

Том 60, Номер 5

ISSN 0044-4529
Сентябрь – Октябрь 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 5, 2024

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- UDP-гликозилтрансферазы и их роль в метаболизме ксенобиотиков
А. Г. Кинарейкина, Е. А. Силиванова 439
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Сравнительный анализ осмотической резистентности эритроцитов различных таксонов позвоночных
Б. А. Герда, Е. А. Скверчинская, А. Ю. Андреева, А. А. Волкова, С. П. Гамбарян, И. В. Миндукшеев 460
- Использование микропрепаративного фракционирования клеточного лизата в исследовании влияния естественных киллеров на фенотип, миграцию и апоптоз клеток трофобласта в системе *in vitro*
А. В. Корневский, Ю. П. Милютин, С. К. Бочковский, А. А. Ошколова, О. Н. Беспалова, С. А. Сельков, Д. И. Соколов 483
- Сравнительное исследование температурного коэффициента Q10 гибернирующих сусликов *Urocyon undulatus* и охлажденных крыс разного возраста
Н. М. Захарова, Ю. С. Тараховский, М. О. Хренов 499
- Эффекты стимуляции большого ядра шва на ноцицептивные нейроны каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга крысы в норме и после перенесенного кишечного воспаления
Б. М. Сушкевич, И. Б. Сиваченко, О. А. Любашина 509
- Механизмы вовлечения моноаминоксидазы в развитие гипербарических кислородных судорог
С. Ю. Жилев, И. Н. Басова, Т. Ф. Платонова, О. С. Алексеева, Н. А. Гавришева, И. Т. Демченко 526
- Неонатальная гипоксия вызывает поведенческий дефицит, ассоциированный с нарушениями глюкокортикоидной и серотонинергической системы взрослых крыс
Е. И. Толькова, В. А. Стратилов, О. В. Ветровой 535
- Глутаматергическая регуляция аудиогенных судорог и постиктальной каталепсии у крыс линии крушинского-молодкиной: влияние дизоцилпина и D-серина
Н. М. Сурина, И. Б. Федотова, И. И. Полетаева 544
- Роль кальций-зависимой десенситизации в потенциации GNE-9278 токов NMDA рецепторов нейронов коры крыс *in vitro*
А. И. Федорина, С. М. Антонов, Д. А. Сибаров 553
- Экспрессия генов пролактина и пролактиновых рецепторов у трёхглазой колюшки *G. aculeatus L.*: зависимость от пола и пресноводной адаптации
Н. С. Павлова, Т. В. Неретина, О. В. Смирнова 562
-
-

Contents

Vol. 60, No. 5, 2024

REVIEWS

The Role of UDP-Glycosyltransferases in Xenobiotic Metabolism

A. G. Kinareikina and E. A. Silivanova

439

EXPERIMENTAL ARTICLES

Comparative Analysis of the Osmotic Fragility
of Erythrocytes Across Various Taxa of Vertebrates

*B. A. Gerda, E. A. Skverchinskaya, A. Y. Andreeva,
A. A. Volkova, S. Gambaryan and I. V. Mindukshev*

460

Use of Micropreparative Cell Lysate Fractionation in Studying the Effect of Natural Killer Cells
on The Phenotype, Migration and Apoptosis of Trophoblast Cells *in vitro*

*A. V. Korenevsky, Yu. P. Milyutina, S. K. Bochkovsky, A. A. Oshkolova,
O. N. Bespalova, S. A. Selkov and D. I. Sokolov*

483

Comparative Study of the Temperature Coefficient Q₁₀ of Hibernating
Ground Squirrels *Uroditellus undulatus* and Cooled Rats of Different Ages

N. M. Zakharova, Y. S. Tarahovsky and M. O. Khrenov

499

Effects of the Nucleus Raphe Magnus Stimulation on Nociceptive
Neurons of the Rat Caudal Ventrolateral Medulla
in Normal Conditions and after Intestinal Inflammation

B. M. Sushkevich, I. B. Sivachenko and O. A. Lyubashina

509

Mechanisms of Monoamine Oxidase Involvement
in the Development of Hyperbaric Oxygen Seizures

*S. Yu. Zhilyaev, I. N. Basova, T. F. Platonova, O. S. Alekseeva,
N. A. Gavrishcheva and I. T. Demchenko*

526

Neonatal Hypoxia Induces Behavioral Deficit Associated
with Impairment in the Glucocorticoid and Serotonergic Systems in Adult Rats

E. I. Tyulkova, V. A. Stratilov and O. V. Vetrovov

535

Glutamatergic Regulation of the Audiogenic Seizures
and Postictal Catalepsy in Krushinsky–Molodkina Strain Rats:
Effects of Dizocilpine and D-Serine

N. M. Surina, I. B. Fedotova and I. I. Poletaeva

544

The Role of Calcium-Dependent Desensitization in the Potentiation by GNE-9278
of NMDA Receptor Currents in Rat Cortal Neurons *in vitro*

A. I. Fedorina, S. M. Antonov and D. A. Sibarov

553

Expression of Prolactin Axis Genes in the Brain, Gills,
and Kidneys of the Three-Spined Stickleback *G. aculeatus* L.:
Dependency on Freshwater Adaptation and Sex

N. S. Pavlova, T. V. Neretina and O. V. Smirnova

562

UDP-ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ И ИХ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ КСЕНОБИОТИКОВ

© 2024 г. А. Г. Кинарейкина^{1, 2, *}, Е. А. Силиванова¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии
и арахнологии – филиал ТюмНЦ СО РАН, Тюмень, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Тюменский государственный медицинский университет”

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тюмень, Россия

*e-mail: kinareickina@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 25.09.2024 г.

Принята к публикации 26.09.2024 г.

UDP-гликозилтрансферазы (UGTs) принадлежат к сложному суперсемейству гликозилтрансфераз. Они катализируют реакции гликозилирования – ковалентного присоединения сахара из кофактора (UDP-гликозида) к соответствующей функциональной группе липофильного субстрата, играя тем самым важную роль в клеточном гомеостазе многих групп организмов (млекопитающих, членистоногих, растений и т.д.). UGTs относятся к основным ферментам II фазы детоксикации ксенобиотиков различной природы (металлов, природных соединений, лекарственных препаратов, промышленных загрязнителей, пестицидов и т.д.). Интерес к данной группе ферментов человека обусловлен их ролью в метаболизме лекарственных препаратов и участием в развитии лекарственной устойчивости раковых клеток. UDP-гликозилтрансферазы беспозвоночных (особенно, насекомых) привлекают внимание в связи с их участием в развитии устойчивости к пестицидам. Однако точная роль в биотрансформации ксенобиотиков отдельных семейств и подсемейств UGTs по-прежнему не установлена, что подчеркивает важность дальнейшего изучения данных ферментов. Данный обзор подготовлен с целью дать представление о межвидовом разнообразии UDP-гликозилтрансфераз и особенностях их взаимодействия с ксенобиотиками. Среди общих сведений о суперсемействе UGTs дано краткое описание структуры и локализации фермента, ферментативной реакции и механизма катализа на примере UDP-глюкуронозилтрансферазы. Приведены данные о влиянии промышленных загрязнителей, металлов, пестицидов, лекарственных средств и природных соединений на ферментативную активность UGTs и уровень экспрессии кодирующих генов у позвоночных и беспозвоночных (членистоногих). Отраженное в обзоре разнообразие ферментов UGTs и их субстратов демонстрирует широкие возможности организма животных с точки зрения защиты от воздействия ксенобиотиков.

Ключевые слова: UDP-гликозилтрансфераза, система детоксикации, ксенобиотики, промышленные загрязнители, металлы, пестициды, лекарственные средства, природные загрязнители

DOI: 10.31857/S0044452924050018, **EDN:** XQAXAY

ВВЕДЕНИЕ

Многие ксенобиотики представляют собой неполярные липофильные соединения, что способствует их диффузии через биологические мембраны и последующему доступу к мишени действия, однако эта же характеристика препятствует их выведению из организма [1]. Для детоксикации ксенобиотиков в организме действует сложная трехфазная ферментативная система [2]. Фаза I (окисление, эпоксидирование и т.д. [3]) осуществляется монооксигеназами цитохрома P450, карбоксилэстеразами [4] и другими ферментами, снижающими биологическую активность ксенобиотиков. К фер-

ментам фазы II (конъюгация [5]), относятся глутатион-S-трансферазы [6], UDP-гликозилтрансферазы (UGTs, EC 2.4.) [7–10] и другие ферменты, изменяющие физико-химические характеристики метаболитов фазы I. Транспортёры фазы III (выведение [3, 5]) экспортируют конъюгированные токсины и их метаболиты из клетки (ABC-кассетные транспортёры и др.) [2].

Гликозилирование, катализируемое UGTs, относится к одному из центральных путей метаболизма разнообразных субстратов, как образующихся в процессе жизнедеятельности организма (билирубин [11], желчные кислоты, некоторые гормоны

[12–13], нейротрансмиттеры [13–15], жирорастворимые витамины [1, 16–17]), так и поступающих из окружающей среды (лекарства [1, 18–19], ветеринарные препараты, аллелохимикаты, загрязнители окружающей среды [15, 17, 20]). В отличие от ферментов первой фазы детоксикации (P450, карбоксилэстеразы), непосредственно действующих на молекулу токсина, UGTs участвуют во второй фазе путём ковалентного присоединения гексозных фрагментов к липофильным химическим веществам [21–22]. Образующиеся гликозилированные соединения с объемными боковыми группами [21] лучше растворяются в воде и могут эффективно выводиться из организма [23]. Глюкуроновые конъюгаты загрязнителей окружающей среды (бензопирен, нафталин, фенантрен, полихлорированные бифенилы) обнаруживаются в моче водных организмов [24], поэтому UDP-глюкурозилтрансферазы могут быть применены для экотоксикологического анализа [12]. Посредством реакции конъюгации не всегда происходит дезактивация соединения [15, 25–26]. В редких случаях гликозилирование метаболизирует субстраты в их биологически активные и/или токсичные формы. Например, при глюкуронидации стероидов по D-кольцу образуется медиатор внутрипеченочного холестаза беременных [27], а морфин-6-глюкуронид является более эффективным опиоидным агонистом, чем морфин [26, 28–29].

Внескольких предыдущих обзорах были обобщены результаты исследований UGTs, посвященных вопросам эволюции/коэволюции [22, 30], заболеваний [27–28, 31], связанных с данными ферментами [32–34], биотрансформации ксенобиотиков [1, 12, 14, 16, 29, 35–38], однако большинство из них были ограничены изоферментами позночных, в частности человека. Аббревиатурой UGTs (EC 2.4.) в упомянутых работах часто обозначена определенная группа ферментов, а именно UDP-глюкурозилтрансферазы (UGlcUAT, EC 2.4.1.17), которые используют в основном UDP-глюкуроновую кислоту в качестве донора сахара [30]. Однако существует множество изоформ UDP-гликозилтрансфераз (обозначенные в данной статье как UGTs), характерных для различных свободноживущих организмов [39], использующих в качестве донора гексозных групп другие UDP-производные углеводов, а не только UDP-глюкуроновую кислоту.

Цель данного обзора заключалась в анализе межвидового разнообразия UDP-гликозилтрансфераз, в том числе особенностей взаимодействия UGTs некоторых беспозвоночных (членистоногих) с ксенобиотиками. В статье также приведены общие сведения о механизме катализа и структурных характеристиках суперсемейства UGTs. Были проанализированы научные публикации за пе-

риод 2000–2024 гг из баз данных PubMed, Scopus, Springer Link, Web of Science, Google Академия, соответствующие ключевым словам: UDP-гликозилтрансфераза, система детоксикации, ксенобиотики, промышленные загрязнители, металлы, пестициды, лекарственные средства, природные загрязнители.

UDP-ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ: ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Уридиндифосфатгликозилтрансферазы (UDP-гликозилтрансферазы, UGTs, EC 2.4.) принадлежат к суперсемейству гликозилтрансфераз-1 (GT-1) [30, 40], относящихся к надсемейству GT-B. Надсемейство характеризуется высоко консервативной третичной структурой [41], состоящей из двух доменов $\beta/\alpha/\beta$ (укладка Россмана) [38]. Домены обращены друг к другу и гибко связаны с активным центром, расположенным на границе их раздела [42].

Реакция конъюгации, катализируемая ферментами семейства UGTs, следует механизму нуклеофильного замещения второго типа [1, 17]. Конъюгация осуществляется путем переноса углеводного остатка от UDP-гликозида (UDP-глюкуроновой кислоты, UDP-глюкозы, UDP-галактозы, UDP-ксилозы, UDP-N-ацетилглюкозамина [22]) к соответствующей функциональной группе гидрофобного агликона [15, 17, 20, 43–45] – -ОН-, -NH₂- [17, 38], -COOH- [12], -CO- [32], -SH- группы [17]. Установлено, что ферменты цитохром P450s и UGTs связаны между собой [27], поскольку метаболиты, вырабатываемые P450s, такие как фенолы и спирты, являются субстратами UGTs [46], как и бесчисленное множество структурно разнородных гидрофобных веществ [17], обладающих соответствующими функциональными группами. Продуктом реакции являются гликозиды [43]. Присутствие гидроксильных групп углеводного остатка и диссоциированная при физиологических значениях pH карбоксильная группа делают липофильное соединение более полярным [10, 17, 47], что повышает его способность проникать в водные внутри- и внеклеточные среды организма посредством анионных насосов [17, 31, 48], облегчая его транспортировку в органы выделения [31] с последующим удалением из организма [15, 27, 49–50].

Локализация. UGTs большинства животных (за исключением некоторых беспозвоночных) – это мембраносвязанные белки типа I [51–52]. Они локализованы в мембране гладкого эндоплазматического ретикулума (ER) [53–56], также некоторые изоформы могут быть обнаружены в ядерном компартменте [1, 27]. Синтезируются UGTs животных в виде предшественников, состоящих из

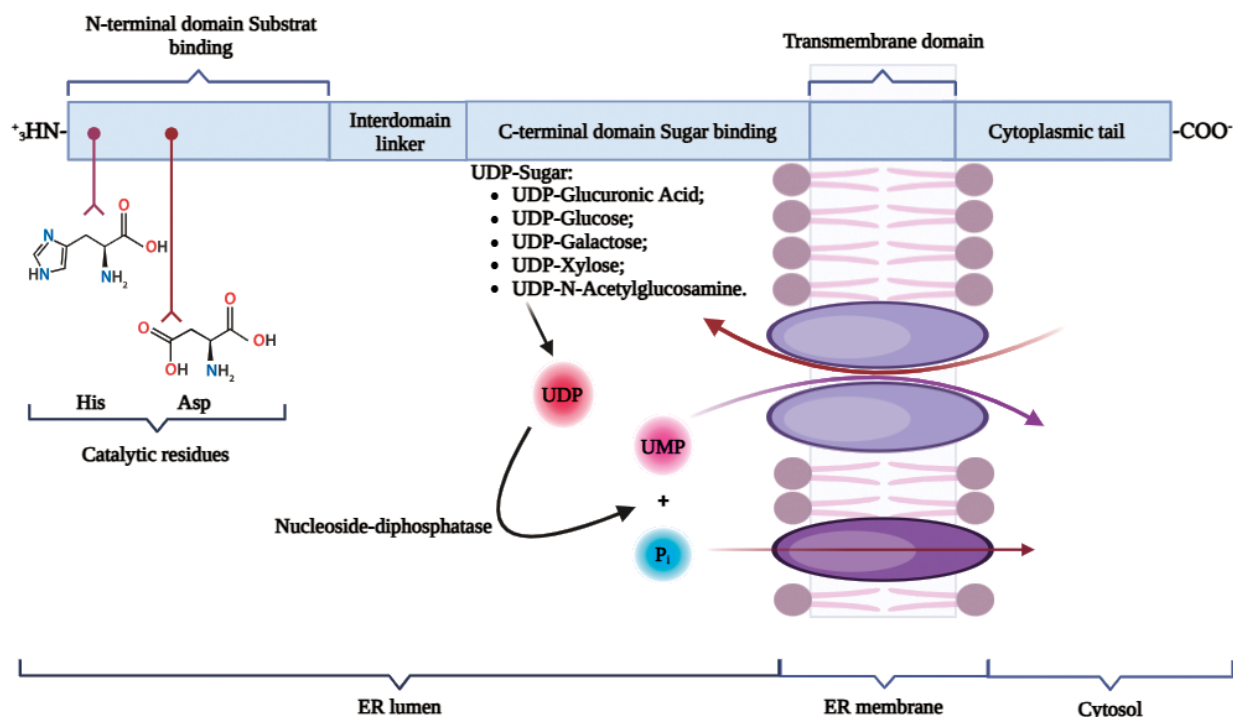


Рис. 1. Схематическое изображение общей структуры мембраносвязанной UDP-гликозилтрансферазы животных, катализирующей O-гликоуронидацию. Схема составлена на основе [56] и [60].
Примечание: ER – эндоплазматический ретикулум.

