как при антиортостазе на 20 с артериальное давление повышалось, а величины сердечного выброса и венозного возврата были близки к исходным. Вместе с тем, при орто- и антиортостатических воздействиях отмечены разнонаправленные сдвиги кровотоков в краниальной и каудальных полых венах. При ортостазе эти показатели уменьшались, а при антиортостазе первоначальное (на 4 с) возрастание кровотока в каудальной вене сменилось его возвращением к исходной величине, а снижение кровотока в краниальной вене — возрастанием.

Снижение артериального давления в ответ на применение пропранолола и бисопролола, было обусловлено уменьшением сердечного выброса на фоне отрицательных хронотропных эффектов сердца. В случае внутривенного введения метилдофы депрессорные сдвиги артериального давления явились следствием уменьшения общего периферического сопротивления сосудов, а также сердечного выброса, в результате снижения венозного возврата. Однако на фоне применения блокатора $\beta_{1,2}$ -адренорецепторов пропранолола кровотоки в каудальной полых вене снижались больше, чем в краниальной. В ответ на внутривенное применение β_1 -блокатора бисопролола и метилдофы кровотоки в каудальной полых вене снижались в меньшей степени, чем в краниальной.

Уменьшение артериального давления при ортостазе исходно, а также после внутривенного введения пропранолола, бисопролола и метилдофы было примерно одинаковым. Вместе с тем, при ортостазе исходно и на фоне применения метилдофы кровотоки в краниальной полых вене снижались более выражено, чем в каудальной, тогда как в условиях ортостатического воздействия на фоне применения пропранолола и бисопролола кровотоки в краниальной и каудальной полых венах уменьшались примерно в равной степени. При антиортостазе исходно и на фоне внутривенного введения указанных выше препаратов прессиорные сдвиги артериального давления были примерно одинаковыми. Однако после применения пропранолола и бисопролола на 20 с антиортостаза у кроликов кровотоки в каудальной полых вене увеличивались, тогда как исходно при антиортостазе сдвиги этого показателя были недостаточными. Кровотоки в краниальной полых вене в ответ на антиортостатическое воздействие на фоне применения бисопролола и метилдофы возрастал более выражено по сравнению с его приростом у кроликов исходно. Следовательно, при постуральных нагрузках в условиях применения пропрано-

лола, бисопролола и метилдофы имеют место различия механизмов перераспределения кровотоков в бассейнах краниальной и каудальной полых вен.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.И.Е., Т.В.С., М.В.К.), проведение экспериментов (В.И.Е., И.З.П., Т.П.Б.), статистическая обработка данных (В.И.Е., И.З.П., Т.В.С., М.В.К.), написание и редактирование рукописи (В.И.Е., И.З.П., М.В.К.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы FGWG-2022-0006 гос. задания Минобрнауки Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации при одобрении биоэтического комитета Института экспериментальной медицины (Протокол № 3/19 от 25.04.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olshansky B, Cannom D, Fedorowski A, Stewart J, Gibbons C, Sutton R, Shen WK, Muldowney J, Chung TH, Feigofsky S, Nayak H, Calkins H, Benditt DG (2020) Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome (POTS): A critical assessment. *Prog Cardiovasc Dis* 63(3):263–270. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2020.03.010>
2. Ormiston CK, Świątkiewicz I, Taub PR (2022) Postural orthostatic tachycardia syndrome as a sequela of COVID-19. *Heart Rhythm* 19(11):1880–1889. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2022.07.014>
3. Trisvetova EL (2022) Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome as a Manifestation of Post-COVID-19 Syndrome. *Rat Pharmacother Cardiol* 18(2):200–208. <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2022-04-11>
4. Mar PL, Raj SR (2020) Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome: Mechanisms and New Therapies. *Annu Rev Med* 71:235–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041818-011630>
5. Anasuya B, Deepak KK, Jaryal AK (2020) Autonomic Tone and Baroreflex Sensitivity during 70° Head-up Tilt in Yoga Practitioners. *Int J Yoga* 13(3):200–206. https://doi.org/10.4103/ijoy.IJOY_29_20
6. Wyller VB, Thaulow E, Amlie JP (2007) Treatment of chronic fatigue and orthostatic intolerance with propranolol. *J Pediatr* 150(6):654–655. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2007.03.012>
7. Ylitalo R, Kähönen M, Nieminen T, Kööbi T, Ylitalo P, Turjanmaa V (2005) Effects of a mononitrate, a beta1-blocker and a dihydropyridine calcium channel blocker on cardiovascular responsiveness to passive orthostasis: a placebo-controlled double-blind study in normotensive volunteers. *Arzneimittelforschung* 55(3):160–166. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296838>