приблизительно 530 аминокислот, которые содержат аминоконцевой сигнальный пептид. Во время встраивания белка в мембрану сигнальный пептид расщепляется [1]. Однако существуют и растворимые изоферменты UGTs [38], которые лишены сигнального пептида [57] и трансмембранного домена [30], – бактериальные, растительные (например, *Oryza sativa* [58]), некоторых членистоногих (например, *Tetranychus urticae* [59]).

Белок UGT содержит два основных домена, известных как агликоновый или субстрат-связывающий домен, расположенный на N-конце, и сахар-связывающий домен на C-конце [21, 43, 61]. В принятой модели топологии большая часть мономера UGT локализована на люминальной стороне ER [11, 52], где происходит конъюгация [38], с единственной трансмембранной областью вблизи C-конца, за которой следует короткий цитоплазматический домен [18, 56] (рис. 1). Липофильные соединения обычно могут пассивно проникать через мембрану ER к активному центру фермента [1]. UDP-сахара, синтезирующиеся в цитозоле, транспортируются в просвет ER с помощью нуклеотидных сахарных транспортеров (NST) [60]. Транслокация образовавшихся гликозидов (гликоуронидов) в цитозольный домен опосредована переносчиками органических анионов [38]. Вторым продуктом реакции является UDP [1], кото-

рый гидролизуется нуклеозидифосфатазой до UMP и становится антипортовым партнером для соответствующих NST [55].

Механизм катализа на примере UDP-гликоуронилтрансферазы. Ферменты UGlcUAT используют разные каталитические механизмы O-гликоуронидации и N-гликоуронидации. O-гликоуронидация описывается как “механизм, подобный серингидролазе” [42], в реализации которого участвуют две ключевые аминокислоты – гистидин и аспарагиновая кислота (рис. 1). В этом механизме каталитический гистидин (расположенный в начале N-конца [38]) отрывает протон от -ОН агликона для нуклеофильной атаки на углерод C1 глюкуроновой кислоты в составе соответствующего UDP производного. Перенос протона на гистидин стабилизируется соседним аспаратом (“реле заряда”) [38, 42].

Большинство UGTs способны образовывать O-связанные глюкуроны, хотя и с разной эффективностью и скоростью [31]. Однако, например, UGT1A4 и 2B10 не имеют эквивалентного гистидина (замещенного пролином и лейцином соответственно) и имеют тенденцию катализировать N-гликоуронидацию [31, 38, 42]. N-гликоуронидация проходит по другому механизму, который не требует отрыва протонов от субстрата. В отсутствие депротонирования N-нуклеофилы могут образовывать заряженный вторичный амин в качестве пе-

реходного состояния, который представляет собой стабильную и легко достижимую структуру, в отличие от иона оксония, образующегося в ходе О-глюкуронидации [42]. Предполагается, что N-нуклеофилы приобретают формальный положительный заряд во время N-глюкуронидации и требуют отрицательно заряженного остатка аспарагиновой кислоты для стабилизации переходного состояния [38].

МЕЖВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ UGTs

UGTs повсеместно распространены во всех свободноживущих организмах [39]: микроорганизмах, грибах, растениях, животных [49, 61]. Огромное разнообразие UGTs дивергировалось у каждого вида в результате дупликации и потери генов [15]. К тому же альтернативный сплайсинг приводит к огромному молекулярному разнообразию ферментов UGTs [62].

Комитет по номенклатуре UGTs присвоил систематические названия семействам UGTs: семейства UGT1–50 предназначены для животных (1–8 – для позвоночных, 9–27 – нематод (*Caenorhabditis elegans* [59]), 31–50 – насекомых [30] или вирусов насекомых [59]); UGT51–70 – дрожжей и грибов; UGT71–100 – растений; UGT101–200 – бактерий [59] и 201 – прочих членистоногих (не насекомых) [30]. Однако существуют и дополнительные группы, зарезервированные для вновь открывающихся представителей суперсемейства. Обнаруженные в работе Ahn S.J. с соавт. [59] UGT *T. urticae* были отнесены к семи новым семействам, UGT201–207, что было одобрено Комитетом. На официальном сайте по номенклатуре UGT представлена общедоступная база данных [63], содержащая систематические названия отдельных UGTs и их последовательности, где можно предложить её изменение и/или дополнение. Последнее обновление базы данных осуществлялось 15.03.2024. Также в сравнении с человеком, характеристика отдельных UGTs и их функций у беспозвоночных и растений приведена в работе Vosk K.W. [30]. Автор уточняет, что список ферментов остается неполным, поскольку большинство UGTs у различных видов не были идентифицированы или плохо охарактеризованы, в частности ферменты представителей нематод, морских ежей и грибов.

Чтобы лучше понять видовую специфику суперсемейства UGTs, кратко охарактеризуем ферменты отдельных групп животных – позвоночных и беспозвоночных (на примере членистоногих).

Позвоночные. Идентифицированы нуклеотидные последовательности генов четырёх семейств ферментов UGTs (UGT1, UGT2, UGT3 и UGT8) млекопитающих [64–65], включая человека [30, 64, 66], кодирующих 22 изоформы белка [1, 64]. Семейства

UGT1 и UGT2 состоят из 9 [19, 67] и 10 изоформ [12, 14–15, 19, 55] соответственно и подразделены на три подсемейства UGT1A, 2A и 2B [17, 32, 54]. Изоферменты семейств UGT1 и UGT2 используют UDP-глюкуроновую кислоту в качестве предпочтительного донора сахара [55].

У человека *UGT1A* расположен на хромосоме 2q37 [11, 27–28, 68], занимает около 200 т.п.н. [38], имеет 13 различных экзонов [69], из которых 9 являются функциональными “первыми” экзонами (обозначаются как A1, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10) и четыре – “общими экзонами” (обозначаются как 2-5) [1, 70]. Посредством альтернативного сплайсинга первых экзонов с четырьмя общими экзонами образуются девять функциональных транскриптов (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 [1, 27, 34]), рассматриваемых как уникальные гены [38] и имеющих идентичные карбоксильные концы [71], но разные аминоконцевые домены [72]. Четыре альтернативных первых экзона локуса *UGT1* кодируют UGT1A2p, 1A11p, 1A12p, 1A13p [69] и содержат мутации, предотвращающие экспрессию активного белка, поэтому они обозначаются как псевдогены [1, 38, 68].

Генные продукты подсемейства *UGT2* транскрибируются из уникальных генов [72], состоящих из шести экзонов [28, 38]. Подобно изоферментам семейства UGT1, C-концевые домены UGT2 консервативны, тогда как сильно варьируемые N-концевые домены определяют субстратную специфичность ферментов [47]. У человека гены *UGT2* расположены на хромосомах 4q28 [28] и 4q13 [27, 73]. Семейство UGT2 далее делят на два подсемейства – UGT2A и UGT2B, которые содержат три (2A1, 2A2 и 2A3) и семь (2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28) членов [1, 34]. У подсемейства *UGT2B* идентифицировано пять псевдогенов – *UGT2B24P*, *2B25P*, *2B26P*, *2B27P*, *2B28P* [1]. Члены подсемейства *UGT2A* также называют псевдогенами, поскольку они не образуют функциональных белков [33]. Однако считается, что белки UGT2A1 и 2A2 конъюгируют пахучие соединения при устранении сигналов запаха в обонятельной системе [47], т. е. играют роль в терминации сигнала обоняния [17] и предотвращения десенсибилизации рецепторов [47]. Функция *2A3* действительно неясна, исследование Fay M.J. с соавт. [47] показывает, что, по крайней мере, у мышей, выращенных в виварии, этот ген не является необходимым для нормального развития и здоровья. Семейство UGT3 состоит из двух членов – 3A1 и 3A2 [16]. У человека гены *UGT3* расположены на участке хромосомы 5p13. Каждый ген этого семейства включает семь уникальных экзонов и кодирует 523 аминокислоты. На уровне белка гены *UGT3A1* и *UGT3A2* сходны на 80% [33]. Ферменты семейства UGT3, как правило, неактив-

ны при использовании UDP-глюкуроновой кислоты в качестве донора сахара [1]. Ферменты UGT3A1 преимущественно используют UDP-N-ацетилглюкозамин, а UGT3A2 – UDP-глюкозу [30] или UDP-ксилозу [55].

UGT8 состоит из одного гена, который содержит пять экзонов и расположен на хромосоме 4q26 [33]. UGT8A1 – это галактозоцерамидгалактозилтрансфераза, использующая UDP-галактозу в качестве донора сахара [1]. Она галактозилирует церамиды, входящие в состав миелиновых оболочек [30], игра-

ет важную роль в биосинтезе гликофинголипидов и сульфатидов [55].

Важной особенностью UGTs является то, что ферменты проявляют активность в отношении широкого спектра субстратов [15, 47] и сильно перекрывающуюся субстратную селективность [34, 42]. UGT1 и UGT2 играют более важную роль в метаболизме ксенобиотиков [74], чем UGT3 и UGT8 [65]. Подробнее некоторые субстраты (эндо- и ксенобиотики) различных изоформ UGTs млекопитающих представлены в табл. 1.

Таблица 1. Некоторые субстраты (эндо- и ксенобиотики) различных изоформ UGTs млекопитающих

Субстрат	Источник литературы
UGT1A1	
Билирубин, некоторые эстрогены, простые фенолы, кумарины, антрахиноны, флавоноиды, гетероциклические амины (PhIP), диоксины, орипавиновые опиоиды (бупренорфин), ацетаминофен, лоразепам, деферазирокс, этопозид, SN-38, белинонат, гидроксированный варфарин	26, 35, 42, 66, 68, 71–72, 75–76
UGT1A3	
Некоторые эстрогены, флавоноиды, кумарины, амины, антрахиноны, гетероциклические амины (PhIP), моноэфиры фталатов, антидепрессанты (амитриптилин, кломипрамин, имипрамин), морфин, нестероидные противовоспалительные препараты (ибупрофен, флубипрофен, диклофенак), бензодиазепины (мидазолам, лоразепам, оксазепам), ацетаминофен, деферазирокс	42, 53, 66, 71–72, 77
UGT1A4	
Андрогены, прогестины, амины (N-оксид сенеционина, PhIP), монотерпеноидные спирты, сапогенины, антипсихотические и антидепрессивные препараты (циклобензаприн, миртазапин, клозапин)	66, 71–72, 78
UGT1A6	
Серотонин, небольшие простые фенолы (4-этилфенол, 4-нитрофенол, 1-нафтол, 4-метилумбеллиферон, парацетамол, 2-нафтиламин, N-гидрокси-2-нафтиламин), гетероциклические амины (PhIP), производные ВаР, ацетаминофен, лоразепам, деферазирокс, менадиол, олтипраз	42, 46, 52, 66, 71, 79, 80
UGT1A7	
Объемные планарные фенолы, производные ВаР, моноэфиры фталатов, гетероциклические амины (PhIP), ацетаминофен, лоразепам, деферазирокс, менадиол, пропофол, олтипраз	46, 52–53, 66, 69, 71, 80
UGT1A8	
Флавоноиды (апигенин, нарингенин), амины (4-аминобифенил, PhIP), моноэфиры фталатов, менадиол, пропофол, гидроксированный варфарин	26, 53, 69, 71–72, 80
UGT1A9	
Эстрогены, гормоны щитовидной железы, антрахиноны, флавоноиды, объёмные фенолы, некоторые алифатические спирты, гетероциклические амины (PhIP), производные ВаР, моноэфиры фталатов, нестероидные противовоспалительные препараты, ацетаминофен, SN-38, менадиол, гидроксированный варфарин	26, 52–53, 69, 71–72, 79–80
UGT1A10	
Объемные планарные фенолы, микофеноловая кислота, флавоноиды, полициклические ароматические углеводороды (ВаР), гетероциклические амины (PhIP), моноэфиры фталатов, иммунодепрессивные средства, антипсихотические, антидепрессивные препараты (циклобензаприн, миртазапин, клозапин), противогрибковые, химиотерапевтические средства (флуконазол, мидазолам, иматиниб), ацетаминофен, лоразепам, деферазирокс, менадиол, пропофол, гидроксированный варфарин	26, 42, 52–53, 66, 69, 71–72, 74, 80

Окончание таблицы 1.

Субстрат	Источник литературы
UGT2A1	
Андрогены, эстрогены, фенолы, лекарственные препараты, полициклические ароматические углеводороды	31, 81
UGT2A2	
фенолы	31
UGT2B1	
Эстрогены, морфин	14, 20
UGT2B4	
Желчные кислоты, стероиды, фенолы, моноэфиры фталатов, дезоксиниваленол	13, 25, 31, 53, 64
UGT2B7	
4-трет октилфенол, моноэфиры фталатов, дезоксиниваленол	53, 54, 64
UGT2B15	
Стероиды, 4-трет октилфенол	25, 54
UGT2B17	
Стероиды	25
UGT8A1	
Желчные кислоты, церамиды	30, 55

Примечание: 2-амино-1-метил-6-фенилмедазо[4,5-b]пиридин – PhIP; бензо[a]пирен – BaP.

Содержание и распределение изоферментов UGTs в отдельных органах различаются, что предполагает ткане-специфичную регуляцию экспрессии генов [17]. На функции и экспрессию генов большинства изоформ UGTs влияют генетические (этническая принадлежность, генетический полиморфизм [36]), физиологические факторы (возраст, диета, наличие заболеваний, гормональные факторы [36]) и факторы окружающей среды [53–54] (индукция/ингибирование ксенобиотиками [36]). Высокий уровень экспрессии генов *UGT* характерен для тканей и органов, наиболее уязвимых для контакта с ксенобиотиками и гормонами [17], т. е. печени, кишечника, почек [32, 25, 54], легких, желудочно-кишечного тракта, яичников [27], молочных желез и предстательной железы [17]. Также сообщалось, что отдельные *UGTs* экспрессируются в мозге [77]. При этом каждая ткань содержит свой собственный набор *UGTs* [82]. Печень обладает наибольшим содержанием и числом ферментов *UGTs*. Все члены семейств *UGT1* и *UGT2* экспрессируются в печени человека за исключением *1A5*, *1A7*, *1A8*, *1A10* и *2A1* [1]. Белки *UGT2B* присутствуют в печени в более высоких концентрациях, чем *UGT1A* [1, 17]. Экспрессия *UGT3* в печени практически не определяется [1]. Внепечёночное распределение активностей некоторых изоформ *UGTs* у человека представлено в табл. 2.