8. *Heffernan A, Carty A, O'Malley K, Bugler J* (1971) A within-patient comparison of debrisoquine and methyl dopa in hypertension. *Br Med J* 1(5740):75–78.
<https://doi.org/10.1136/bmj.1.5740.75>
9. *Bogomolov VV, Kondratenko SN, Kovachevich IV, Repenkova LG* (2106) Propranolol pharmacokinetics and hemodynamic indices in antiorthostatic hypokinesia. *Aviakosm Ekolog Med.* 50(5):5–10.
<https://doi.org/10.21687/0233-528x-2016-50-5-5-10>
10. *McGovern M, Miletin J* (2017) A review of superior vena cava flow measurement in the neonate by functional echocardiography. *Acta Paediatr.* 106(1):22–29.
<https://doi.org/10.1111/apa.13584>
11. *Petersen LG, Carlsen JF, Nielsen MB, Damgaard M, Secher NH* (2014) The hydrostatic pressure indifference point underestimates orthostatic redistribution of blood in humans. *J Appl Physiol* (1985) 116(7):730–735.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01175.2013>
12. *Li H, Zhang G, Zhou L, Nuss Z, Beel M, Hines B, Murphy T, Liles J, Zhang L, Kem DC, Yu X* (2019) Adrenergic Autoantibody-Induced Postural Tachycardia Syndrome in Rabbits. *J Am Heart Assoc* 8(19):e013006.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013006>
13. *Kamiya A, Kawada T, Yamamoto K, Michikami D, Ariumi H, Uemura K, Zheng C, Shimizu S, Aiba T, Miyamoto T, Sugimachi M, Sunagawa K* (2005) Resetting of the arterial baroreflex increases orthostatic sympathetic activation and prevents postural hypotension in rabbits. *J Physiol.* 566(Pt 1):237–246.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086512>
14. *Matsuo N, Matsuo S, Nakamura Y, Ezomo FO, Kawai Y* (2020) Regulatory effects of cervical sympathetic trunk and renal sympathetic nerve activities on cerebral blood flow during head-down postural rotations. *Auton Neurosci* 229:102738.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020>
15. *Cheung SYA, Rodgers T, Aarons L, Gueorguieva I, Dickinson GL, Murby S, Brown C, Collins B, Rowland M* (2018) Whole body physiologically based modelling of β -blockers in the rat: events in tissues and plasma following an i.v. bolus dose. *Br J Pharmacol* 175(1):67–83.
<https://doi.org/10.1111/bph.14071>
16. *Beddies G, Fox PR, Papich MD, Kanikanti VR, Krebber R, Keene BW* (2008) Comparison of the pharmacokinetic properties of bisoprolol and carvedilol in healthy dogs. *Am J Vet Res* 69(12):1659–1663.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.69.12.1659>
17. *Buccafusco JJ* (1984) Effect of methyl dopa on brain cholinergic neurons involved in cardiovascular regulation. A study in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 6(5):614–621.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.6.5.614>
18. *Blower PR, Poyser RH, Robertson MI* (1976) Effects of alpha-methyl dopa on blood pressure in the anaesthetized dog. *J Pharm Pharmacol* 28(5):437–440.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1976.tb04650.x>
19. *Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G* (2019) Application of student's t-test, analysis of variance, and co-variance. *Ann Card Anaesth* 22(4):407–411.
https://doi.org/doi: 10.4103/aca.ACA_94_19
20. *Moyé L* (2016) Statistical Methods for Cardiovascular Researchers. *Circ Res* 118 (3):439–453.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306305>
21. *Whittle RS, Diaz-Artiles A* (2023) Gravitational effects on carotid and jugular characteristics in graded head-up and head-down tilt. *J Appl Physiol* (1985) 134(2):217–229.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00248.2022>
22. *Burma JS, Seok J, Johnston NE, Smirl JD* (2023) Cerebral blood velocity during concurrent supine cycling, lower body negative pressure, and head-up tilt challenges: implications for concussion rehabilitation. *Physiol Meas* 44(8).
<https://doi.org/10.1088/1361-6579/acecd4>
23. *Mohammadyari P, Gadda G, Taibi A* (2021) Modelling physiology of haemodynamic adaptation in short-term microgravity exposure and orthostatic stress on Earth. *Sci Rep* 11(1):4672.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84197-7>
24. *Williams ND, Brady R, Gilmore S, Gremaud P, Tran HT, Ottesen JT, Mehlsen J, Olufsen MS* (2019) Cardiovascular dynamics during head-up tilt assessed via pulsatile and non-pulsatile models. *J Math Biol* 79(3):987–1014.
<https://doi.org/10.1007/s00285-019-01386-9>
25. *Guo Y, Li H, Deng J, Zhang G, Fischer H, Stavrakis S, Yu X* (2022) Low-level tragus stimulation improves autoantibody-induced hyperadrenergic postural tachycardia syndrome in rabbits. *Heart Rhythm* 4(2):127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.hrroo.2022.12.001>
26. *Kamiya A, Kawada T, Mizuno M, Shimizu S, Sugimachi M* (2010) Parallel resetting of arterial baroreflex control of renal and cardiac sympathetic nerve activities during upright tilt in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(6):H1966–H1975.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00340.2009>
27. *Ricci F, De Caterina R, Fedorowski A* (2015) Orthostatic Hypotension: Epidemiology, Prognosis, and Treatment. *J Am Coll Cardiol* 66(7):848–860.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.06.1084>
28. *Arnold AC, Ng J, Raj SR* (2018) Postural tachycardia syndrome - Diagnosis, physiology, and prognosis. *Auton Neurosci* 215:3–11.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2018.02.005>
29. *Asai Y, Inoue S, Tatebayashi K, Shiraishi Y, Kawai Y* (2002) Effects of head-down tilt on cerebral blood flow and somatosensory-evoked potentials in rabbits. *Jpn J Physiol* 52(1):105–110.
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.52.105>
30. *Lavery WJ, Kiel JW* (2013) Effects of head down tilt on episcleral venous pressure in a rabbit model. *Exp Eye Res* 111:88–94.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.03.020>
31. *Friberg TR, Sanborn G, Weinreb RN* (1987) Intraocular and episcleral venous pressure increase during inverted posture. *Am J Ophthalmol* 103(4):523–526.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(14\)74275-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(14)74275-8)
32. *Nakamura Y, Matsuo S, Hosogai M, Kawai Y* (2009) Vestibular control of arterial blood pressure during head-down postural change in anesthetized rabbits. *Exp Brain Res* 194(4):563–570.
<https://doi.org/10.1007/s00221-009-1732-6>
33. *Marshall-Goebel K, Ambarki K, Eklund A, Malm J, Mulder E, Gerlach D, Bershad E, Rittweger J* (2016) Effects of short-

- term exposure to head-down tilt on cerebral hemodynamics: a prospective evaluation of a spaceflight analog using phase-contrast MRI. *J Appl Physiol* (1985) 120(12):1466–1473.
https://doi.org/doi: 10.1152/japplphysiol.00841.2015
34. *Ishida S, Miyati T, Ohno N, Hiratsuka S, Alperin N, Mase M, Gabata T* (2018) MRI-based assessment of acute effect of head-down tilt position on intracranial hemodynamics and hydrodynamics. *J Magn Reson Imaging* 47(2):565–571.
https://doi.org/10.1002/jmri.25781
 35. *Kato T, Kurazumi T, Konishi T, Takko C, Ogawa Y, Iwasaki KI* (2022) Effects of -10° and -30° head-down tilt on cerebral blood velocity, dynamic cerebral autoregulation, and noninvasively estimated intracranial pressure. *J Appl Physiol* (1985) 132(4):938–946.
https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00283.2021
 36. *Ueda K, Aoyama Y, Sasaka-Kitamura F, Kawai Y* (2001) Contractile responses of the basilar artery isolated from rabbits exposed to 8-day head-down tilt. *Jpn J Physiol* 51(2):209–215.
https://doi.org/10.2170/jjphysiol.51.209
 37. *Saxena PR, van Boom M, van Doorn K, Cairo-Rawlins WI* (1980) Electromagnetic flow-probe implantation for cardiac output measurements in rabbits. *J Pharmacol Methods* 3(2):125–134.
https://doi.org/10.1016/0160-5402(80)90023-6
 38. *Li X, Wang T, Han K, Zhuo X, Lu Q, Ma A* (2011) Bisoprolol reverses down-regulation of potassium channel proteins in ventricular tissues of rabbits with heart failure. *J Biomed Res* 25(4):274–279.
https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60037-7
 39. *van den Buuse M, Head GA, Korner PI* (1991) Contribution of forebrain noradrenaline innervation to the central circulatory effects of alpha-methyldopa and 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 541(2):300–308.
https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91031-u
 40. *Baum T, Sabin C, Moran RM* (1981) Comparison of hypotensive, orthostatic and sympathetic inhibitory actions of antihypertensive drugs in rats. *Clin Exp Hypertens* 3(2):219–243
https://doi.org/10.3109/10641968109033662
 41. *Engelman K* (1988) Side effects of sympatholytic antihypertensive drugs. *Hypertension* 11(3 Pt 2):II30–II33.
https://doi.org/10.1161/01.hyp.11.3_pt_2.ii30
 42. *Kanagy NL* (2005) Alpha(2)-adrenergic receptor signalling in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 109(5):431–437.
https://doi.org/10.1042/CS20050101
 43. *Berg T* (2014) β_1 -Blockers Lower Norepinephrine Release by Inhibiting Presynaptic, Facilitating β_1 -Adrenoceptors in Normotensive and Hypertensive Rats. *Front Neurol* 5:51.
https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00051
 44. *Henderson AC, Levin DL, Hopkins SR, Olfert IM, Buxton RB, Prisk GK* (2006) Steep head-down tilt has persisting effects on the distribution of pulmonary blood flow. *J Appl Physiol* (1985) 101(2):583–589.
https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00087.2006

BLOOD FLOW CHANGES IN THE RABBIT CRANIAL AND CAUDAL VENAE CAVAE DURING POSTURAL LOADS AFTER PROPRANOLOL, BISOPROLOL AND METHYLDOPA PRETREATMENT