Хотя изоформы *UGT* различаются у разных видов, было идентифицировано несколько межвидовых гомологов. У человека и крысы есть несколько ортологичных *UGTs*, включая *1A1*, *1A3*, *1A6* и *1A10* [84]. Также известно, что организм крысы обладает большей способностью к глюкуронидации, чем организм человека [84]. Saengtienchai A. с соавт. [85] обнаружили, что у белобрюхих ежей *Ateles albigentris* ароматический углеводород пирен метаболизировался в основном до пирен-1-глюкуронида и около 80% глюкуронидных конъюгатов выводилось с мочой, аналогично тому, как это происходит у человека и копытных. Однако эффективность реакции *UGT*-зависимой глюкуронидации 1-гидроксипирена (оцененная по соотношению V_{max}/K_m) в микросомах печени ежа была значительно ниже по сравнению аналогичной реакцией в присутствии микросом печени крысы.

Ферменты семейств *UGT1* и *UGT2* также существуют у позвоночных, не относящихся к млекопитающим [30]. Например, в исследовании Saengtienchai A. с соавт. [86] показаны межвидовые различия ферментов у птиц и млекопитающих. В экспериментах *in vivo* глюкуроновые конъюгаты пирена после его скармливания были обнаружены в экскрементах птиц в большем количестве, чем в экскрементах крыс, а в экспериментах *in vitro* соотношение V_{max}/K_m *UGlcUAT*-активности для микросом печени птиц было ниже, чем для микро-

Таблица 2. Распределение некоторых изоформ UGTs во внепечёночных тканях человека

Изоформа	Орган	Источник литературы
UGT1A1	Желудок	1
UGT1A5	Почки, толстый кишечник	1, 71
UGT1A6	Желудок, кишечник, почки, яички, головной мозг, лёгкие	1, 14, 52
UGT1A7	Почки, ротовая полость, пищевод, желудок, поджелудочная железа, тонкая, ободочная кишки	1, 52–53, 67
UGT1A8	Тонкая, толстая, тощая, подвздошная, ободочная кишки	53, 72
UGT1A9	Почки, тонкий, толстый кишечник	1, 17, 53, 71
UGT1A10	Все внепеченочные ткани желудочно-кишечного тракта, воздухопроводящие тракты, легкие	1, 17, 70, 83
UGT2A1	Обонятельный эпителий, легкие, трахея, миндалины, гортань, головной мозг, толстая кишка	14, 47, 81
UGT2A2	Обонятельный эпителий, головной мозг	14, 47
UGT2B7	Почки, кишечник	17, 32
UGT2B15	Желудок	17
UGT2B17	Желудок, почки, кишечник	16, 17, 32
UGT3	Тимус, яички, почки, желудочно-кишечный тракт (на очень низком уровне)	1
UGT8	Головной мозг	33

сом печени крыс. Гены *UGT1* и *UGT2* у рыб, как и у млекопитающих, организованы в варибельные и постоянные участки [30]. В частности, экзонная структура гена *UGT1* камбалы сходна с генами семейства *UGT1A* млекопитающих (включает пять экзонов с соединениями в идентичных положениях) [40]. Поэтому UGTs рыб могут выполнять сходные функции в детоксикации ксенобиотиков и обладать сходными свойствами, например, введение радужной форели фунгицида прохлораза приводило к ингибированию глюкуронидации 1-нафтола в микросомах [12]. Кроме того, рыбки Данио-рерио (*Danio rerio*) и некоторые другие костистые рыбы содержат семейство генов *UGT5*, состоящее из одного экзона [62], и по-видимому, участвующие в глюкуронидации стероидов. UGT5 также обнаружены у лягушек *Xenopus*, но не у ящериц, птиц и млекопитающих [30].

Беспозвоночные членистоногие. В отличие от UGTs человека, данные ферменты членистоногих изучены слабо [57]. У насекомых гликозилирование малых липофильных соединений рассматривалось как второстепенный механизм ферментативной детоксикации вторичных метаболитов растений [61, 39]. UGTs насекомых представляют собой суперсемейство, подобное их аналогу у млекопитающих [49]. Известно, что UGTs насекомых, как и у позвоночных, связаны с эндоплазматической сетью сходным образом [39]. Биохимические исследования показали, что у насекомых в качестве основного донора сахара в реакции гликозилирования по-

средством UGTs обычно выступает UDP-глюкоза [87–88].

Ферментативная активность UGTs обнаруживается в жировом теле, средней кишке и других тканях насекомых [39]. У насекомых реакция конъюгация глюкозы характерна для различных физиологических процессов, включая образование кутикулы (склеротизацию) [87], обоняние, эндобиотическую модуляцию и секвестрацию [39], пигментацию, защиту от ультрафиолетового излучения [49] и выведение пахучих веществ и ксенобиотиков [44]. Например, многие эндогенные соединения, такие как экидистероидные гормоны и предшественники дубления кутикулы, гликозилируются ферментами UGTs [39]. Детоксицирующие ферменты насекомых обычно имеют широкий спектр субстратов. Они могут метаболизировать не только эндометаболиты насекомых и вторичные метаболиты растений, но и инсектициды [49]. Экспрессия генов, кодирующих UGTs, увеличивается у насекомых с сформированной инсектицидной устойчивостью или под воздействием инсектицидов [89], способствуя усилению метаболической детоксикации. В этом может заключаться один из механизмов формирования резистентности к различным группам инсектицидов, включая карбаматы, фосфорорганические соединения (темефос) [90], неоникотиноиды (имidakлоприд [91], тиаметоксам [92]), авермектины (абамектин [23]), рианоиды (хлорантранилипрол [10, 44]), кето-енольные инсектициды (спиротетрамат [92]), сульфоксимины (сульфоксафлор [43, 91, 93]) у ряда видов насе-

комых, таких как *Plutella xylostella*, *Diaphorina citri*, *Aphis gossypii* [43], *Bemisia tabaci*, *Bactrocera dorsalis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Tetranychus cinnabarinus* [61], *Tuta absoluta*, *Musca domestica* [87], *Heliothis virescens* [44].

Более 300 предполагаемых генов *UGTs* были идентифицированы у хлопкового червя *Helicoverpa armigera*, шелкопряда *Bombyx mori* и некоторых других насекомых [44, 61]. У разных видов насекомых количество генов, кодирующих *UGTs*, значительно варьируется. Например, идентифицировано 5 генов *UGTs* у постельного клопа *Cimex lectularius*, 106 генов *UGTs* у стеклокрылого снайпера *Homalodisca vitripennis*. Примечательно, что даже разные виды насекомых в пределах одного рода могут демонстрировать заметное разнообразие по количеству генов *UGT*: в роде *Drosophila* от 29 *UGT*-генов у *Drosophila elegans*, *D. pseudoobscura* и *D. mojavensis* и до 50 у *D. takahashii*. Некоторые гены семейства *UGT* насекомых демонстрируют признаки экспансии генов вследствие последовательной тандемной дупликации [88].

У паутинового клеща *Tetranychus urticae* были идентифицированы в геноме 80 *UGT* [59], классифицированных в семь отдельных семейств (*UGT201–207*). Ahn S.J. с соавт. [59] описали геномное распределение, интрон-экзонную структуру и структурные мотивы *UGTs* у *T. urticae*. Экспансия генов была зарегистрирована для подсемейств *UGT201A*, *UGT201B* и *UGT202A* [57]. В своей работе Agriaza R.H. с соавт. [41] дали структурную и функциональную характеристику *UGT202A2* у *T. urticae*.

Интересно, что *UGT*-гены *T. urticae*, весьма вероятно, были приобретены от бактерий посредством горизонтального переноса генов [59]. Как следствие, подобно бактериальным *UGTs*, ферменты *T. urticae* не содержат сигнального пептида и трансмембранного домена, что указывает на то, что они являются цитозольными белками [57].

Расширенный поиск *UGT*-генов у других видов паукообразных (подсемейство хелицеровых), включая паука (*Parasteatoda tepidariorum*), скорпиона (*Mesobuthus martensii*), четырёх видов клещей (*Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus microplus*, *Metaseiulus occidentalis*, *Varroa destructor*), не выявил генов *UGTs* [59]. Однако клещ *Panonychus citri*, многоножки подсемейства *Myriapoda*, водяные блохи и раки (подсемейство *Crustacea*) содержали в своих геномах гены *UGT*, сходные с генами насекомых. Это позволило предположить, что семейство генов *UGTs* могло быть утрачено на ранней стадии развития хелицеровых и впоследствии вновь приобретено у тетрапидных клещей [59].

Таким образом, *UDP*-гликозилтрансферазы представляют собой сложное и до конца не изученное суперсемейство ферментов биотрансформации. Наиболее полно изучены *UGTs* млекопитающих, в частности человека и крысы, в силу критической роли данных ферментов в обеспечении гомеостаза и метаболизме лекарственных средств. В меньшей степени охарактеризованы ферменты семейства *UGTs* у беспозвоночных. Сведения о некоторых характеристиках *UGTs*, приведенные в данном разделе, сведены в таблицу 3. У позвоночных

Таблица 3. Сравнение некоторых характеристик *UGTs* позвоночных и беспозвоночных (на примере членистоногих) животных

Группа животных	Позвоночные	Беспозвоночные	
		Насекомые	Прочие членистоногие (не насекомые)
Номенклатура	UGT1-UGT8	UGT31–UGT50, UGT301-UGT500	UGT201–UGT300
Предпочтительный донор гексозных групп	Преимущественно <i>UDP</i> -глюкуроновая кислота	<i>UDP</i> -глюкоза	
Субстратная специфичность	Гидрофобные вещества с соответствующей функциональной группой (-OH-, -NH ₂ -, -COOH-, -CO-, -SH-)		
Ткани	Головной мозг, обонятельный эпителий, лёгкие, тимус, яички, печень, почки, желудочно-кишечный тракт	Жировое тело, средняя кишка, кутикула, дыхательные пути и др. ткани	
Локализация в клетке	Мембраносвязанные		Цитозольные
Основные функции	Биотрансформация эндогенных и ксенобиотических веществ		

и некоторых групп членистоногих (например, у насекомых) UGTs являются мембранносвязанными белками, вместе с тем у отдельных групп беспозвоночных (например, клещей *T. urticae*) описаны цитозольные формы данных ферментов. Отличительная черта UGTs млекопитающих заключается в использовании отдельными подсемействами UDP-глюкуроновой кислоты в качестве донора сахара для образования конъюгатов с ксенобиотиками, тогда как ферменты других подсемейств осуществляют реакции конъюгации эндогенных метаболитов с использованием иных UDP-сахаров. У членистоногих UGTs в процессе биотрансформации ксенобиотиков взаимодействуют, как правило, с UDP-глюкозой. Роль UGTs у большинства организмов заключается в конъюгации липофильных соединений (гормонов, гормоноподобных веществ, разного рода ксенобиотиков и др.), что способствует прекращению их биологического действия, поэтому UGT-активность обнаруживается в тканях, наиболее подверженных контактам с данными соединениями (органы пищеварения, выделения, воздухоносные пути, покровы и т.д.).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ UGTS

С РАЗЛИЧНЫМИ КСЕНОБИОТИКАМИ

Промышленные загрязнители. Исследования *in vivo* на крысах показали негативное воздействие 4-трет октилфенола (4-tOP) на репродуктивную систему самок. Он в основном метаболизируется до глюкуронида печеночными UGT2B7, 2B15 как у людей, так и у крыс [54]. N-гидроксипроизводные известных канцерогенов ариламинов (2-нафтиламин, 4-аминобифенил) являются лучшими субстратами для UGT1A6, чем свободные амины, что, возможно, защищает от них печень [52].

Существует некоторое количество работ о влиянии полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), таких как бензо[а]пирен (BaP) на UGlcUAT животных. Например, было продемонстрировано, что UGT1A10 является наиболее активной изоформой UGlcUAT в процессе глюкуроноидации различных ПАУ [70]. Также известно, что изоформы 1A7 и 1A9 крысы и человека обезвреживают BaP-7,8-дигидродиол [52], а изоформа 1A6 эффективна в детоксикации фенолов, хинонов и хинолов BaP [74]. В частности, в микросомах печени крысы BaP-3,6-дифенол легко превращается в моно- и диглюкурониды с помощью 1A6. Изофермент UGT1A6 человека образует только моноглюкурониды, которые, однако, могут быть преобразованы в диглюкурониды с помощью 1A9 [52].

Диоксины – это стойкие органические загрязнители, образующиеся в основном в результате промышленных процессов, таких как сжигание

отходов, производство хлорфенолов и др. Показано, что *in vivo* воздействие 2,3,7,8-тетрахлордифенилдioxина (компонент “оранжевого реагента”, Agent Orange) на людей (в исследовании участвовало 100 жителей Вьетнама) увеличивало экспрессию UGT1A1, приводя к повышению содержания фермента в плазме крови по сравнению с контролем [68].

Воздействие печеночным токсином четыреххлористым углеродом (CCl₄), вызывающим как острую, так и хроническую печеночную недостаточность, показало, что острое повреждение печени, вызванное однократным введением CCl₄, приводило к снижению экспрессии мРНК UGT1A1, 1A6, 2B1, 2B2, 2B3, 2B6, 2B12 у крыс. Также у крыс с хроническим CCl₄-индуцированным фиброзом печени были отмечены повышение уровней мРНК UGT1A1, 1A6, 2B1, 2B2 и снижение UGT2B3, 2B6 и 2B12. Во время как у крыс с циррозом печени, вызванным CCl₄, выявлялось снижение мРНК UGT2B3, 2B6 и 2B12 и увеличение мРНК 2B2 [65].

Метаболизм эфиров фталевой кислоты, широко используемых в пластмассах [53, 94], состоит из двух стадий [13]. У млекопитающих в ходе I фазы [94] ди-(2-этилгексил)-фталат (DEHP) в основном гидролизуется до моно-(2-этилгексил)-фталата (MEHP) эстеразами и липазами в печени и в тонком кишечнике [53]. Интересно, что MEHP обладает большей биологической активностью и токсичностью [94], чем DEHP, в отношении репродуктивной системы и развития организма [53]. У человека и грызунов далее MEHP способен метаболизироваться при помощи UGlcUAT [13, 94]. Например, у человека MEHP метаболизируется в печени посредством UGT1A3, 1A9, 2B4 и/или 2B7, а в кишечнике – 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 и/или 2B7. В опытах *in vivo* установлено, что в форме глюкуронида экскреция MEHP с мочой составляет > 85% от применяемой дозы DEHP [53].

Некоторые соединения могут взаимодействовать с UGTs как ингибиторы или активаторы. Например, обнаружено, что эфиры фталевой кислоты не оказывают существенного ингибирующего действия на активности UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A10, 2B15 и 2B17, оказывают ограниченное ингибирование на 1A6, 1A7, 2B4 и в значительной степени ингибируют UGT1A9 [13]. В другом исследовании *in vivo* обнаружено, что MEHP является специфическим ингибитором UGT1A7 человека [94]. Также имеются сведения, что *in vivo* бисфенол А (BPA, 4,4'-изопропилидендифенол) ингибирует активность глюкуронирования генистеина как в микросомах печени человека (HLM), так и в микросомах печени крысы (RLM). Причём тип ингибирования различен для HLM и RLM. В частности, BPA индуцирует неконкурентное ингибирование в HLM и конкурентное

ингибирование в RLM. Авторы предполагают, что одним из возможных объяснений является различие изоформ UGlcUATs, ответственных за метаболизм генистеина у разных видов. Первичными UGlcUATs человека, участвующими в глюкуронидации генистеина, являются печеночные UGT1A1, 1A6 и 1A9, а также внепеченочные 1A10 и 2B17. Что касается ВРА, то у крыс преобладающей изоформой UGlcUAT является 2B1 [47] (гомолог 2B7 и 2B17 человека [84]), однако у человека основным является 2B15 [47, 84]. В свою очередь Fay M.J. с соавт. [47] на линии мышей, гомозиготной по целевой делеции семейства *UGT2* продемонстрировали, что ферменты UGT1 генерируют большую долю конъюгатов ВРА *in vivo*. Предположение авторов состояло в том, что *UGT1A9* крысы (ортолог человеческому 1A9) функционален у мышей (в отличие от крыс), поэтому он вносит большой вклад в глюкуронидацию ВРА у мышей, чем у крыс.