V. I. Evlakhov^{a, b, #}, T. P. Berezina^a, T. V. Sergeev^a, M. V. Kuropatenko^a and I. Z. Poyassov^a

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

^b*1-st St-Petersburg IP Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia*

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

To treat the hyperadrenergic form of postural orthostatic tachycardia syndrome, the $\beta_{1,2}$ -adrenergic receptor blocker propranolol, the β_1 -blocker bisoprolol and the central agonist of inhibitory presynaptic α_2 -adrenergic receptors, methyldopa, are used in clinical practice. There is no data in the literature concerning the effects of these drugs on venae cavae flows during postural tests. In acute experiments on anesthetized rabbits, we studied changes of cranial and caudal venae cavae flows during orthostatic (head up tilt by 25°) and antiorthostatic (head down tilt by -25°) tests for 20 s after preliminary pretreatment with propranolol, bisoprolol and methyldopa. Before administration of these drugs, in response to orthostasis at 4 and 20 s, a decrease of the cranial and caudal venae cavae flows was noted. During antiorthostasis, caudal venae cavae flow increased for 4 s, and by 20 s it decreased to the initial value; cranial venae cavae flow decreased by 4 s, and by 20 s it was greater than the initial one. After propranolol pretreatment, caudal venae cavae flow decreased to a greater extent compared with intravenous administration of bisoprolol and methyldopa. After methyldopa administration during orthostasis, by 20 s, the cranial venae cavae flow decreased more pronouncedly than in the caudal venae, while after propranolol and bisoprolol pretreatment under conditions of orthostasis, both cranial and caudal venae cavae flows decreased approximately to the same extent. During antiorthostasis by 20 s after pretreatment with propranolol caudal venae cavae flow increased more than cranial venae cavae flow. In case of pretreatment with bisoprolol and methyldopa, in response to antiorthostasis, cranial venae cavae flow increased not only to a greater extent than caudal venae cavae flow, but also more pronouncedly compared with its increase in rabbits initially. Thus, we concluded, that in case of postural loads after pretreatment with indicated above drugs, there are differences in the mechanisms of blood flows redistribution in the basins of the cranial and caudal venae cavae.

Keywords: cranial venae cavae flow, caudal venae cavae flow, orthostatic tilt, antiorthostatic tilt, propranolol, bisoprolol, methyldopa

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИНАМИКА И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПЕРЕСТРОЙКА В КСЕНОТРАНСПЛАНТАТЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПРОДУЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Д. Н. Воронков^{1,*}, А. В. Егорова^{1,2}, Е. Н. Федорова^{1,2}, А. В. Ставровская¹, О. С. Лебедева³, А. С. Ольшанский¹, В. В. Подопригора², В. С. Сухоруков^{1,2}

¹ФГБНУ НЦ неврологии, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

*e-mail: voronkov@neurology.ru

Поступила в редакцию 04.04.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Известно, что регуляция митохондриальных функций влияет на дифференцировку и созревание нейронов. Изучение этих процессов имеет как фундаментальное, так и практическое значение для регенеративной нейробиологии. Цель исследования: охарактеризовать изменения деления митохондрий и их связь с активацией окислительного фосфорилирования (метаболического переключения) при созревании иПСК-продуцированных нейрональных предшественников при введении в стриатум крыс. Крысам Вистар ($n = 15$) в хвостатое ядро односторонне вводили нейрональные предшественники, полученные из иПСК человека. С помощью иммуноокрашивания оценивали изменения локализации и экспрессии маркеров дифференцировки нейронов: нестина, NeuN, нейрональной енолазы, а также белка наружной мембраны митохондрий, АТФ-синтазы и белка деления митохондрий Dgr1. Измерения проводились на клетках трансплантата через 2 недели, 3 и 6 месяцев после операции. Созревание трансплантата было связано с колебаниями морфометрических параметров митохондриальной фракции и уровня Dgr1. Усиление деления митохондрий выявляли через 3 месяца после трансплантации, что предшествовало увеличению содержания АТФ-синтазы к 6 месяцу и переключению трансплантированных клеток на окислительное фосфорилирование. Проведенный эксперимент показал связь митохондриальной динамики с изменениями метаболического профиля и созреванием трансплантированных нейронов. Регуляция митохондриальной динамики может иметь значение для разработки методов улучшения интеграции трансплантированных нейронов в структуры мозга.

Ключевые слова: нейрогенез, трансплантация, индуцированные плюрипотентные клетки человека, митохондриальная динамика, Dgr1, окислительное фосфорилирование

DOI: 10.31857/S0044452924030107, **EDN:** YWSURR

ВВЕДЕНИЕ

Развитие методов репрограммирования соматических клеток и их направленной дифференцировки в клетки с заданными свойствами, помимо очевидного расширения перспектив в восстановлении поврежденного мозга, позволило сформировать методическую основу для изучения разных аспектов развития, регенерации и межклеточных взаимодействий в центральной нервной системе [1, 2]. Химерные биологические системы, полученные в результате гетеротрансплантации нейрональных предшественников, могут рассматриваться как своеобразная модель нейрогенной ниши и применяться, в том числе для изучения дифференци-

ровки нейронов [3], используя возможности отслеживания развития трансплантированных клеток, например, благодаря применению видоспецифичных антител.

Нейрональные прогениторные клетки могут замещать поврежденные нейроны и стимулировать компенсаторные процессы в мозге реципиента за счет их способности к дифференцировке, миграции, интеграции и экспрессии специфических ростовых и трофических факторов [4]. Расшифровка этих механизмов открывает пути для управления репаративными процессами в центральной нервной системе. Вместе с тем дифференцировка клеток трансплантата и его интеграция в структуры мозга зависит от многих факторов. Например, в недав-

них исследованиях показано, что решающее значение для пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников имеет активность митохондрий [5]. Известно, что нейральные стволовые клетки (NSC) получают энергию путем гликолиза [6], что сочетается с их низкими энергетическими потребностями и ограничивает зависимость от окислительного фосфорилирования (OXPHOS) образование активных форм кислорода, индуцирующее повреждение клеток. Наряду с гликолитическим профилем, NSC характеризуются незрелыми, удлинёнными («тубулярными») митохондриями со слабо развитыми кристами и низким числом копий митохондриальной ДНК [7]. Гликолиз для NSC не только имеет адаптационное значение ввиду особенностей их микроокружения, но и является ключевым фактором, поддерживающим мультипотентность [8]. В процессе дифференцировки NSC в связи с возрастающими энергетическими потребностями возрастает значение OXPHOS [9], что сопровождается перестройкой морфологии митохондрий. Этот метаболический переход рассматривают как ключевое событие, определяющее судьбу дифференцирующихся нейрональных предшественников. Исследования *in vivo* [10, 11], показали, что состояние нейрогенной ниши в зрелом гиппокампе зависит от функционирования митохондриальных комплексов на уровне прогениторных клеток. Дифференцировка нейронов сопровождается увеличением уровня Drp1 (ГТФ-аза DNM1L — динамин-подобный белок), осуществляющего деление митохондрий, причем незрелые нейроны высоко чувствительны как к ингибированию, так и к усилению экспрессии Drp1 [12]. Кроме ведущей функции Drp1 в ремоделировании митохондриальной сети, предполагается его участие в синаптической передаче [13].

Вместе с тем большинство работ, демонстрирующих роль митохондриальной динамики в дифференцировке нейронов, выполнены на культурах клеток, а особенности изменений митохондрий в трансплантированных нейронах изучены недостаточно.

Цель исследования: охарактеризовать связь митохондриальной динамики и метаболического переключения в дифференцирующихся нейронах в долгосрочном эксперименте при трансплантации нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Использовали 15 крыс Вистар (самцы, 3,5 месяца, 300–350 г), полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА «Столбовая». Животных содержали в виварии при неограниченном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Работа была выполнена в рамках экспери-

ментов [14] по трансплантации полученных из иПСК человека нейрональных предшественников, коммитированных в мезенцефальные дофаминергические нейроны.