Металлы. Существует некоторое количество работ о влиянии металлов на USTs различных организмов. Например, при воздействии наноразмерного коллоидного серебра отмечалось специфическое повышение активности UGT в печени крыс-самцов линии Wistar по сравнению с контролем, причем данный эффект являлся значимым при дозе 10 мг на 1 кг массы тела [95]. Al-Namadani M.Y.I. с соавт. [4] в своем исследовании не обнаружили значительного изменения активности UGT1A1 у взрослых самцов крыс-альбиносов линии Wistar при воздействии наночастиц золота *in vivo*.

Ртуть является высокотоксичным металлом. Результаты определения уровня экспрессии генов *Ugt1AB* в тканях кишечника рыб *Danio rerio* после воздействия 30 мкг/л неорганической ртути показали значительное повышение уровня экспрессии по сравнению с контролем во все временные отрезки исследования (6, 12, 24, 48 и 72 ч после воздействия). Интересно, что ген, кодирующий UGT5G1, также продемонстрировал значительное повышение экспрессии во все временные точки, за исключением 12 ч после воздействия [96]. Другим высокотоксичным металлом является хром (Cr), который обладает нейротоксичностью, канцерогенностью, генотоксичностью, репродуктивной токсичностью в отношении живых организмов. В ответ на воздействие хромом у тихоокеанской белой креветки *Litopenaeus vannamei* методом секвенирования транскриптома было выявлено активирование ферментов II фазы, включая UGTs [51].

На клетках HepG2 человека *in vitro* было показано, что воздействие ацетата свинца (Pb) в высоких концентрациях (от 1 до 10 мг/л) вызывало значительное снижение экспрессии мРНК ферментов фазы II, включая UGT1A6 [97]. В эксперименте Xu X. с соавт. [98] на *Carassius auratus* воздействие

свинца в малых концентрациях (0,5 мг/л) в течение 28 дней практически не оказывало влияния на активность UGT в печени золотой рыбки. При повышении же содержания Pb в среде (до 10,0 мг/л) отмечалось снижение активности UGlcUAT. Авторы также исследовали синергетический эффект различных комбинаций Pb и гербицида-параквата (PQ) на активность UGT у *C. auratus*. Результаты показали значительное снижение UGT-активности при увеличении концентрации в смесях (10,0 мг/л Pb и PQ) и длительности воздействия (в течение 28 дней). Интересно, что на 14 день эксперимента наблюдалось индуцирование активности UGT комбинацией 0,5 мг/л Pb+1,0 мг/л PQ по сравнению с контролем. К тому же авторы отмечали, что совместное подавление активности UGT было сильнее, чем при индивидуальном воздействии высокими концентрациями Pb или PQ в течение 14 дней. Таким образом можно предположить, что ферменты UGTs потенциально помогают нивелировать неблагоприятные последствия воздействия металлов у разных видов животных.

Пестициды. Известно, что ряд пестицидных химикатов при попадании в организм животных метаболизируются с участием UGTs [23, 43, 45, 49, 90–93, 98–101]. Например, Mahboob M., Siddiqui M.K. [100] продемонстрировали, что на 90-й день воздействия фосфоротионата наблюдается дозозависимое повышение UGT-активности в почках самцов белых крыс линии Wistar. Однако, в тканях головного мозга и легких подобных изменений обнаружено не было при всех дозах воздействия (0.014, 0.028, 0.042 мг кг⁻¹ день⁻¹). Интересно, что через 28 дней после отмены препарата наблюдалось восстановление активности UGT до контрольного уровня.

При воздействии парахвата уровень активности фермента UGT снижался в печени *C. auratus* [98]. Воздействие гербицидов тербутилазина и тербутрина также снижало активность UGT в печени радужной форели *Oncorhynchus mykiss* по сравнению с контролем. Однако наблюдался существенный синергетический эффект под влиянием температурного воздействия. У рыб, подвергшихся воздействию тербутилазина, эффект снижения ферментативной активности наблюдался при всех температурных режимах (4, 10, 17°C), хотя наиболее выражен был при 4°C. У рыб, подвергшихся воздействию тербутрина, значительный эффект наблюдался только при температуре воды 17°C [101].

Роль UGTs позвоночных животных во II фазе детоксикации широко изучена, их вклад в устойчивость членистоногих к пестицидам менее известен. У наездников *Meteorus pulchricornis* (Wesmael) гены *UGT* индуцируются обработкой сублетальными дозами фокса, циперметрина, хлорфенапи-

ра [45]. После воздействия сублетальных концентраций карбарила, дельгаметрина, фоксима (LC_{50} , LC_{10} и LC_{20}) активность UGT у комаров-звонцов *Chironomus kiiensis* значительно увеличивалась в течение 24 часов. В частности, при обработке насекомых низкими концентрациями (LC_5) карбарила, дельгаметрина и фоксима активность была наибольшей и превышала контроль в 1,29, 1,19 и 1,21 раза соответственно. Также при исследовании *CkUGT302M1*, *302N1*, *308N1* и *36J1* у личинок *C. kiiensis* 4-го возраста было показано изменение уровней транскрипции данных генов после воздействия сублетальных доз пестицидов в течение 24 часов [99].

В популяциях комаров *Aedes*, устойчивых к пиретроиду и темефосу, неоднократно отмечали увеличение экспрессии генов UGT [90]. Связь сверхэкспрессии UGT с резистентностью к имидаклоприду и абамектину описана у *L. decemlineata* и *T. cinnabarinus* соответственно [23]. Например, устойчивость к абамектину резистентной культуры *T. cinnabarinus* была связана со сверхэкспрессией UGT201D3 [21]. Уровни экспрессии UGT352A4 и UGT352A5 были значительно повышены у особей резистентной к тиаметоксаму популяции *B. tabaci* (THQR) по сравнению с чувствительными особями (THQS). Более того, эксперимент по индукции показал, что экспрессия UGT352A4 и UGT352A5 у представителей популяции THQR была значительно повышена после воздействия тиаметоксама [92].

Транскриптомный анализ умеренно и чрезвычайно устойчивой к хлорантранилипролу популяций *T. absoluta* показал, что резистентность связана с заметной сверхэкспрессией UGT34A23 (от 20 до > 100 раз) [102]. В исследовании Li X. с соавт. [49] воздействие на особей *P. xylostella* спиносадом, тебуфенозидом, хлорантранилипролом и хлорфенапиром (LC_{50}) вызывало индукцию экспрессии UGT33A44, изоформа UGT45B1 индуцировалась абамектином, Сту1Ac, фоксимом, бета-циперметрином, метафлумизоном и индоксакарбом, а UGT40V1 – индоксакарбом, хлорфенапиром, абамектином, метафлумизоном, Сту1Ac, фоксимом и бета-циперметрином. В результате синергетического анализа при помощи специфических ингибиторов UGTs (сульфинпиразон, 5-нитроурацил) отмечалось повышение токсичности хлорантранилипрола в отношении личинок *P. xylostella* третьего возраста. При исследовании транскриптов UGT обнаружено, что только для UGT2B17 была характерна сверхэкспрессия (30,7–77,3 раз) в четырёх популяциях *P. xylostella*, устойчивых к хлорантранилипролу (CHR), по сравнению с восприимчивой линией (CHS). Нокдаун UGT2B17 с помощью РНК-интерференции (RNAi) резко повышал токсичность хлорантранилипрола на 27,4% и 29,8%

у особей популяций CHS и CHR соответственно [44]. Также известно, что устойчивость к данному инсектициду у *P. xylostella* связана с сверхэкспрессией UGT33A44 [10].

Посредством синергетического анализа с использованием специфических ингибиторов установлено, что UGT344M играет важную роль в инактивации и выведении спиротетрамата у *A. gossypii* [10]. Также на примере *A. gossypii* показано, что сверхэкспрессия UGT344C5 и UGT344A11 способствует устойчивости к сульфоксафлору. Однако авторы указывают, что данный факт не может служить однозначным доказательством участия UGTs в метаболизме сульфоксафлора [93]. Исследование Рум А. с соавт. [91] выявило, что активность UGT344P2 была выше у особей всех устойчивых к сульфаклору популяций *Myzus persicae* (Sulzer) по сравнению с чувствительными популяциями. Wang L. с соавт. [43] также посредством синергетического анализа с применением специфических ингибиторов UGTs выявили значительное повышение токсичности сульфоксафлора в отношении устойчивых к сульфоксафлору *A. gossypii* (Sul-R), тогда как подобный эффект не наблюдался у восприимчивых к данному инсектициду особей *A. gossypii* (Sus). Также авторы наблюдали достоверное повышение активности UGTs в 1,35 раза у особей Sul-R относительно активности у насекомых популяции Sus. Кроме того, был выявлен о повышенный уровень экспрессии генов UGT350A2, 351A4, 350B2, 342C2 и 343C2 (в 1,40–5,46 раза) у особей популяции Sul-R. Нокдаун указанных генов с помощью РНК-интерференции значительно повышал чувствительность (в 1,57–1,76 раза) к сульфоксафлору особей данной устойчивой популяции (Sul-R) [43].

Лекарственные средства. Менадион (2-метил-1,4-нафтохин) представляет собой синтетическую токсичную форму витамина К. Обнаружено, что ферменты UGT1A6, 1A7, 1A8, 1A9 и 1A10 катализируют глюкуронидацию менадиола (восстановленная форма менадиона), причём UGT1A6 и 1A10 катализируют глюкуронидацию с гораздо более высокой скоростью. Также в исследовании отмечалось, что микросомы печени человека продуцировали 1- и 4-менадиолглюкурониды в соотношении 3,1:1, в то время как микросомы тощей кишки преимущественно продуцировали 4-менадиолглюкуронид (1:2) [80].

Как упоминалось выше, глюкуронидация в некоторых случаях может активировать метаболиты, как в случае с морфином [27]. Одновременная экспрессия UGT2B21 и 2B22 у морской свинки усиливает катализируемую 2B21 морфин-6-глюкуронидацию [103]. Однако Miyauchi Y. с соавт. [18] определили, что фермент UGT2B1 у мышей не обладает каталитической активностью по отношению

к морфину, несмотря на то что он является ортологом фермента 2B1 крысы, который вносит основной вклад в глюкуронидацию морфина в печени крыс. Также интересно, что мышинный 2B1 может катализировать глюкуронидацию морфина путем гетероолигомеризации с 1A1.

Ферменты UGTs играют важную роль в возникновении лекарственной устойчивости при некоторых видах рака [19]. Отмечается различная экспрессия генов, кодирующих данные ферменты, в здоровой и опухолевой тканях [17]. В частности, повышение уровня транскрипционного фактора Gli1, связанного с глиомой, может приводить к повышению уровня экспрессии семейства *UGT1A* в раковых клетках, глюкуронизации рибавирина, цитарабина и устойчивости раковых клеток к данным препаратам [19]. Эруцин и фенэтилизотиоцианат являются мощными индукторами активности UGTs при инкубации с кусочками печени крысы. Аналогичная повышающая регуляция отмечалась, когда срезы печени крыс инкубировали со смесью мирозиназы и глюкорафазатина [46]. Олтиприз также способен индуцировать *UGT1A6* и *1A7* [104].

Известно, что изоформы UGTs высоко полиморфны [25]. Ген *UGT1A1* содержит полиморфизм промотора [16] – ТА-повтор (тимин-адениновый повтор) [70], ответственный за снижение ферментативной активности. В настоящее время зарегистрировано около 135 генетических вариантов *UGT1A1*, наиболее распространенным из которых является *UGT1A1*28* с семью ТА-повторами в промоторной области ТАТА-бокса. Иринотекан (Camptosar, СРТ11) [27] и его активный метаболит SN-38 [32, 42] являются противораковыми препаратами [27, 42] для лечения колоректального рака и рака легких [105]. В печени UGT1A1 образует SN-38-глюкуронид (SN-38G), который может безвредно проходить через кишечник [35]. Наличие *UGT1A1*28* приводит к снижению экскреции метаболитов иринотекана, из-за их накопления в крови происходит развитие тяжелой диареи и нейтропении 4 степени [16, 27]. В работе Vandyopadhyay A. с соавт. [105] продемонстрировано, что полиморфизм *UGT1A1*6*, возможно, влияет на повышение желудочно-кишечной токсичности и улучшение общей выживаемости среди пациентов Северной Индии с мелкоклеточным раком легких, получающих химиотерапию на основе иринотекана.

Изоформы UGT1A7, 1A8 и 1A10 конъюгируют пропифол во внепеченочных органах (почки, кишечник) человека, в печени он катализируется только UGT1A9 [106]. В исследовании Takahashi H. с соавт. [69] были проанализированы полиморфизмы D256N и Y483D гена *UGT1A9* у 100 здоровых взрослых японских добровольцев *in vitro*. Эффективность фермента составляла 19,1% и 57,1% от

дикого типа в случае D256N и Y483D полиморфизма соответственно. Авторы пришли к заключению, что замены D256N и Y483D снижают активность UGT1A9 в отношении пропифола, при этом снижение активности фермента при D256N было больше, чем при Y483D.

Имеется довольно много работ по исследованию модулирующего действия лекарственных препаратов в отношении активности UGTs [26, 76, 107–108]. Sun H. с соавт. [26] продемонстрировали, что варфарин является модификатором глюкуронидации *in vitro*. Множество ферментов UGTs (UGT1A1, 1A3, 1A7, 1A9, 2B7 и 2B17) имеют два сайта связывания с субстратом – каталитический и аллостерический. Связывание варфарина с аллостерическим участком может ингибировать реакцию 1A1, 2B7 и 2B17, активировать 1A3 или и то, и другое в отношении 1A7 и 1A9. В работе Wang X. с соавт. [76] белинонат проявлял широкий спектр ингибирующих действий в отношении UGTs, в частности, неконкурентное ингибирование в отношении UGT1A3 и слабое ингибирование в отношении 1A1, 1A7, 1A8, 2B4 и 2B7. Показано, что опиоид является ингибитором UGTs широкого спектра действия – препарат проявляет мощное ингибирование в отношении UGT1A1, 1A7, 1A8, 1A9 и 1A10, при этом диапазон значений константы ингибирования K_i составлял 1,31–10,58 мкМ [108]. Ибрутиниб также оказывал широкое ингибирующее действие на большинство UGTs, включая мощное конкурентное ингибирование UGT1A1 (K_i 0,90±0,03 мкМ), неконкурентное ингибирование 1A3 и 1A7 (K_i 0,88±0,03 мкМ и 2,52±0,23 мкМ, соответственно) [107].

Природные соединения. Дезоксиниваленол (DON), трихотецен типа В и сесквитерпентиол кулморин (CUL) являются микотоксинами Fusarium. DON выводится с мочой в виде двух разных глюкуронидных конъюгатов: DON-3-глюкуронид (DON-3-GlcA) и DON-15-глюкуронид (DON-15-GlcA), последний идентифицирован как доминирующий изомер у человека. UGT2B4 преимущественно образует DON-15-GlcA, тогда как UGT2B7 преимущественно катализирует образование DON-3-GlcA. Woelflinseder L. с соавт. [64] обнаружили, что в бесклеточных условиях CUL в эквимолярном (67 мкМ) или в пятикратном избытке подавлял реакцию глюкуронирования DON микросомами печени человека, уменьшая образование DON-15-GlcA на 15% и 50%, а DON-3-GlcA на 30% и 50% соответственно. Кроме того, авторы наблюдали образование CUL-11-GlcA, впервые идентифицированного *in vitro* и *in vivo* в образцах мочи поросят и человека.

Флавоноиды содержатся во фруктах, овощах, напитках растительного происхождения (чай, красное вино), а также во многих пищевых добавках или растительных лекарствах [109]. Отмечено

участие ферментов UGT1A1, UGT1A3, UGT1A10 в гликозилировании некоторых флавоноидов [42]. Обнаружено, что прополис, артишок и силимарин являются активаторами транскрипции *UGT1A* и ферментативной активности в клетках KYSE70 [110]. Niura Y. с соавт. [109] отметили, что байкалеин и 3-гидроксифлаван индуцируют экспрессию мРНК и продукцию белка, а также повышают ферментативную и транскрипционную активность UGT1A1. Необаваизофлаван (NBIF), выделенный из семян *Psoralea corylifolia* L., также может активировать UGT1A1 человека как в кишечных, так и в печеночных клеточных линиях, причем индуктивный эффект NBIF в клетках HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы) был более выражен, чем в клетках Caco-2 (клетки карциномы кишечника), как на уровне транскрипции, так и на уровне активности фермента [111]. UGT1A8 катализирует конъюгацию апигенина и нарингенина [72].

Известно, что полиметоксифлавоны (5-деметилнобилетин (5-DMNB), группа фитохимических веществ) предотвращают канцерогенез, связанный с воспалением. В исследовании Chou Y.C. с соавт. [112] показано, что 5-DMNB значительно увеличивал экспрессию мРНК ферментов фазы II, включая UGTs, у мышей ICR, получавших комбинацию BaP и декстрансульфата натрия, которая индуцирует канцерогенез толстой кишки. Авторы пришли к выводу, что 5-DMNB может эффективно усиливать способность к детоксикации BaP.

Эвгенол – фенол, обладающий антиоксидантным, противовоспалительным действием, и как показали недавние исследования, способный подавлять пролиферацию раковых клеток меланомы. Iwano H. с соавт. [20] наблюдали индукцию экспрессии *UGT1A6*, *1A7* и *2B1* в печени крыс (Sprague-Dawley) после введения эвгенола.

Многие растения-хозяева накапливают фитотоксины, такие как никотин, от которых насекомые вынуждены защищаться. Например, у персиковой тли *Myzus persicae nicotianae* (выращенной на табаке) отмечали высокие уровни экспрессии нескольких *UGT* – *330A3*, *344D5*, *348A3* и *349A3*, что свидетельствует о возможном участии данных изоформ в детоксикации никотина или его первичных метаболитов у *M. persicae* [23]. В работе Sakamoto M. с соавт. [77] было продемонстрировано, что никотин (3.0 мг/кг) регулировал уровни экспрессии мРНК человеческого *UGT1A3* и мышинового *UGT2B* в мозге гуманизированных мышей (hUGT1). С помощью “парацетамолового теста” обнаружено, что глюкуронирование умеренно усиливалось у пациентов, получавших индукторы типа фенобарбитала (фенитоин, рифампицин) и у заядлых курильщиков [52, 79].

Гетероциклический амин, 2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5-*b*]пиридин (PhIP), наиболее распространенный и содержащийся в хорошо прожаренном мясе [71], вызывает опухоли молочной железы, толстой кишки и предстательной железы у крыс и лимфомы у мышей. Результаты исследований Malfatti M.A. с соавт. [71, 113] указывают на то, что фермент UGT1A1 играет важную роль в биотрансформации PhIP и проявляет наивысшую специфичность к N-гидрокси-PhIP. Все остальные белки UGT1A, за исключением UGT1A6, также способны глюкуронировать N-гидрокси-PhIP, но со значительно меньшими скоростями. На основе образования N-гидрокси-PhIP-глюкуронида авторы предположили относительное ранжирование способности UGT1A конъюгировать N-гидрокси-PhIP: UGT1A1 > UGT1A4 > UGT1A8, UGT1A3 > UGT1A9 > UGT1A10 > UGT1A7 >> UGT1A6.

Фермент UGT1A4 катализирует N-глюкуронирование пирролизидиновых алкалоидов и их третичных аминов у человека, однако у мышей *UGT1A4* является псевдогеном. Например, показано, что токсичность, вызванная воздействием N-оксида сенеционина, снижалась у гуманизированных мышей линии hUGT1A4 по отношению к мышам дикого типа (конъюгат N-глюкуронирования был обнаружен только у мышей hUGT1A4). Также у мышей hUGT1A4 отмечался заметно повышенный клиренс N-оксида сенеционина и сенеционина и, соответственно, меньшее образование пиррол-белковых аддуктов по сравнению с контролем [78].

Природные лекарственные средства могут оказывать ингибирующий эффект на UGTs. Например, атазанавир, гекогенин и нифлуминовая кислота являются мощными специфическими ингибиторами UGT1A1, 1A4 и 1A9 соответственно [37]. При исследовании на микросомах печени человека было обнаружено, что госсипол неконкурентно умеренно ингибировал эстрадиол-3-О-глюкуронирование, опосредованное UGT1A1 [16]. Насекомые, по-видимому, способны метаболизировать госсипол при помощи UGTs. Kreml C. с соавт. [56] обнаружили три моногликозилированных и пять дигликозилированных изомера госсипола в кале личинок *H. armigera* и *H. virescens*, которых кормили с добавлением госсипола. В ходе ферментативных анализов было показано, что UGT41B3 и UGT40D1 способны гликозилировать госсипол, главным образом, до дигликозилированного изомера госсипола 5, который характерен для *H. armigera* и отсутствует в фекалиях *H. virescens*.

Примеры, приведенные в данном разделе и в таблице 4, демонстрируют, что эффект одного и того же соединения-ксенобиотика на ферментативную активность UGTs или уровень экспрессии кодиру-

Таблица 4. Примеры влияния ксенобиотиков на активность и уровень экспрессии генов UGTs позвоночных и беспозвоночных животных

Животные	Ксенобиотики	Экспрессия гена		Активность фермента	
		Повышение	Снижение	Активация	Ингибирование
Позвоночные	Промышленные загрязнители	диоксины (2,3,7,8-тетрахлордibenзодиоксин) / UGT1A1 (человек)	—	—	эферы фталевой кислоты (моно-(2-этилгексил)-фталата) / UGT1A9, UGT1A6, UGT1A7, UGT2B4 (человек)
		четырёххлористый углерод (<i>in vivo</i> хронически) / UGT1A1, 1A6, 2B1, 2B2 (крысы)	четырёххлористый углерод (<i>in vivo</i> однократно) / UGT1A1, 1A6, 2B1 (крысы)	—	бисфенол А (4,4'-изопропилидендифенол) / отдельные изоформы UGT1 и UGT2 в зависимости от вида
	Металлы	ртуть / UGT1AВ, UGT5G1 (кишечник рыб)	свинец (<i>in vitro</i>) / UGT1A6 (в клетках HepG2 человека)	серебро (наночастицы) / общая UGT-активность (в печени крыс)	свинец (<i>in vivo</i>) / UGlcUAT (в печени рыб)
		хром / UGTs (креветки)	—	—	—
	Пестициды	—	—	ФОС / общая UGT-активность (в почках крыс)	гербициды (паракват, тербутилазин, тербутрин) / общая UGT-активность (в печени рыб)
	Лекарственные средства	олтиприз / UGT1A6, UGT1A7	—	варфарин / UGT1A3, UGT1A7, UGT1A9	варфарин / UGT1A1, UGT2B7, UGT2B17, UGT1A7, UGT1A9
		—	—	—	белинонат / UGT1A3, UGT1A1, UGT1A7, UGT1A8, UGT2B4, UGT2B7
		—	—	—	опикапон / UGT1A1, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10
	Природные соединения	флавоноиды (байкалеин, 3-гидроксифлаван, необаваизофлаван, 5-деметилнобилетин, эвгенол) / UGT1A1, UGT1A6, UGT1A7, UGT2B1	—	флавоноиды (необаваизофлаван) / UGT1A1 (клетки карциномы)	микотоксины (кулморин, <i>in vitro</i>) / UGT2B4, UGT2B7 (микросомы печени человека)
		—	—	—	госсипол (<i>in vitro</i>) / UGT1A1 (печень человека)

Окончание таблицы 4.

Животные	Ксенобиотики	Экспрессия гена		Активность фермента	
		Повышение	Снижение	Активация	Ингибирование
Беспозвоночные	Пестициды	инсектициды (циперметрин, хлорфенапир, имидаклоприд, абамектин, тиаметоксам и другие) / UGT302M1, 302N1, 308N1, UGT201D3, UGT352A4, UGT352A5, UGT34A23, UGT33AA4, UGT45B1, UGT40V1 и другие (насекомые)	—	инсектициды (карбарил, дельтаметрин, фоксим) / общая UGT-активность (насекомые)	—
	Природные соединения	никотин / UGT330A3, UGT344D5, UGT348A3, UGT349A3 (насекомые)	—	—	—

ющих генов у позвоночных может быть специфичным по отношению к разным изоферментам и может отличаться в зависимости от типа воздействия (острое/хроническое) и вида животного. Примеры, касающиеся беспозвоночных животных (а именно, насекомых), свидетельствуют об однонаправленном изменении ферментативной активности и уровня экспрессии генов UGTs как при остром, так и при хроническом воздействии инсектицидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

UDP-гликозилтрансферазы (UGTs) образуют сложное и многочисленное суперсемейство детоксицирующих ферментов. Наличие общего аминокислотного мотива в структуре белка, отвечающего за связывание UDP, отличает суперсемейство UGTs от прочих гликозилирующих ферментов. Реакция конъюгации, катализируемая UGTs, является довольно важной не только для метаболизма эндогенных соединений, но и дезактивации ксенобиотических загрязнителей окружающей среды, лекарственных средств и природных токсинов. Нарушение процесса гликозилирования может привести к увеличению деструктивного потенциала многих ксенобиотиков, а также изменению фармакокинетических свойств лекарственных средств.

Существует множество исследований по выявлению роли UGTs в метаболизме соединений различного генезиса у многих групп организмов (животных, растений, бактерий), из которых млекопитающие в целом и человек в частности являются наиболее изученной группой. Интерес к данной группе ферментов человека обусловлен их ролью в

метаболизме лекарственных препаратов и участием в развитии лекарственной устойчивости раковых клеток. Исследования UGTs насекомых сосредоточены в основном на взаимосвязи генетического полиморфизма и особенностей регуляции экспрессии генов с устойчивостью насекомых к пестицидам. В данном обзоре продемонстрировано разнообразие изоформ ферментов позвоночных и беспозвоночных и их широкая субстратная специфичность, что обусловлено большим числом кодирующих генов и вариативностью белковых продуктов в результате альтернативного сплайсинга. Наличие подсемейств ферментов UGTs, специализирующихся на разных группах субстратов и способных использовать UDP-производные широкого спектра углеводов, увеличивает возможности организма животных с точки зрения защиты от воздействия ксенобиотиков. Однако точная роль в метаболизме ксенобиотиков отдельных семейств и подсемейств UGTs по-прежнему не установлена, что подчёркивает важность дальнейшего изучения данного вопроса.

ВКЛАД АВТОРОВ

К. А. Г. — подбор литературы, написание, оформление текста; С. Е. А. — концепция публикации, конечное редактирование текста.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной энтомологии и арахнологии ТюмНЦ СО РАН в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FWRZ-2022-0022).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья носит обзорный характер и не содержит исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(6): 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019>
2. Hu B, Zhang S-H, Ren M-M, Tian X-R, Wei Q, Mburu DK, Su J-Y (2017) The expression of *Spodoptera exigua* P450 and UGT genes: tissue specificity and response to insecticides. *Insect Science* 26(2): 199–216. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12538>
3. Palli SR (2020) CncC/Maf-mediated xenobiotic response pathway in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 104(2): e21674. <https://doi.org/10.1002/arch.21674>
4. Al-Hamadani MYI, Alzahrani AM, Yousef MI, Kamel MA, El-Sayed WM (2020) Gold Nanoparticles Perturb Drug-Metabolizing Enzymes and Antioxidants in the Livers of Male Rats: Potential Impact on Drug Interactions. *Int J Nanomedicine* 15: 5005–5016. <https://doi.org/10.2147/IJN.S248194>
5. Lu K, Song Y, Zeng R (2021) The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. *Curr Opin Insect Sci* 43: 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.004>
6. Fernando HSD., Saavedra-Rodriguez K, Perera R, Black WC4th, De Silva BGDNK (2020) Resistance to commonly used insecticides and underlying mechanisms of resistance in *Aedes aegypti* (L.) from Sri Lanka. *Parasit Vectors* 10;13(1):407. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04284-y>
7. Bo H, Miaomiao R, Jianfeng F, Sufang H, Xia W, Elzaki MEA, Chris B, Palli SR, Jianya S (2020) Xenobiotic transcription factors CncC and maf regulate expression of CYP321A16 and CYP332A1 that mediate chlorpyrifos resistance in *Spodoptera exigua*. *J Hazard Mater* 398:122971. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122971>
8. Faucon F, Gaude T, Dusfour I, Navratil V, Corbel V, Juntarajumnong W, Girod R, Poupardin R, Boyer F, Reynaud S, David JP (2017) In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. *PLoS Negl Trop Dis* 11(4):e0005526. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005526>
9. Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP (2013) Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol* 43(4): 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.00>
10. Pan Y, Wen S, Chen X, Gao X, Zeng X, Liu X, Tian F, Shang Q (2020) UDP-glycosyltransferases contribute to spirotetramat resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pestic Biochem Physiol* 166:104565. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104565>
11. Rouleau M, Tourancheau A, Girard-Bock C, Villeneuve L, Vaucher J, Duperré AM, Audet-Delage Y, Gilbert I, Popa I, Droit A, Guillemette C (2016) Divergent Expression and Metabolic Functions of Human Glucuronosyltransferases through Alternative Splicing. *Cell Rep* 17(1): 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.077>
12. Grancharov K, Naydenova Z, Lozeva S, Golovinsky E (2001) Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol Ther* 89(2): 171–186. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(00\)00109-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(00)00109-1)
13. Cao YF, Du Z, Zhu ZT, Sun HZ, Fu ZW, Yang K, Liu YZ, Hu CM, Dong PP, Gonzalez FJ, Fang ZZ (2017) Inhibitory effects of fifteen phthalate esters in human cDNA-expressed UDP-glucuronosyltransferase supersomes. *Chemosphere* 185: 983–990. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.105>
14. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y (2005) Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 6(2): 91–99. <https://doi.org/10.2174/1389200053586064>
15. Kondo M, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Kawai YK, Ishizuka M (2022) Duplication, Loss, and Evolutionary Features of Specific UDP-Glucuronosyltransferase Genes in Carnivora (Mammalia, Laurasiatheria). *Animals (Basel)* 12(21):2954. <https://doi.org/10.3390/ani12212954>
16. Lv X, Xia Y, Finel M, Wu J, Ge G, Yang L (2019) Recent progress and challenges in screening and characterization of UGT1A1 inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 9(2): 258–278. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.09.005>
17. Mróz A, Mazerska Z (2015) Glukuronidacja leków przeciwnowotworowych – detoksyfikacja, mechanizm oporności czy sposób na formę proleku? [Glucuronidation of antitumour therapeutics – detoxification, mechanism of resistance or prodrug formation?]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 69: 1462–1477.
18. Miyauchi Y, Kurita A, Yamashita R, Takamatsu T, Ikushiro S, Mackenzie PI, Tanaka Y, Ishii Y (2020) Hetero-oligomer formation of mouse UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2b1 and 1a1 results in the gain of glucuronidation activity towards morphine, an activity which is absent in homo-oligomers of either UGT. *Biochem Biophys Res Commun* 525(2): 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.075>
19. Osborne MJ, Coutinho de Oliveira L, Volpon L, Borden KLB (2018) Backbone assignment of the apo-form of the human C-terminal domain of UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A). *Biomol NMR Assign* 12(2): 315–318. <https://doi.org/10.1007/s12104-018-9830-7>
20. Iwano H, Ujita W, Nishikawa M, Ishii S, Inoue H, Yokota H (2014) Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver. *Int J Food Sci Nutr* 65(2): 241–244. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.845650>