Получение клеточных культур. Клетки для трансплантации были дифференцированы из иПСК, полученных из фибробластов кожи здорового донора. Использованная линия иПСК IPSRG4S ранее была подробно охарактеризована [15]. Среда для нейрональной дифференцировки иПСК (14 дней, смена среды через день): DMEM/F12 (Gibco, США), 2% заменителя сыворотки (Gibco, США), 1% добавки N2 (Gibco, США), 2-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина (PanEco, Россия), 10-мкМ SB431542 (Stemgent, США), 2-мкМ дорсоморфин (Stemgent, США), 0,5-мкМ LDN-193189 (Miltenyi biotec, США). Среда для культивирования нейрональных предшественников (10 дней, смена среды через день): DMEM/F12 1:1 Neurobasal (Gibco, США), 2% B27-добавка (Gibco, США), 2-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина, 100 нг/мл Shh (PeproTech, США), 100 нг/мл FGF8 (PeproTech, США) и 2 мкМ пурморфина (Stemgent, США). Протоколы клеточной дифференцировки были подробно описаны нами ранее [16, 17].

Хирургические процедуры. Операции проводили при помощи стереотаксического аппарата (Stoelting Co., США). Для анестезии применяли золетил-100 в дозе 0,3 мг/кг и ксиланит в дозе 3 мг/кг, в/м, для премедикации — атропин в дозе 0,04 мг/кг, п/к за 10–15 мин до введения ксиланита. В черную субстанцию справа (координаты по атласу Paxinos: AP = -4,8; L = 1,9; V = 8,0) вводили 12 мкг нейротоксина 6-гидроксидофамина в 3 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты. Слева вводили тот же объем растворителя. Через 25 дней животным на стороне разрушения черной субстанции в хвостатое ядро (AP = 1,5; L = 2,2; V = 4,5) вводили суспензию нейрональных предшественников, содержащую 3×10^5 клеток в 10 мкл 0,9% NaCl, слева вводили растворитель в том же объеме. За день до трансплантации и на протяжении эксперимента животные ежедневно получали циклоспорин в дозе 12 мг/кг.

Иммуногистохимия. Животных выводили из эксперимента через 2 недели ($n = 5$), 3 месяца ($n = 5$) и 6 месяцев ($n = 5$) после введения клеток. Крыс декапитировали гильотиной, мозг фиксировали в 10% формалине. Серийные криостатные срезы (10 мкм), нагревали в цитратном буфере при pH = 6,0 (в пароварке, 15 мин), промывали и инкубировали с первичными антителами 18 ч при комнатной температуре. В настоящем исследовании использовали антитела к ядерному белку нейронов (NeuN, Abcam, № ab104224) или нейронально-

му маркеру PGP9.5 (Abcam, № ab108986), тирозингидроксилазе (TH, Sigma, T8700) и Drp1 (Abcam, клон OT14F6, № ab156951), дополнительно выявляли сукцинатдегидрогеназу (SDHB, Abcam, клон EPR10880, № ab175225), в качестве митохондриального маркера.

Видоспецифичные антитела к белкам человека (не показавшие перекрестной иммунореактивности с белками крысы) использовали для выявления следующих белков: нестина, маркера нейрональных (Nes, Abcam, клон 2C1.3A11, № ab18102), АТФ-синтазы (ATP5A, Invitrogen, клон 5G11, № MA5-38294), белка наружной мембраны митохондрий (MTC02, Invitrogen, № MA5-12014), нейронспецифической енолазы NSE (Leica, клон 22C9). Помимо этого, использовали антитела к ядерному антигену человека (HNA, Novus antibodies, № NBP2-34342). Тел нейронов реципиента при контрольном окрашивании на NeuN и HNA в зоне трансплантации не выявили.

В качестве системы детекции использовали вторичные антитела козы или осла против IgG кролика или мыши, конъюгированные с флуорохромами Atto 488 (Invitrogen, A11008) или Atto 555 (Invitrogen, A31570), для выявления NSE — пероксидазную систему детекции BioSite (KDB-10007). Срезы заключали в среду Fluoroshield (Abcam, ab104139), содержащую DAPI.

Морфометрия. Документирование и анализ препаратов проводили, используя микроскопы Nikon Eclipse Ni-u и Nikon SMZ-18 (Япония), с программным обеспечением NIS Elements BR и ImageJ. Клетки и их ядра на изображении выделяли при помощи графического планшета, выбирая клетки с сохраненными ядрами в центральной зоне трансплантата, без взаимного наложения. При выборе клеток для анализа и определении границ сомы нейронов ориентировались на локализацию нейрональных маркеров. Оценивали интенсивность флуоресценции в цитоплазме клеток, при увеличении объектива $\times 20$, не менее чем на 5 срезах (от одного животного), взятых в области трансплантата с шагом не менее 50 мкм; для измерений было взято не менее 250 клеток с животного. Интенсивность окрашивания для иммунопероксидазных препаратов (NSE) определяли как разность максимального значения яркости 8-битного изображения (255) и средней яркости пикселей в выделенной области, чтобы меньшее значение соответствовало более светлым объектам.

Для оценки изменений морфологии митохондриальной сети руководствовались ранее предложенным протоколом [18]. Получали серию снимков из 12 фокальных планов, используя иммерсионный объектив $\times 100$, контраст изображений повышали вычитанием медианного фильтра. На изображениях, полученных методом проекции максимальной интенсивности, выделяли методом адаптивной сегментации MTC02-позитивные объекты — ми-

тохондриальные кластеры, цепочки митохондрий, митохондриальные филаменты и оценивали длину срединной оси объектов (обозначено на графике как “длина митохондрий”).

Данные полученные от каждого животного усредняли, для сравнения групп применяли дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 7.0, данные представлены в виде $M \pm SD$ (M — среднее, SD — среднеквадратичное отклонение).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансплантированные клетки располагались по ходу иглы, область трансплантации имела отчетливые границы, а миграции нейронов за пределы трансплантата не выявили. Со временем плотность клеток в трансплантате снижалась, а их размеры увеличивались. На 3-й и 6-й месяц после операции в трансплантате выявляли нейроны человека, содержащие тирозингидроксилазу — маркерный белок дофаминовых нейронов (рис. 1а). Двойное выявление митохондриальных белков MTC02 (маркер наружной мембраны митохондрий) и SDHB (маркер внутренней мембраны митохондрий) позволило выявить в клетках трансплантата скопления митохондрий. Двойное окрашивание на Drp1 и SDHB продемонстрировало ассоциацию Drp1 и митохондриальной сети (рис. 1).

По мере созревания трансплантата, начиная со второй недели, увеличивалась интенсивность флуоресценции при выявлении NeuN (рис. 2, 4), что согласуется со сроками увеличения экспрессии NSE (рис. 2, 4), и ранее показанном нами в сходном эксперименте [14] снижением экспрессии даблкортина (маркера нейрональных предшественников), развитием отростков и экспрессией синаптофизина в трансплантированных нейронах. При этом, выявление нестина (Nes) — маркера нейрональных предшественников, демонстрировало обратную динамику. Если ко второй неделе в области введения обнаруживали многочисленные Nes-позитивные клетки, то к шестому месяцу интенсивность флуоресценции при выявлении нестина в трансплантате было резко снижено (ANOVA, $F_{(2,12)} = 28.78$; $p < 0.001$).

Результаты выявления Nes и NeuN свидетельствуют не только о росте количества дифференцированных нейронов со временем, но и о завершении созревания трансплантата, когда популяция незрелых Nes-позитивных клеток практически отсутствовала.