21. Wang M, Liu X, Shi L, Liu J, Shen G, Zhang P, Lu W, He L (2018) Functional analysis of UGT201D3 associated with abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Insect Sci* 27(2): 276–291. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12637>
22. Meech R, Miners JO, Lewis BC, Mackenzie PI (2012) The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacol Ther* 134(2): 200–218. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.009>
23. Pan Y, Xu P, Zeng X, Liu X, Shang Q (2019) Characterization of UDP-Glucuronosyltransferases and the Potential Contribution to Nicotine Tolerance in *Myzus persicae*. *Int J Mol Sci* 20(15):3637. <https://doi.org/10.3390/ijms20153637>
24. Hooft JM, Lou Y, Squires EJ, Cant JP, Bureau DP (2021) Development of a microplate method for the determination of hepatic UDP-glucuronosyltransferase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 248:109114. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109114>
25. Kasteel EEJ, Darney K, Kramer NI, Dorne JLCM, Lautz LS (2020) Human variability in isoform-specific UDP-glucuronosyltransferases: markers of acute and chronic exposure, polymorphisms and uncertainty factors. *Arch Toxicol* 94(8): 2637–2661. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02765-8>
26. Sun H, Zhang T, Wu Z, Wu B (2015) Warfarin is an effective modifier of multiple UDP-glucuronosyltransferase enzymes: evaluation of its potential to alter the pharmacokinetics of zidovudine. *J Pharm Sci* 104(1): 244–256. <https://doi.org/10.1002/jps.24250>
27. Kaur G, Gupta SK, Singh P, Ali V, Kumar V, Verma M (2020) Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer. *Clin Transl Oncol* 22(10): 1667–1680. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02325-7>
28. Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP, Ehmer U (2008) Family I uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Arch Toxicol* 82(7): 415–433. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0314-x>
29. Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129(1–2): 171–193. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00198-8](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00198-8)
30. Bock KW (2016) The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochem Pharmacol* 99: 11–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001>
31. Tukey RH, Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 581–616. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581>
32. Lv X, Zhang JB, Hou J, Dou TY, Ge GB, Hu WZ, Yang L (2019) Chemical Probes for Human UDP-Glucuronosyltransferases: A Comprehensive Review. *Biotechnol J* 14(1): e1800002. <https://doi.org/10.1002/biot.201800002>
33. Mehboob H, Tahir IM, Iqbal T, Akhter N, Munir N, Riaz M (2017) Genetic Polymorphism of UDP-Glucuronosyltransferase. *Genetic Polymorphism* 13(8): 159–183. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69206>
34. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI (2002) Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 181–182: 453–456. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00449-3](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00449-3)
35. Collins SL, Patterson AD (2020) The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharm Sin B* 10(1): 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.001>
36. Knights KM, Rowland A, Miners JO (2013) Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). *Br J Clin Pharmacol* 76(4): 587–602. <https://doi.org/10.1111/bcp.12086>
37. Liu D, Zhang L, Duan LX, Wu JJ, Hu M, Liu ZQ, Wang CY (2019) Potential of herb-drug / herb interactions between substrates and inhibitors of UGTs derived from herbal medicines. *Pharmacol Res* 150:104510. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104510>
38. Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M (2011) First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci* 100(9): 3655–3681. <https://doi.org/10.1002/jps.22568>
39. Ahn SJ, Vogel H, Heckel DG (2012) Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 42(2): 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.11.006>
40. Leaver MJ, Wright J, Hodgson P, Boukouvala E, George SG (2007) Piscine UDP-glucuronosyltransferase 1B. *Aquat Toxicol* 84(3): 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.015>
41. Arriaza RH, Abiskaroon B, Patel M, Daneshian L, Kluza A, Snoeck S, Watkins MB, Hopkins JB, Van Leeuwen T, Grbic M, Grbic V, Borowski T, Chruszcz M (2023) Structural and functional studies reveal the molecular basis of substrate promiscuity of a glycosyltransferase originating from a major agricultural pest. *J Biol Chem* 299(12):105421. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105421>
42. Dong D, Ako R, Hu M, Wu B (2012) Understanding substrate selectivity of human UDP-glucuronosyltransferases through QSAR modeling and analysis of homologous enzymes. *Xenobiotica* 42(8): 808–820. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.663515>
43. Wang L, Zhu J, Cui L, Wang Q, Huang W, Yang Q, Ji X, Rui C (2021) Overexpression of Multiple UDP-Glycosyltransferase Genes Involved in Sulfoxaflor Resistance in *Aphis gossypii* Glover. *J Agric Food Chem* 69(17): 5198–5205. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00638>

44. Li X, Zhu B, Gao X, Liang P (2017) Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Manag Sci* 73(7): 1402–1409. <https://doi.org/10.1002/ps.4469>
45. Yan MW, Xing XR, Wu FA, Wang J, Sheng S (2021) UDP-glycosyltransferases contribute to the tolerance of parasitoid wasps towards insecticides. *Pestic Biochem Physiol* 179:104967. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104967>
46. Abdull Razis AF, Konsue N, Ioannides C (2018) Isothiocyanates and Xenobiotic Detoxification. *Mol Nutr Food Res* 62(18): e1700916. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700916>
47. Fay MJ, Nguyen MT, Snouwaert JN, Dye R, Grant DJ, Bodnar WM, Koller BH (2015) Xenobiotic Metabolism in Mice Lacking the UDP-Glucuronosyltransferase 2 Family. *Drug Metab Dispos* 43(12): 1838–1846. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.065482>
48. Flynn AF, Joyce MG, Taylor RT, Bennuru S, Lindrose AR, Sterling SL, Morris CP, Nutman TB, Mitre E (2019) Intestinal UDP-glucuronosyltransferase as a potential target for the treatment and prevention of lymphatic filariasis. *PLoS Negl Trop Dis* 13(9): e0007687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007687>
49. Li X, Shi H, Gao X, Liang P (2018) Characterization of UDP-glucuronosyltransferase genes and their possible roles in multi-insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Manag Sci* 74(3): 695–704. <https://doi.org/10.1002/ps.4765>
50. Zhou QH, Qin WW, Finel M, He QQ, Tu DZ, Wang CR, Ge GB (2021) A broad-spectrum substrate for the human UDP-glucuronosyltransferases and its use for investigating glucuronidation inhibitors. *Int J Biol Macromol* 180: 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.073>
51. Jiao L, Dai T, Cao T, Jin M, Sun P, Zhou Q (2020) New insight into the molecular basis of chromium exposure of *Litopenaeus vannamei* by transcriptome analysis. *Mar Pollut Bull* 160:111673. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111673>
52. Bock KW, Köhle C (2005) UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol* 400: 57–75. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00004-2)
53. Hanioka N, Kinashi Y, Tanaka-Kagawa T, Isobe T, Jinno H (2017) Glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate in humans: roles of hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases. *Arch Toxicol* 91(2): 689–698. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1708-9>
54. Isobe T, Ohkawara S, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Hanioka N (2017) Hepatic glucuronidation of 4-tert-octylphenol in humans: inter-individual variability and responsible UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Arch Toxicol* 91(11): 3543–3550. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1982-1>
55. Walia G, Smith AD, Riches Z, Collier AC, Coughtrie MWH (2018) The effects of UDP-sugars, UDP and Mg²⁺ on uridine diphosphate glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes. *Xenobiotica* 48(9): 882–890. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1376260>
56. Krempl C, Sporer T, Reichelt M, Ahn SJ, Heidel-Fischer H, Vogel H, Heckel DG, Joußen N (2016) Potential detoxification of gossypol by UDP-glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. *Insect Biochem Mol Biol* 71: 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.02.005>
57. Snoeck S, Pavlidi N, Pipini D, Vontas J, Dermauw W, Van Leeuwen T (2019) Substrate specificity and promiscuity of horizontally transferred UDP-glycosyltransferases in the generalist herbivore *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem Mol Biol* 109: 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.010>
58. Wetterhorn KM, Gabardi K, Michlmayr H, Malachova A, Busman M, McCormick SP, Berthiller F, Adam G, Rayment I (2017) Determinants and Expansion of Specificity in a Trichothecene UDP-Glucosyltransferase from *Oryza sativa*. *Biochemistry* 56(50): 6585–6596. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01007>
59. Ahn SJ, Dermauw W, Wybouw N, Heckel DG, Van Leeuwen T (2014) Bacterial origin of a diverse family of UDP-glycosyltransferase genes in the *Tetranychus urticae* genome. *Insect Biochem Mol Biol* 50: 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.04.003>
60. Handford M, Rodriguez-Furlán C, Orellana A (2006) Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles in vivo. *Braz J Med Biol Res* 39(9): 1149–1158. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000900002>
61. Yang Z, Xiao T, Lu K (2023) Contribution of UDP-glycosyltransferases to chlorpyrifos resistance in *Nilaparvata lugens*. *Pestic Biochem Physiol* 190:105321. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105321>
62. Wang Y, Huang H, Wu Q (2014) Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases. *Mol Pharmacol* 86(1): 62–75. <https://doi.org/10.1124/mol.113.091462>
63. Официальный сайт Комитет по номенклатуре UGTs при Вашингтонском Государственном Университете – URL: <https://labs.wsu.edu/ugt/> (дата обращения: 25.05.2024).
64. Woelflingseder L, Warth B, Vierheilig I, Schwartz-Zimmermann H, Hametner C, Nagl V, Novak B, Šarkanj B, Berthiller F, Adam G, Marko D (2019) The Fusarium metabolite culmorin suppresses the in vitro glucuronidation of deoxynivalenol. *Arch Toxicol* 93(6): 1729–1743. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02459-w>
65. Xu L, Zheng R, Xie P, Guo Q, Ji H, Li T (2020) Dysregulation of UDP-glucuronosyltransferases in CCl₄ induced liver injury rats. *Chem Biol Interact* 325:109115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109115>
66. Robin S, Hassine KB, Muthukumaran J, Jurkovic Mlakar S, Krajcinovic M, Nava T, Uppugunduri CRS, Ansari M (2022) A potential implication of UDP-glucuronosyltransferase 2B10 in the detoxification of drugs used in pediatric hematopoietic stem cell transplantation setting: an in silico investigation. *BMC Mol Cell Biol* 23(1):5. <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00402-5>

67. Weismüller TJ, Zhou T, Kalthoff S, Lenzen H, Manns MP, Strassburg CP (2020) Genetic variants of UDP-glucuronosyltransferase 1A genes are associated with disease presentation and outcome in primary sclerosing cholangitis. *Liver Int* 40(7): 1645–1654. <https://doi.org/10.1111/liv.14487>
68. Van Quang H, Vuong NB, Trang BNL, Toan NL, Van Tong H (2024) Association of UGT1A1 gene variants, expression levels, and enzyme concentrations with 2,3,7,8-TCDD exposure in individuals exposed to Agent Orange/Dioxin. *Sci Rep* 14(1):3315. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54004-0>
69. Takahashi H, Maruo Y, Mori A, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y (2008) Effect of D256N and Y483D on propofol glucuronidation by human uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase (UGT1A9). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(2): 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00247.x>
70. Dellinger RW, Fang J-L, Chen G, Weinberg R, Lazarus P (2006) Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 (UGT1A10) in the detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: decreased glucuronidative activity of the ugt1a10139lys isoform. *Drug Metabolism and Disposition* 34(6): 943–949. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.009100>
71. Malfatti MA, Felton JS (2004) Human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the primary enzyme responsible for the N-glucuronidation of N-hydroxy-PhIP in vitro. *Chem Res Toxicol* 17(8): 1137–1144. <https://doi.org/10.1021/tx049898m>
72. Cheng Z, Radomska-Pandya A, Tephly TR (1998) Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch Biochem Biophys* 356(2): 301–305. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0781>
73. Tourancheau A, Margaihan G, Rouleau M, Gilbert I, Villedeneuve L, Lévesque E, Droit A, Guillemette C (2016) Unravelling the transcriptomic landscape of the major phase II UDP-glucuronosyltransferase drug metabolizing pathway using targeted RNA sequencing. *Pharmacogenomics J* 16(1): 60–70. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.20>
74. Begas E, Tsioutsouliti A, Kouvaras E, Haroutounian SA, Kasiotis KM, Kouretas D, Asproдини E (2017) Effects of peppermint tea consumption on the activities of CYP1A2, CYP2A6, Xanthine Oxidase, N-acetyltransferase-2 and UDP-glucuronosyltransferases-1A1/1A6 in healthy volunteers. *Food Chem Toxicol* 100: 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.021>
75. Roco A, Lavanderos A, Cayún JP, Acevedo C, Celedón C, Rubilar JC, Sandoval C, Cerpa L, García-Martín E, Agúndez JA, Esguevillas G, Amo G, Canepa A, Cerda B, Peña K, Cáceres DD, Varela NM, Quiñones LA (2019) The role of phase I and II genetic polymorphisms, smoking, alcohol and cancer family history, in the risk of developing testicular cancer. *Pharmacogenet Genomics* 29(7): 159–166. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000379>
76. Wang X, Wang Z, Wang Z, Chen X, Yin H, Jiang L, Cao J, Liu Y (2021) Inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme by belinostat: Implications for drug-drug interactions. *Toxicol Lett* 338: 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.12.001>
77. Sakamoto M, Itoh T, Tukey RH, Fujiwara R (2015) Nicotine regulates the expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) in humanized UGT1 mouse brain. *Drug Metab Pharmacokinet* 30(4): 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.04.004>
78. Chen Y, Tang Y, Liu P, Wang J, Wang W, Wang C, Ding L, Xiong A, Yang L, Wang Z (2023) Species difference in toxicokinetics and safety assessment of senecionine N-oxide in a UDP-glucuronosyltransferase 1A4 humanized mouse model. *Chem Biol Interact* 380:110505. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110505>
79. Bock KW, Bock-Hennig BS (2010) UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor-inducible UGT1A6 to coordinate regulation of subsets of CYPs, UGTs, and ABC transporters by nuclear receptors. *Drug Metab Rev* 42(1): 6–13. <https://doi.org/10.3109/03602530903205492>
80. Nishiyama T, Ohnuma T, Inoue Y, Kishi T, Ogura K, Hiratsuka A (2008) UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation. *Biochem Biophys Res Commun* 371(2): 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.040>
81. Bushey RT, Lazarus P (2012) Identification and functional characterization of a novel UDP-glucuronosyltransferase 2A1 splice variant: potential importance in tobacco-related cancer susceptibility. *J Pharmacol Exp Ther* 343(3): 712–724. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.198770>
82. Yueh MF, Mellon PL, Tukey RH (2011) Inhibition of human UGT2B7 gene expression in transgenic mice by the constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 79(6): 1053–1060. <https://doi.org/10.1124/mol.110.070649>
83. Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP (2004) Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* 39(4): 970–977. <https://doi.org/10.1002/hep.20131>
84. Coughlin JL, Thomas PE, Buckley B (2012) Inhibition of genistein glucuronidation by bisphenol A in human and rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 40(3): 481–485. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042366>
85. Saengtienchai A, Ikenaka Y, Bortey-Sam N, Jermnark U, Mizukawa H, Kawai YK, Nakayama SMM, Ishizuka M (2016) The African hedgehog (*Atelerix albiventris*): Low phase I and phase II metabolism activities. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 190: 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.005>
86. Saengtienchai A, Ikenaka Y, Kawata M, Kawai Y, Takeda K, Kondo M, Bortey-Sam N, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M (2018) Comparison of xenobiotic metabolism in phase I oxidation and phase II conjugation between rats and bird species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 214: 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.08.007>
87. Al-Yazeedi T, Muhammad A, Irving H, Ahn SJ, Hearn J, Wondji CS (2024) Overexpression and nonsynonymous mutations of UDP-glycosyltransferases are potentially associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*. *Genomics* 116(2):110798. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2024.110798>