К шести месяцам интенсивность флуоресценции при выявлении ATP5A в трансплантирован-

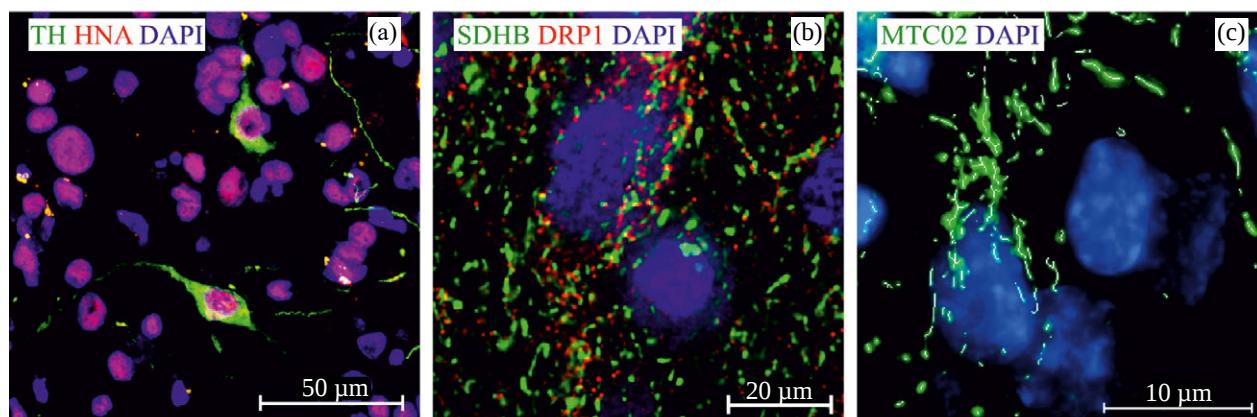


Рис. 1. Выявление тирозингидроксилазы и митохондриальных маркеров в трансплантате:

(a) — выявление тирозингидроксилазы (TH, зеленым) и ядерного антигена человека (HNA, красным), 6 месяц после трансплантации; (b) — ассоциация митохондриальной сети и Drp1 (SDHB — зеленым, Drp1 — красным), 6 месяц после трансплантации, изображение получено методом деконволюции из 24 фокальных планов; (c) — выявление наружной мембраны митохондрий (MTC02, зеленым) и результат работы алгоритма выделения срединной оси объектов (белым), 2 неделя после трансплантации, изображение получено с помощью медианного фильтра из 12 фокальных планов.

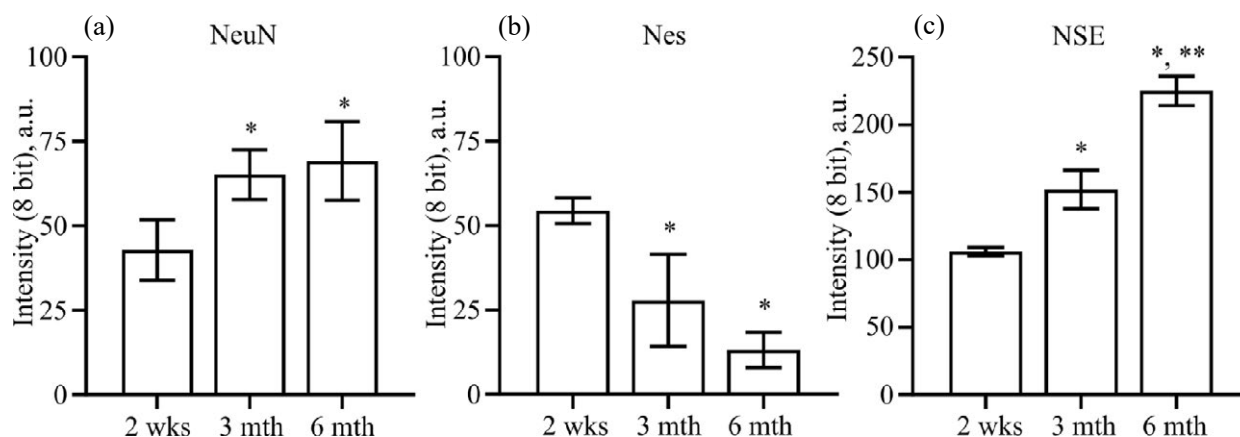


Рис. 2. Динамика выявления маркерных белков дифференцировки нейронов в трансплантате:

(a) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при выявлении ядерного белка нейронов (NeuN); (b) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при выявлении нестина (Nes); (c) — интенсивность иммунопероксидазного окрашивания (8 бит, градации яркости) при выявлении нейрональной енолазы (NSE).

wks — недели, mth — месяцы * — $p < 0.05$ по сравнению с 2 неделями после трансплантации, ** — $p < 0.05$ по сравнению с 3 месяцами после трансплантации. ANOVA, апостериорный тест Тьюки.

ных нейронах была значимо (ANOVA, $F_{(2,12)} = 13.18$; $p < 0.001$) выше по сравнению с более ранними сроками (рис. 2, 3), что может свидетельствовать как о наработке митохондриальной массы, так и о завершении переключения клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование.

Показатели митохондриальной динамики в клетках трансплантата различались на всех исследованных сроках. Так, наибольшее существенные изменения экспрессии Drp1 выявили на третьем месяце, когда созревание клеток еще не завершилось. Увеличение содержания Drp1 предшествовало увеличению экспрессии АТФ-синтазы.

К трем месяцам интенсивность иммунофлуоресценции при выявлении Drp1 значимо возрас-

тала по сравнению с ранним сроком после трансплантации, а к шести месяцам она вновь снижалась (ANOVA $F_{(2,12)} = 19.70$; $p < 0.001$) по сравнению с пиком, наблюдавшимся к трем месяцам (рис. 3, 4).

При выявлении белка наружной митохондриальной мембраны MTC02 в трансплантате, начиная со второй недели обнаруживали клетки, имеющие как удлиненные, так и короткие митохондрии, находящиеся на разных этапах дифференровки.

При этом, увеличение содержания Drp1 сопровождалось снижением размеров MTC02-позитивных объектов (митохондриальных кластеров и филаментов). Их средняя длина в клетках трансплантата на второй неделе в среднем была значимо выше, по сравнению с последующими сроками,

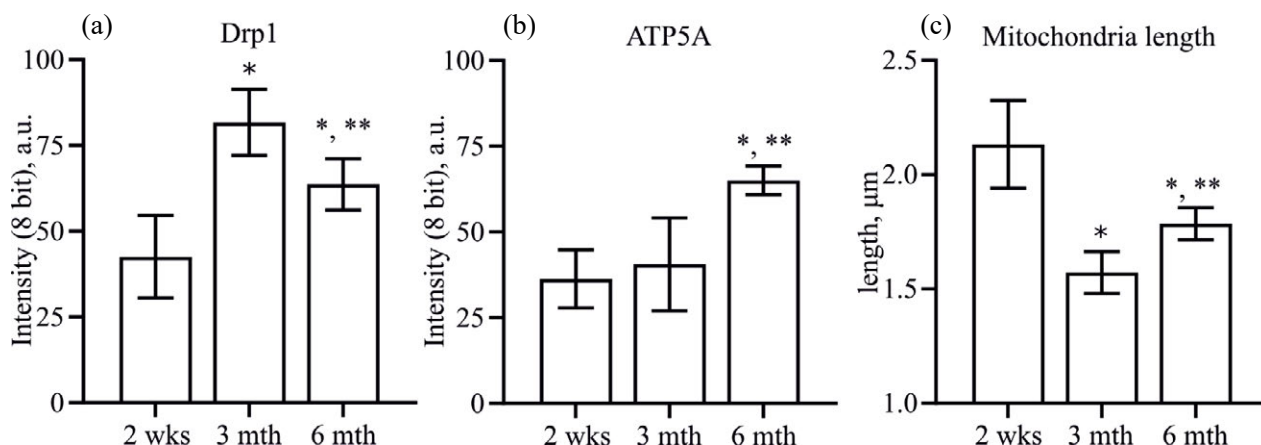


Рис. 3. Изменения митохондриальных показателей в клетках трансплантата. (a) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при использовании антител к Drp1; (b) — интенсивность флуоресценции (8 бит, градации яркости) при использовании антител к ATP5A; (c) — изменения длины МТC02-позитивных объектов (“mitochondria length”) (мкм); Обозначения как на рис. 1.

к третьему месяцу она значимо снижалась, однако к шестому месяцу вновь возрастала (ANOVA, $F_{(2,12)} = 23.97$; $p < 0.001$), хотя и оставалась ниже, чем у незрелых нейронов (рис. 3, 4).

Выраженные изменения выявили и при оценке среднего объема митохондрий в клетке — доля, занимаемая МТC02-позитивными структурами (area fraction) в перинуклеарной области, возрастала с $2.99 \pm 0.17\%$ на второй неделе, до $4.39 \pm 0.71\%$ к шестому месяцу после введения ($F_{(2,12)} = 13.64$; $p < 0.001$), что, по-видимому, связано с увеличением количества и размеров митохондрий и митохондриальных кластеров.

Таким образом, в нашем эксперименте в трансплантированных клетках наблюдались колебания уровня белка деления митохондрий Drp1, ассоциированные с изменениями морфометрических параметров митохондриальной фракции, при этом, по мере созревания трансплантата отмечали увеличение объема митохондрий в клетке.

Причем, изменения митохондриальной динамики предшествовали увеличению содержания АТФ-синтазы, которое, по-видимому, отражает окончательное переключение трансплантированных клеток на окислительное фосфорилирование к шестому месяцу и согласуется со сроками их созревания и интеграции в структуры мозга реципиента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показанные в настоящей работе особенности динамики содержания Drp1 и размеров митохондрий в созревающих нейронах трансплантата согласуются с описанными в литературе изменениями при дифференцировке нервных клеток в эмбриогенезе, в нейрогенных нишах зрелого мозга грызунов

in vivo и *in vitro*, а также при развитии полученных из иПСК человека нейральных стволовых клеток [19, 20]. Так, известно, что пролиферирующие NSC в интерфазе имеют удлинённые митохондрии, в то время как в нейрональных предшественниках (NPC) митохондрии более фрагментированы, а по мере продвижения по этапам нейрональной дифференцировки длина и объем митохондрий увеличиваются [5, 10, 20]. Баланс слияния и деления митохондрий, обеспечиваемый антагонистически действующими белками митофузином и Drp1 критически важен для регуляции пролиферации, дифференцировки и миграции нервных клеток. Так, нокаут Drp1 подавляет нейрогенез в постнатальном гиппокампе [21], а для клеток субвентрикулярной зоны было показано снижение миграции под действием Mdivi-1 — ингибитора Drp1 [22]. Делеция митофузинов 1 и 2, регулирующих слияние митохондрий, приводила к фрагментации митохондрий, и снижению пролиферации NSC [10, 11]. На более поздних сроках нейрональной дифференцировки, в исследованиях NPC, полученных из иПСК человека было выявлено, что экспрессия митофузина возрастает по мере созревания нейронов, а его нокаут приводит к задержке формирования фенотипически зрелых нейронов [9, 19]. В целом, высказывается мнение [20], что нарушение слияния митохондрий ведет к задержке пролиферации и обновления популяции NSC, а нарушение деления митохондрий — к нарушению созревания нейронов. Выявленное к третьему месяцу увеличение содержания Drp1 и уменьшение длины митохондриальных цепочек и филаментов в клетках трансплантата согласуется со снижением экспрессии нестина — маркера NPC, и отражает активацию Drp1 на ранних этапах дифференцировки нейронов. По-

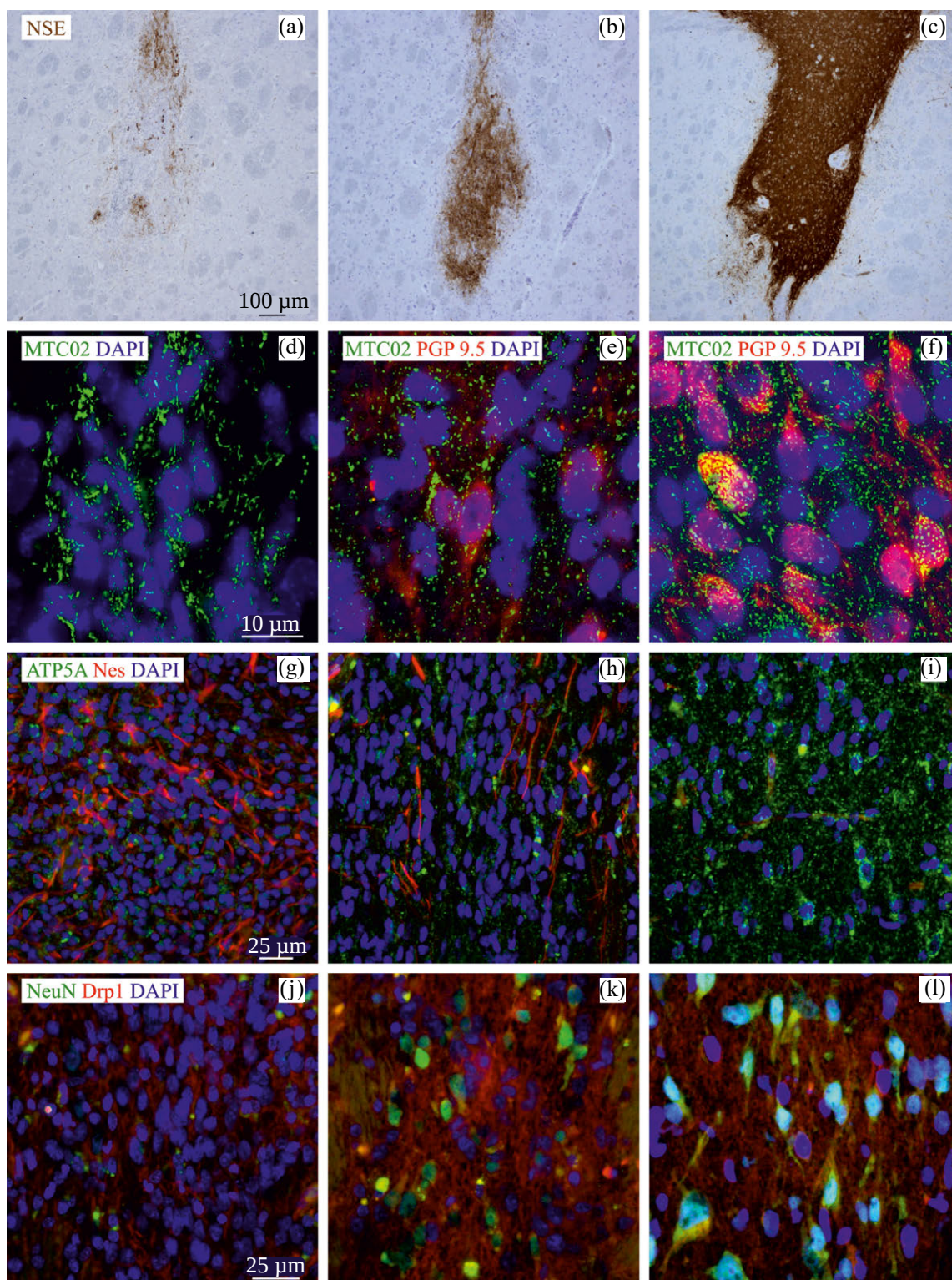


Рис. 4. Локализация нейрональных и митохондриальных маркеров в центральной области трансплантата на разных сроках после операции.