88. Wang H, Song J, Hunt BJ, Zuo K, Zhou H, Hayward A, Li B, Xiao Y, Geng X, Bass C, Zhou S (2024) UDP-glycosyltransferases act as key determinants of host plant range in generalist and specialist Spodoptera species. *Proc Natl Acad Sci USA* 121(19): e2402045121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2402045121>
89. Yang Z, Deng M, Wang W, Xiao T, Peng H, Huang Z, Lu K (2024) Characterization and functional analysis of UDP-glycosyltransferases reveal their contribution to phytochemical flavone tolerance in *Spodoptera litura*. *Int J Biol Macromol* 261(Pt1):129745. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129745>
90. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I, Raghavendra K, Pinto J, Corbel V, David JP, Weetman D (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7): e0005625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>
91. Pym A, Umina PA, Reidy-Crofts J, Troczka BJ, Matthews A, Gardner J, Hunt BJ, van Rooyen AR, Edwards OR, Bass C (2022) Overexpression of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 enzymes confers resistance to sulfoxaflo in field populations of the aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem Mol Biol* 143:103743. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103743>
92. Du T, Fu B, Wei X, Yin C, Yang J, Huang M, Liang J, Gong P, Liu S, Xue H, Hu J, Diao Y, Gui L, Yang X, Zhang Y (2021) Knockdown of UGT352A5 decreases the thiamethoxam resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Gennadius). *Int J Biol Macromol* 186: 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.040>
93. Ma K, Tang Q, Liang P, Li J, Gao X (2021) UDP-Glycosyltransferases from the UGT344 Family Are Involved in Sulfoxaflo Resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Insects* 16;12(4):356. <https://doi.org/10.3390/insects12040356>
94. Du Z, Cao YF, Li SN, Hu CM, Fu ZW, Huang CT, Sun XY, Liu YZ, Yang K, Fang ZZ (2018) Inhibition of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) by phthalate monoesters. *Chemosphere* 197: 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.010>
95. Gmshinsky IV, Shipelin VA, Vorozhko IV, Sentsova TB, Soto SKh, Avren'eva LI, Guseva GV, Kravchenko LV, Khotimchenko SA, Tutelyan VA (2016) [Toxicological evaluation of colloidal nano-sized silver stabilized polyvinylpyrrolidone. III. Enzymological, biochemical markers, state of antioxidant defense system]. *Vopr Pitan* 85(2): 14–23.
96. Zhang QL, Dong ZX, Luo ZW, Zhang M, Deng XY, Guo J, Wang F, Lin LB (2020) The impact of mercury on the genome-wide transcription profile of zebrafish intestine. *J Hazard Mater* 389:121842. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121842>
97. Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama SM, Mizukawa H, Ishizuka M (2016) Constitutive Effects of Lead on Aryl Hydrocarbon Receptor Gene Battery and Protection by β -carotene and Ascorbic Acid in Human HepG2 Cells. *J Food Sci* 81(1): 275–281. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13162>
98. Xu X, Cui Z, Wang S (2018) Joint toxicity on hepatic detoxication enzymes in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to binary mixtures of lead and paraquat. *Environ Toxicol Pharmacol* 62: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.005>
99. Fan C, Cui Z, Yang T, Sun L, Cao C (2023) UDP-glucuronosyltransferase is involved in susceptibility of *Chironomus kiiensis* Tokunaga, 1936 (Diptera: Chironomidae) to insecticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 263:115353. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115353>
100. Mahboob M, Siddiqui MK (2002) Long-term effects of a novel phosphorothionate (RPR-II) on detoxifying enzymes in brain, lung, and kidney rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 53(3): 355–360. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00016-7](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00016-7)
101. Tarja N, Kirsti E, Marja L, Kari E (2003) Thermal and metabolic factors affecting bioaccumulation of triazine herbicides by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol* 18(4): 219–226. <https://doi.org/10.1002/tox.10118>
102. Grant C, Singh KS, Hayward A, Hunt BJ, Troczka BJ, Pym A, Ahn SJ, Zeng B, Gao CF, Leroux A, Daum E, Süess P, Souza D, Elias J, Ffrench-Constant RH, Vontas J, Roditakis E, Bielza P, Zimmer CT, Bass C (2023) Overexpression of the UDP-glycosyltransferase UGT34A23 confers resistance to the diamide insecticide chlorantraniliprole in the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. *Insect Biochem Mol Biol* 159:103983. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103983>
103. Ishii Y, Miyoshi A, Watanabe R, Tsuruda K, Tsuda M, Yamaguchi-Nagamatsu Y, Yoshisue K, Tanaka M, Maji D, Ohgiya S, Oguri K (2001) Simultaneous expression of Guinea pig UDP-glucuronosyltransferase 2B21 and 2B22 in COS7 cells enhances UDP-glucuronosyltransferase 2B21-catalyzed morphine-6-glucuronide formation. *Mol. Pharmacol* 60(5): 1040–1048. <https://doi.org/10.1124/mol.60.5.1040>
104. Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK (2003) Mechanism of rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 induction by oltipraz: evidence for a contribution of the Aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol* 63(1): 119–127. <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.119>
105. Bandyopadhyay A, Sharma S, Behera D, Singh N (2021) UGT1A1 Gene Polymorphisms in Patients with Small Cell Lung Cancer Treated with Irinotecan-Platinum Doublet Chemotherapy and Their Association with Gastrointestinal Toxicity and Overall Survival. *Oncologist* 26(8): 701–713. <https://doi.org/10.1002/onco.13757>
106. Court MH (2005) Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol* 400: 104–116. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00007-8)
107. Wang X, Wang Z, Fan X, Yan M, Jiang L, Xia Y, Cao J, Liu Y (2021) Comparison of the drug-drug interactions potential of ibrutinib and acalabrutinib via inhibition of UDP-glucuronosyltransferase. *Toxicol Appl Pharmacol* 424:115595. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115595>
108. Wang Z, Wang Z, Wang X, Lv X, Yin H, Fan X, Yan M, Jia Y, Jiang L, Xia Y, Li W, Liu Y (2022) In vitro effects of opicapone on activity of human UDP-glucuronosyltransferases isoforms. *Toxicol Lett* 367: 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.07.003>

109. *Hiura Y, Satsu H, Hamada M, Shimizu M* (2014) Analysis of flavonoids regulating the expression of UGT1A1 via xenobiotic receptors in intestinal epithelial cells. *Biofactors* 40(3): 336–45. <https://doi.org/10.1002/biof.1153>
110. *Kalthoff S, Strassburg CP* (2019) Contribution of human UDP-glucuronosyltransferases to the antioxidant effects of propolis, artichoke and silymarin. *Phytomedicine* 56: 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.08.013>
111. *Zhu YD, Guan XQ, Chen J, Peng S, Finel M, Zhao YY, Wang RM, Bi HC, Lei M, Wang DD, Ge GB* (2021) Neobavaisoflavone Induces Bilirubin Metabolizing Enzyme UGT1A1 via PPAR α and PPAR γ . *Front Pharmacol* 11:628314. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.628314>
112. *Chou YC, Lin YH, Lin PH, Tung YC, Ho CT, Pan MH* (2021) Dietary 5-demethylnobiletin modulates xenobiotic-metabolizing enzymes and ameliorates colon carcinogenesis in benzo[a]pyrene-induced mice. *Food Chem Toxicol* 155:112380. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112380>
113. *Malfatti MA, Wu RW, Felton JS* (2005) The effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression on the mutagenicity and metabolism of the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in CHO cells. *Mutat Res* 570(2): 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.007>

THE ROLE OF UDP-GLYCOSYLTRANSFERASES IN XENOBIOTIC METABOLISM

A. G. Kinareikina^{a, b, #} and E. A. Silivanova^a

^aAll-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Entomology and Arachnology –
Branch of Tyumen Scientific Centre SB RAS, Tyumen, Russian Federation

^bFederal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Tyumen State Medical University”
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Tyumen, Russian Federation

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

UDP-glycosyltransferases (UGTs) are enzymes from a complex superfamily of glycosyltransferases. UGTs catalyze glycosylation reactions, i.e. the covalent addition of sugar from a cofactor (UDP-glycoside) to the corresponding functional group of a lipophilic substrate. These enzymes play a crucial role in cellular homeostasis of many groups of organisms (mammals, arthropods, plants, etc.). UGTs are the main enzymes of phase II detoxification of xenobiotics of various origins (metals, natural compounds, drugs, industrial pollutants, pesticides, etc.). The human UGTs arouse interest due to their role in drug metabolism and involvement in the development of drug resistance in cancer cells. UDP-glycosyltransferases of invertebrates (especially insects) attract the attention of researchers because of their involvement in the development of pesticide resistance. However, the exact role of individual UGT families and subfamilies in xenobiotic biotransformation remains unclear, highlighting the importance of further study of these enzymes. This review aims to provide an understanding of the diversity of UDP-glycosyltransferases in vertebrates and invertebrates (arthropods) and some details of the interaction of these enzymes with xenobiotics. The section on general information briefly describes the structure and localization of the enzymes of the superfamily UGTs, the enzymatic reaction and the mechanism of catalysis using UDP-glucuronosyltransferase as an example. In addition, this review presents the data on the impact of different xenobiotics (industrial pollutants, metals, pesticides, drugs and natural compounds) on the enzymatic activity of UGTs and the level of UGT gene expressions in vertebrates and invertebrates (arthropods). The diversity of UGT enzymes and their substrates reflects the wide possibilities of the animal organism to protect themselves from xenobiotics.

Keywords: UDP-glycosyltransferase, detoxification system, xenobiotics, industrial pollutants, metals, pesticides, drugs, natural pollutants.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2024 г. Б. А. Герда^{1,*}, Е. А. Скверчинская¹, А. Ю. Андреева^{1,2},
А. А. Волкова¹, С. П. Гамбарян¹, И. В. Миндукшев¹

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

² Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

* e-mail: bgerda@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Осмотическая хрупкость или резистентность эритроцитов (osmotic fragility) — параметр, отражающий способность клеток противостоять изменению осмотического градиента. Нарушения этой характеристики связаны с различными патологиями, включая гемолитические анемии, злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые заболевания. Осмотическая резистентность может варьироваться у различных видов животных и тесно связана с экосистемой. Разработан метод определения осмотической резистентности с применением лазерного анализатора дисперсных частиц, который позволяет регистрировать изменения концентрации клеток в кинетическом режиме при постоянной температуре. Исследуемые с его помощью виды включают *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus domestica*, *Coturnix japonica domestica*, *Rana ridibunda*, *Carassius carassius* и *Lampetra fluviatilis*. Метод предложен в двух вариантах: (1) добавка воды осуществляется вручную (мануальный), (2) среда разбавляется автоматически (автоматический). В качестве характеристики осмотической резистентности использованы параметры: H_{50} (осмоляльность, при которой лизирует половина подверженных лизису клеток), H_{90} (90-процентный лизис) и W (гетерогенность популяции по степени устойчивости к лизису). Результаты, полученные с использованием разработанного метода, статистически значимо не отличаются от результатов спектрофотометрии и проточной цитометрии по параметрам H_{50} и W . Между результатами автоматического и мануального методов значимых различий так же не обнаружено. Эритроциты водных и околводных животных существенно более устойчивы к гипоосмотическому лизису. Среди всех исследованных видов наиболее устойчивы к лизису оказались эритроциты амфибий (*Rana ridibunda*) и миног (*Lampetra fluviatilis*). Наибольшая гетерогенность по степени устойчивости обнаружена у амфибий (разница в 2 раза в сравнении со всеми прочими рассмотренными таксонами). Эритроциты млекопитающих (человека и крысы) схожи по уровню резистентности, менее однородны по степени устойчивости. Половинный лизис эритроцитов птиц наблюдается при большей осмоляльности, чем у эритроцитов млекопитающих. Эритроциты птиц (*Coturnix japonica domestica*), однако, лизируют в значительно большем осмотическом диапазоне и содержат популяцию невосприимчивых к гипоосмотическому лизису клеток. Полученные данные показали, что эритроциты пресноводных низших позвоночных более осмотически устойчивы, чем эритроциты высших, что, вероятно, объясняется особенностями эмбриогенеза, экто-/эндотермностью и средой обитания.

Ключевые слова: осмотическая резистентность, эритроциты, лазерная дифракция, сравнительный анализ

DOI: 10.31857/S0044452924050029, **EDN:** XPROCR

ВВЕДЕНИЕ

Осмотическая резистентность эритроцитов (erythrocyte osmotic fragility) характеризует способность клеток противостоять изменению осмотического градиента [1]. Осмотическая резистентность является комплексным параметром, отражающим биофизические и морфологические свойства эритроцитов, такие как степень гидратации, жесткость

цитоскелета, склонность клеток к лизису в кровотоке, форму и деформируемость эритроцитов [1–3]. Деформируемость, в свою очередь, — важнейшая характеристика, напрямую влияющая на гемореологические и гемодинамические свойства кровотока [4, 5]. Высокая деформируемость эритроцитов обусловлена, во-первых, горизонтальными взаимодействиями компонентов цитоскелета, таких как спектрин, и, во-вторых, вертикальными взаимо-

действиями между цитоскелетом и трансмембранными комплексами через анкирин, band 4.1 и 4.2, цитозольный домен белка band 3 и другие белки [6]. На деформируемость эритроцитов влияют также состояние цитоплазмы, формы гемоглобина и метаболические процессы, контролирующие уровень АТФ и окислительно-восстановительный баланс [1]. Нарушения целостности структурных белков мембраны и цитоскелета, нарушения регуляции транспорта ионов через мембрану, нарушения синтеза АТФ и некоторые другие факторы приводят к снижению деформируемости клеток [1]. Плохо деформируемые эритроциты теряют способность проходить по капиллярному руслу, где происходит основная часть газообмена, задерживаются в синусах селезенки (фитнес тест), а также элиминируются макрофагами в селезенке и печени [7, 8], что может привести к развитию анемии. Патологии, связанные с нарушением деформируемости эритроцитов, включают наследственные гемолитические анемии (наследственные сфероцитоз [9], эллиптоцитоз [10] и ксероцитоз [11], талассемия [12], серповидноклеточная анемия [13]), развитие злокачественных новообразований [14], метаболические и сердечно-сосудистые нарушения и воспалительные процессы (сепсис [15], ишемия-реперфузия [16]).

Известно, что деформируемость эритроцитов отличается между позвоночными и зависит не только от таксономической близости, но и от экосистемы [17]. Осмоляльность плазмы крови [18, 19] и осмотическая резистентность так же видоспецифичны [20]. Эритроциты водных и околородных видов амфибий более осмотически резистентны, чем эритроциты наземных [20]. Эритроциты экотермных животных более резистентны, чем эритроциты эндотермных [20, 21]. Эритроциты птиц не подвержены полному гемолизу при погружении в чистую воду, однако стопроцентный лизис достигается путем последовательного разбавления среды [22]. Средний корпускулярный объем клеток (MCV) положительно коррелирует с осмотической резистентностью [20]. Тем не менее, проведено мало сравнительных исследований на данную тему, а механизмы, лежащие в основе межвидовых различий, все еще остаются во многом неопределенными. Получение новых сравнительных данных и совершенствование методов определения осмотической резистентности (и деформируемости, как следствие) позволят лучше понять природу межвидовых особенностей крови.