(a, b, c) – Выявление нейрональной енолазы (NSE); (d, e, f) – Выявление белка наружной мембраны митохондрий (MTC02, зеленым), на (e) и (f) дополнительно показан нейрональный маркер PGP 9.5 (красным); (g, h, i) – Выявление АТФ-синтазы (ATP5A, красным) и нестина (Nes, зеленым); (j, k, l) – Выявление Drp1 (красным) и нейронального маркера NeuN (зеленым).

Первый столбец (a, d, g, j) – 2 недели, второй столбец (b, e, h, k) – 3 месяца, третий столбец (c, f, i, l) – 6 месяцев после трансплантации.

мимо непосредственного участия в нейрональной дифференцировке деление, митохондрий связано и с регуляцией дендрито- и аксоногенеза [23, 24]. Например, при направленном нокауте Drp1 в дофаминовых нейронах отмечали нарушение дофаминергической иннервации хвостатого ядра [25]. Кроме того Drp1, кроме участия в митохондриальной динамике, связан с процессами высвобождения и утилизации синаптических везикул [13, 26].

Обнаруженное нами к шести месяцам после трансплантации увеличение содержания АТФ-синтазы в нейронах и изменение морфометрических параметров митохондрий, по-видимому, отражает завершение метаболической перестройки нейронов и демонстрирует связь изменений морфологии митохондрий с усилением OXPHOS. Действительно, ранее было показано, что нейрональная дифференцировка происходит параллельно с активацией компонентов митохондриальных комплексов, особенно комплекса V (АТФ-синтазы), ключевого для выработки АТФ путем OXPHOS [27]. Интересно, что наряду с энергообеспечением, АТФ-синтаза участвует в образовании крист внутренней митохондриальной мембраны [28], обеспечивая формирование функционально зрелых митохондрий. Показанная в настоящей работе согласованность изменений митохондриальной динамики и экспрессии АТФ-синтазы обнаруживается и другими авторами, например, в развивающемся переднем мозге мышей увеличение экспрессии АТФ-синтазы сочетается с ростом экспрессии митофузина и снижением гликолитической активности [29].

По нашим данным, по мере созревания нейронов трансплантата, наряду с увеличением экспрессии синаптофизина [14] и маркерных белков зрелых нейронов, увеличивается и содержание участвующей в гликолизе NSE, что согласуется известным переключением при дифференцировке нейронов с альфа-енолазы на NSE [30] и может отражать протекающую параллельно активации OXPHOS перестройку и гликолитических ферментов.

По данным литературы, изменения митохондриального метаболизма и переключение на OXPHOS, влияют на пост-трансляционные модификации белков (в том числе — гистонов), метилирование и ацетилирование ДНК, что также является частью регуляторных механизмов клеточной дифференцировки [31, 32]. Таким образом, необходимость метаболической перестройки и переключения дифференцирующихся нейронов на OXPHOS определяется не только их возрастающими потребностями в АТФ, но и регуляцией отдельных этапов созревания клеток через многочисленные сигнальные пути [8, 11], что подчеркивает и наше исследование.

Отметим, что в настоящей и более ранних наших работах [14, 16] в сходных условиях созревание и интеграция трансплантированных нейронов человека продолжались до полугода, что превышает сроки развития нейронов грызунов. Эти различия отмечены и другими авторами, например, по данным Iwata [33] кортикальные нейроны человека, по сравнению с нейронами мыши, имеют особенности посттрансляционной модификации белков, участвующих в митохондриальной динамике, экспрессии генов цикла Кребса и сборки электрон-транспортной цепи, что, предположительно, определяет их замедленное созревание.

В целом, литературные данные подтверждают общность изменений митохондриальной динамики выявленных в настоящей работе (при гетеротрансплантации нейрональных предшественников, полученных из иПСК человека в мозг крысы) и в дифференцирующихся нейронах в различных условиях (*in vitro*, в эмбриогенезе и зрелом мозге).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный эксперимент демонстрирует связь изменений митохондриальной динамики и метаболического профиля трансплантированных нейронов, полученных из иПСК человека с их созреванием в трансплантате. Дальнейшее изучение изменений митохондриальной динамики в дифференцирующихся нейронах, может иметь значение для разработки методов управления интеграцией трансплантированных нейронов в структуры мозга.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование исследования: В.С.С., Д.Н.В., А.В.С.; Клеточные культуры: О.С.Л.; Манипуляции с животными и трансплантация: А.В.С., А.С.О.; Обработка гистологического материала и анализ данных: Д.Н.В., Е.Н.Ф., А.В.Е., В.В.П., А.С.О.; Написание и редактирование финального текста статьи: Д.Н.В., В.С.С., А.В.Е., Е.Н.Ф.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. 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 рекомен-

дациям локального этического комитета ФГБНУ НЦН.
Протокол № 5–3/22 от 01.06.2022 г.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ 24-45-00052.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doss MX, Sachinidis A (2019) Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells* 8: 403.
<https://doi.org/10.3390/cells8050403>
2. Bigarreau J, Rouach N, Perrier AL, Mouthon F, Charvériat M (2022) Modeling and Targeting Neuroglial Interactions with Human Pluripotent Stem Cell Models. *Int J Mol Sci* 23: 1684.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031684>
3. Crane AT, Voth JP, Shen FX, Low WC (2019) Concise Review: Human-Animal Neurological Chimeras: Humanized Animals or Human Cells in an Animal? *Stem Cells* 37: 444–452.
<https://doi.org/10.1002/stem.2971>
4. Aleksandrova MA, Marey MV (2015) [Stem Cells in the Brain of Mammals and Human: Fundamental and Applied Aspects]. *Zh Vyssh Nerv Dejat Im I P Pavlova* 65: 271–305
5. Iwata R, Casimir P, Vanderhaeghen P (2020) Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science* (80) 369:858–862.
<https://doi.org/10.1126/science.aba9760>
6. Folmes CDL, Terzic A (2016) Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Semin Cell Dev Biol* 52: 68–75.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.010>
7. Sun X, St John JC (2016) The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. *Biochem J* 473: 2955–2971.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160008>
8. Maffezzini C, Calvo-Garrido J, Wredenberg A, Freyer C (2020) Metabolic regulation of neurodifferentiation in the adult brain. *Cell Mol Life Sci* 77: 2483–2496.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03430-9>
9. Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L, Ma L, Hamm M, Gage FH, Hunter T (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* 5.
<https://doi.org/10.7554/eLife.13374>
10. Khacho M, Slack RS (2018) Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: From development to the adult brain. *Dev Dyn* 247: 47–53.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24538>
11. Khacho M, Harris R, Slack RS (2019) Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. *Nat Rev Neurosci* 20:34–48.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0091-3>
12. Vantaggiato C, Castelli M, Giovarelli M, Orso G, Bassi MT, Clementi E, De Palma C (2019) The Fine Tuning of Drp1-Dependent Mitochondrial Remodeling and Autophagy Controls Neuronal Differentiation. *Front Cell Neurosci* 13.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00120>
13. Singh M, Denny H, Smith C, Granados J, Renden R (2018) Presynaptic loss of dynamin-related protein 1 impairs synaptic vesicle release and recycling at the mouse calyx of Held. *J Physiol* 596: 6263–6287.
<https://doi.org/10.1113/JP276424>
14. Voronkov DN, Stavrovskaya AV, Lebedeva OS, Li W, Olshansky AS, Gushchina AS, Kapkaeva MR, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Illarioshkin SN (2023) Morphological Changes in Neural Progenitors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Transplanted into the Striatum of a Parkinson's Disease Rat Model. *Ann Clin Exp Neurol* 17: 43–50.
<https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.2.6>
15. Holmqvist S, Lehtonen S, Chumarina M, Puttonen KA, Azevedo C, Lebedeva O, Ruponen M, Oksanen M, Djelouil M, Collin A, Goldwurm S, Meyer M, Lagarkova M, Kiselev S, Koistinaho J, Roybon L (2016) Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. *npj Park Dis* 2: 16009.
<https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.9>
16. Voronkov DN, Stavrovskaya A V., Gushchina AS, Olshansky AS, Lebedeva OS, Ereemeev A V., Lagarkova MA (2022) Morphological Characterization of Astrocytes in a Xenograft of Human iPSC-Derived Neural Precursor Cells. *Acta Naturae* 14: 100–108.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11710>
17. Lebedeva OS, Sharova EI, Grekhnev DA, Skorodumova LO, Kopylova IV, Vassina EM, Oshkolova A, Novikova IV, Krisanova AV, Olekhovich EI, Vigont VA, Kaznacheyeva E V, Bogomazova AN, Lagarkova MA (2023) An Efficient 2D Protocol for Differentiation of iPSCs into Mature Postmitotic Dopaminergic Neurons: Application for Modeling Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 24: 7297.
<https://doi.org/10.3390/ijms24087297>
18. Song W, Bossy B, Martin OJ, Hicks A, Lubitz S, Knott AB, Bossy-Wetzel E (2008) Assessing mitochondrial morphology and dynamics using fluorescence wide-field microscopy and 3D image processing. *Methods* 46: 295–303.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.10.003>
19. Son G, Han J (2018) Roles of mitochondria in neuronal development. *BMB Rep* 51: 549–556.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.11.226>
20. Iwata R, Vanderhaeghen P (2021) Regulatory roles of mitochondria and metabolism in neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 69: 231–240.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.05.003>
21. Steib K, Schäffner I, Jagasia R, Ebert B, Lie DC (2014) Mitochondria Modify Exercise-Induced Development of Stem Cell-Derived Neurons in the Adult Brain. *J Neurosci* 34: 6624–6633.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4972-13.2014>
22. Kim HJ, Shaker MR, Cho B, Cho HM, Kim H, Kim JY, Sun W (2015) Dynamin-related protein 1 controls the migration and neuronal differentiation of subventricular zone-derived neural progenitor cells. *Sci Rep* 5: 15962.
<https://doi.org/10.1038/srep15962>

23. Rossi MJ, Pekkurnaz G (2019) Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 57: 149–155.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.02.001>
24. Zhang S, Zhao J, Quan Z, Li H, Qing H (2022) Mitochondria and Other Organelles in Neural Development and Their Potential as Therapeutic Targets in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 16.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.853911>
25. Berthet A, Margolis EB, Zhang J, Hsieh I, Zhang J, Hnasko TS, Ahmad J, Edwards RH, Sesaki H, Huang EJ, Nakamura K (2014) Loss of Mitochondrial Fission Depletes Axonal Mitochondria in Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci* 34: 14304–14317.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0930-14.2014>
26. Itoh K, Murata D, Kato T, Yamada T, Araki Y, Saito A, Adachi Y, Igarashi A, Li S, Pletnikov M, Hugarir RL, Watanabe S, Kamiya A, Iijima M, Sesaki H (2019) Brain-specific Drp1 regulates postsynaptic endocytosis and dendrite formation independently of mitochondrial division. *Elife* 8.
<https://doi.org/10.7554/eLife.44739>
27. Beckervordersandforth R, Ebert B, Schäffner I, Moss J, Fiebig C, Shin J, Moore DL, Ghosh L, Trincherio MF, Stockburger C, Friedland K, Steib K, von Wittgenstein J, Keiner S, Redecker C, Hölter SM, Xiang W, Wurst W, Jagasia R, Schinder AF, Ming G, Toni N, Jessberger S, Song H, Lie DC (2017) Role of Mitochondrial Metabolism in the Control of Early Lineage Progression and Aging Phenotypes in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuron* 93: 560–573.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.017>
28. Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brèthes D, di Rago J-P, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21: 221–230.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
29. Fame RM, Shannon ML, Chau KF, Head JP, Lehtinen MK (2019) Concerted metabolic shift in early forebrain alters the CSF proteome and depends on cMYC down-regulation for mitochondrial maturation. *Development* 146(20):dev182857.
<https://doi.org/10.1242/dev.182857>
30. Haque A, Polcyn R, Matzelle D, Banik NL (2018) New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci* 8: 33.
<https://doi.org/10.3390/brainsci8020033>
31. Tarazona OA, Pourquié O (2020) Exploring the Influence of Cell Metabolism on Cell Fate through Protein Post-translational Modifications. *Dev Cell* 54: 282–292.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.035>
32. Dai Z, Ramesh V, Locasale JW (2020) The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nat Rev Genet* 21: 737–753.
<https://doi.org/10.1038/s41576-020-0270-8>
33. Iwata R, Casimir P, Erkol E, Boubakar L, Planque M, Gallego López IM, Ditekowska M, Gaspariunaite V, Beckers S, Remans D, Vints K, Vandekeere A, Poovathingal S, Bird M, Vlaeminck I, Creemers E, Wierda K, Corthout N, Vermeersch P, Carpentier S, Davie K, Mazzone M, Gounko NV, Aerts S, Ghesquière B, Fendt S-M, Vanderhaeghen P (2023) Mitochondria metabolism sets the species-specific tempo of neuronal development. *Science* (80) 379.
<https://doi.org/10.1126/science.abn4705>

MITOCHONDRIAL DYNAMICS AND METABOLIC REMODELING IN XENOGRFT OF IPSC-DERIVED HUMAN NEURAL PRECURSORS

D. N. Voronkov^{a, #}, A. V. Egorova^{a, b}, E. N. Fedorova^{a, b}, A. V. Stavrovskaya^a, O. S. Lebedeva^c,
A. S. Olshanskiy^a, V. V. Podoprigora^b and V. S. Sukhorukov^{a, b}

^aResearch Center of Neurology, Moscow, Russia

^bN.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^cLopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

[#]e-mail: voronkov@neurology.ru

It is well recognized that the regulation of mitochondrial functions affects the differentiation and maturation of neurons. The study of these processes is of both fundamental and practical importance for regenerative neurobiology. Aim of the study: to characterize the mitochondrial fission changes and their relation to the activation of oxidative phosphorylation (metabolic shift) during maturation of human IPSC-derived neural precursors grafted into rat striatum. Wistar rats ($n = 15$) were unilaterally injected into the caudate nucleus with neural precursors derived from human IPSCs. Changes in localization and expression of neuronal differentiation markers: nestin, NeuN, neuronal enolase, as well as mitochondrial outer membrane protein, ATP synthase and mitochondrial fission protein Drp1 were assessed by immunostaining. Measurements were performed on graft cells 2 weeks, 3 and 6 months after surgery. Maturation of grafted neurons was associated with fluctuations morphometric parameters of the mitochondrial fraction and Drp1 levels. Increased mitochondrial fission was detected 3 months after transplantation, before an increase in ATP synthase staining by 6th month and a switch of transplanted cells to oxidative phosphorylation. The conducted experiment demonstrated a link between mitochondrial dynamics and changes in the metabolic profile and maturation of transplanted neurons. The regulation of mitochondrial dynamics may have future implications for developing methods to improve the integration of transplanted neurons into recipient brain structures.

Keywords: neurogenesis, grafting, human IPSC, mitochondrial dynamics, Drp1, Oxidative phosphorylation