Существует ряд методов, направленных на определение деформируемости эритроцитов. Распространены методы, основанные на оценке деформируемости, как функции напряжения сдвига, которые включают модуль измерения деформиру-

емости на LORRCA (Laser Optical Rotational Red Cell Analyser) [23], RheoScan-D [24] и автоматический реоскоп ARCA (Automated Rheoscope and Cell Analyzer) [25]. В нескольких из методов оценки деформируемости также применяется проточная цитометрия: аннексиновый тест [26], ЕМА-тест [27]. Другие подходы включают атомно-силовую микроскопию [28], микропипетирование [29], оптический пинцет [30], микрогидродинамику [31], фильтрацию эритроцитов через целлюлозные колонки [32]. Ряд методов оценки деформируемости полностью или частично опирается на оценку осмотической устойчивости эритроцитов. Среди них наиболее распространены спектральный тест [33] и эктацитометрия на анализаторе LORRCA [23]. Также предложены проточная цитометрия [34] и оценка осмотического лизиса при гидродинамическом фокусировании в микропотоке [35]. Существующие методы оценки осмотической устойчивости имеют ряд недостатков, которые ограничивают их применение. Результаты теста крайне зависят от температуры [33], что обычно не контролируется при измерении степени гемолиза при помощи всех упомянутых методов. Необходимость приготовления ряда гипотонических растворов при использовании спектрального метода приводит к росту сложности отдельного эксперимента. Цитометрические методы менее трудоемки, но их протоколы позволяют рассчитать только отношение количества клеток до и после разбавления среды. Осмотическая градиентная эктацитометрия предоставляет только один параметр, соответствующий результатам спектрального метода, что усложняет сравнительный анализ данных, полученных в различных лабораториях. В данной работе предлагается новый метод определения осмотической резистентности эритроцитов. Как и при эктацитометрии, регистрация деформационных характеристик осуществляется на основе дифракционной картины образца. Эксперименты проводятся на лазерном анализаторе частиц LaSca (Laser Scattering), адаптированном к биомедицинским исследованиям. LaSca позволяет регистрировать изменение объема и формы клеток, агрегацию, агглютинацию, образование микрочастиц и лизис в кинетическом режиме при постоянстве температурных условий [36]. Ранее методом лазерной дифракции были успешно охарактеризованы объемные изменения эритроцитов при аммонийном, окислительном и осмотическом стрессе [37]. При действии на эритроциты фармакологических препаратов метод лазерной дифракции дает результаты, которые значимо соотносятся с результатами, полученными методами проточной цитометрии и микрофлюидного анализа. Показано, анализатор частиц возможно использовать для

оценки мембран эритроцитов для характеристики скрытой анемии при действии противоопухолевых препаратов [2].

Цель данного исследования — сравнительный анализ параметров осмотической резистентности эритроцитов различных таксонов позвоночных с применением разработанного нами метода, основанного на лазерной дифракции света. Среди анализируемых животных 2 вида млекопитающих (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus domestica*), один вид птиц (*Coturnix japonica domestica*), амфибий (*Rana ridibunda*), рыб (*Carassius carassius*) и миног (*Lampetra fluviatilis*).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовались: крысы линии Wistar, полученные из питомника лабораторных животных ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург) ($n = 7$). До эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария. Японские перепела *Coturnix japonica domestica* ($n = 6$) были получены от местного хозяйства (Санкт-Петербург, Россия) в возрасте 45–50 дней в сентябре 2023 г. Содержались в двух клетках по 5 особей. Корм/комбикорм и вода предоставлялись ad libitum. Птицы содержались при искусственном освещении с длительностью светового дня 14 ч. Температура воздуха в помещении поддерживалась постоянной 25–28°C, также был установлен рециркулятор воздуха с ультрафиолетом для дезинфекции воздуха. Взрослые особи обыкновенного карася *Carassius carassius Linnaeus* (вес 150–230 г, $n = 12$) были получены в местном хозяйстве (Санкт-Петербург, Россия) в октябре 2019 г. и содержались в течение до 2 недель до эксперимента в аэрируемых аквариумах объемом 70 л, оборудованных водной проточной системой (температура воды 10–14 °C, концентрация кислорода 7–8 мг O₂ л⁻¹). В период акклиматизации рыб кормили один раз в день специализированным кормом для рыб (Tetra Pond, Tetra, Melle, Германия) из расчета 5% от массы тела/особь. Особей озерной лягушки (*Rana ridibunda*) (вес 135 ± 10.4 г, $n = 15$) и речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) (вес 25 ± 5.2 г, $n = 30$) отлавливали в осенний период 2020–2021 гг. в водоемах Ленинградской области. В период акклиматизации к лабораторным условиям (2 недели) и экспериментов лягушек содержали в затемненных пластиковых боксах с невысоким уровнем воды при температуре +4–+8°C. Миног размещали в охлаждаемых затемненных бассейнах с аэрируемой пресной водой (+4–+8°C). На период акклиматизации и экспериментов лягушек и миног не кормили.

Участники. Эксперименты с участием людей проведены на крови 27 здоровых доноров (возраст от 20 до 74 лет).

Реактивы. HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота); хлорид натрия (NaCl); хлорид калия (KCl); хлорид магния (MgCl₂); D-глюкоза; этиленгликольдиаминтетрауксусная кислота (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA). Приобретены в Sigma-Aldrich (Германия). В экспериментах с человеческой кровью использовался изотонический HEPES buffer, приготовленный в соответствии с протоколам для анализатора LORRCA, одобренного для клинических исследований [23]. Состав буфера в мМ: 10 HEPES, 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 5 D-глюкоза, 2 ЭГТА, pH = 7.4 (pH-метр Metler Toledo, Колумбус, Огайо, США), 300 мОсмоль/кг H₂O (мОсм), контроль осмоляльности осуществлялся криоскопическим осмометром Osmomat 3000 (Gotec, Германия). Тот же буфер использовался в экспериментах с эритроцитами крыс. Для работы с эритроцитами других видов использовали следующие растворы: птицы: 10 HEPES, 140 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 14 D-глюкоза, pH=7.6, 320 мОсм; амфибии: 10 HEPES, 102 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 10 D-глюкоза, 2 ЭГТА, pH = 7.6, 220 мОсм; рыбы: 15 HEPES, 128 NaCl, 3 KCl, 1.5 MgCl₂, 2.2 D-глюкоза, pH = 7.8, 260 мОсм; миноги: 10 HEPES, 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 5.5 D-глюкоза, 2 ЭГТА, pH = 7.4, 260 мОсм.

Выделение эритроцитов из цельной крови. Человеческую венозную кровь брали при помощи закрытой системы взятия венозной крови S-Monovette®, с натрия цитратом 3.2% (Sarstedt, Германия). Кровь крыс собирали в гепаринизированные пробирки (гепарин в физрастворе до конечной концентрации гепарина 50 МЕ/мл), для анестезии был использован ингаляционный наркоз 3% изофлурана [38]. Кровь перепелов собирали в гепаринизированные пробирки при пункции плечевой вены, 0.6–0.8 мл, без применения анестезии, поскольку болевое воздействие от тонкой иглы незначительно и продолжается не долго [39]. Кровь амфибий (1.5–2 мл) отбирали путем пункции сердца стерильным гепаринизированным пластиковым шприцем на 2 мл после анестезирования животного. Кровь рыб (1–1.5 мл) собирали в гепаринизированные шприцы путем пункции хвостовой вены. У миног кровь (1.5–2 мл) отбирали путем декапитации анестезированного животного и последующего сбора крови в стерильную гепаринизированную пластиковую пробирку объемом 5 мл. Использованная анестезия для амфибий, рыб и миног — SYNCAINE (MS 222; fish anesthetic; Syndel, США), расчет дозы проводили по калькулятору

Syndel. Во всех случаях эритроциты дважды промывали буфером физиологической осмоляльности, соответствующей виду животного.

Метод лазерной дифракции (мануальный). Эксперименты проводили на лазерном анализаторе частиц LaSca-ТМ (БиоМедСистем, Санкт-Петербург, Россия). Эритроциты вносили в кювету, содержащую 1000 мкл буфера исходной осмоляльности для исследуемого вида (конечная концентрация клеток $1-2 \cdot 10^8$ клеток/мл), регистрировали светорассеяние. Снижали осмоляльность добавками 250–500 мкл дистиллированной воды (dH_2O), и на каждом шаге изменения осмоляльности вносили кратное уровню разбавления количество суспензии эритроцитов для поддержания постоянства концентрации клеток. Гемолиз характеризовали по данным кинетики прямого светорассеяния. Снижение осмоляльности среды относительно осмоляльности цитоплазмы приводит к росту объема эритроцитов и их последующему лизису [40]. Интенсивность светорассеяния зависит как от объема частиц, так и от их концентрации [41]. Так как вклад данных факторов зависит от угла регистрации рассеяния света, рассчитали оптимальный угол регистрации сигнала при помощи программного обеспечения MiePlot v4.6.14, предназначенного для теоретических расчетов кривых светорассеяния. Численные расчеты рассеяния показали, что оптимальный угол составляет 5.5 градусов.

Спектрофотометрический метод. В 8 пробирок вносили по 2 мл HEPES-buffer с осмоляльностями (мОсм): 300, 200, 150, 133, 120, 109, 100, 92. Разведения соответствуют использованным на лазерном анализаторе частиц при экспериментах с эритроцитами человека. В пробирки с разведениями вносили эритроциты (конечная концентрация $1.25 \cdot 10^7$ клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием (20 сек, 3000 g) (Eppendorf 5415D, Eppendorf, Германия). Анализ супернатанта проводили на спектрофотометре СПЕКС ССП-715-М (ООО «Спектроскопические системы») при 25 °C и длине волны 540 нм.

Проточная цитометрия. Использовали модифицированный протокол, предложенный Won и Suh [34]. Осмоляльности разведений те же, что использовались при спектрофотометрии (конечная концентрация эритроцитов $4 \cdot 10^8$ клеток/мл). Эксперименты проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, США) при 25 °C. Запись осуществляли в режиме прямого (FSC-A) / бокового (SSC-A) рассеяния и кинетическом режиме прямого рассеяния (FSC-A) / время (Time). Длительность записи одной пробы — 20 секунд, по истечении которых меняли пробу на следующую с меньшей осмоляльностью и продолжали запись.

Методика оценки результатов экспериментов. Зависимости вида доза-ответ (dose-response), основанные на уравнении Хилла, широко применяются в биологических науках [42]. В приложении к описанию гипоосмотического лизиса уравнение дозозависимости принимает следующий вид (Уравнение 1):

$$Lys = Lys_{max} - \frac{Lys_{max}}{1 + \frac{H_{50}^h}{Osm^h}}, \quad (1)$$

где Lys — процент лизированных клеток, %; Lys_{max} — максимально возможный лизис, %; H_{50} — половинный ответ (осмоляльность, при которой лизирует половина клеток в диапазоне между Lys_{max} и Lys_{min}), мОсм; h — коэффициент Хилла; Osm — текущая осмоляльность суспензии клеток, мОсм.

Коэффициент Хилла и H_{50} рассчитываются по линеаризованной форме уравнения Хилла (Уравнение 2):

$$\ln \left(\left| \frac{Lys_{max}}{Lys - Lys_{max}} + 1 \right| \right) = h (\ln H_{50} - \ln Osm) \quad (2)$$

Строится зависимость $\ln \left(\left| \frac{Lys_{max}}{Lys - Lys_{max}} + 1 \right| \right)$ от

$\ln Osm$. Наклон построенной прямой — есть коэффициент Хилла, а точка пересечения с осью $\ln Osm$ — натуральный логарифм H_{50} .

Для построение данной зависимости на первом этапе так же необходимо рассчитать экспериментальный процент лизиса при исследуемых осмоляльностях (Уравнение 3):

$$\widehat{Lys} = \left(1 - \frac{R}{R_{max}} \right) * 100, \quad (3)$$

где \widehat{Lys} — экспериментальный процент лизиса при текущей осмоляльности, %; R_{max} — последняя экспериментальная точка перед началом лизиса клеток, у.е; R — ответ при текущей осмоляльности, у.е. Описываемый алгоритм применим и для обработки данных спектрофотометрии и проточной цитометрии. При спектрофотометрии расчет ведется по оптической плотности высвобожденного гемоглобина в 540 нм (рис. 1a). При проточной цитометрии — по числу зарегистрированных событий в области (гейте) с клетками (рис. 1b). По точкам строится график линеаризованного уравнения Хилла (Уравнение 2) и определяются параметры h и H_{50} .

В большинстве случаев значение Lys_{max} можно приравнять к 100%, однако эритроциты некоторых животных могут содержать субпопуляции клеток,

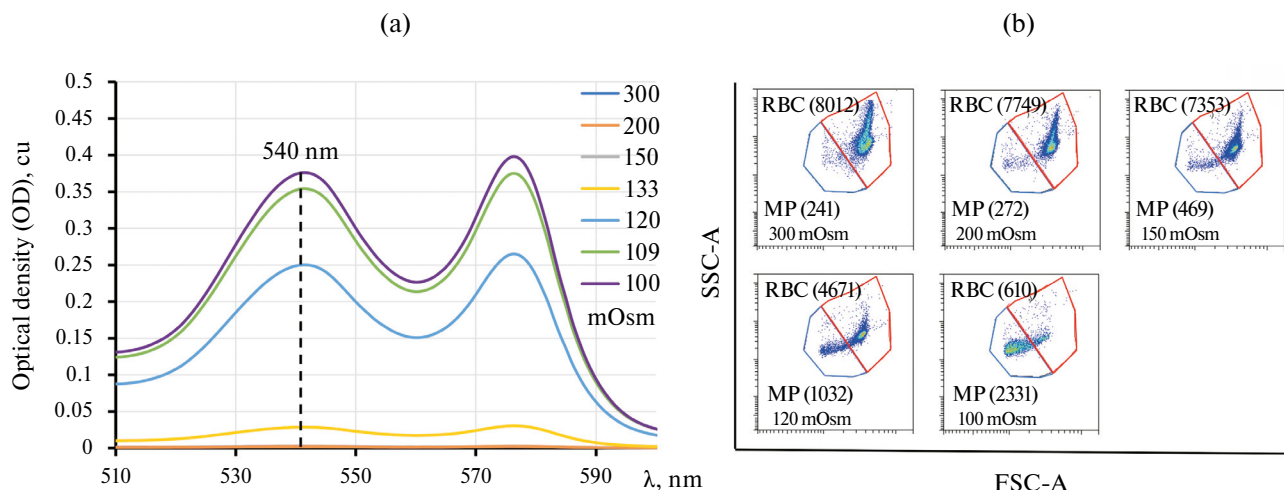


Рис. 1. Примеры первичных данных, полученных методами спектрофотометрии и проточной цитометрии. (a) — спектрофотометрия. Разными цветами показаны графики зависимости оптической плотности (OD) от длины волны (λ), отмечена использованная длина волны (540 нм). OD возрастает по мере снижения осмоляльности. Точка перед началом лизиса (R_{max}) — 150 мОсм. (b) — проточная цитометрия. Снижение осмоляльности ведет к снижению числа регистрируемых событий в области с клетками (RBC) и росту количества микрочастиц (MP). Точка перед началом лизиса (R_{max}) — 200 мОсм. Приведенные данные получены на эритроцитах человека. Выделение красным — область с эритроцитами, выделение синим — область с микрочастицами.

не подверженных гипоосмотическому лизису [22]. Некоторые воздействия на эритроциты, такие как сильный окислительный стресс [37] или действие лекарственных препаратов [2], так же приводят к росту жесткости клеток и их частичной невосприимчивости к лизису [37]. Для оптимизации значения Lys_{max} использовали метод SLSQP (Sequential Least Squares Programming) из библиотеки SciPy 1.13.0 [43], который позволяет решать последовательность подзадач оптимизации, каждая из которых оптимизирует квадратичную модель цели с учетом линеаризации ограничений. Выбранная функция потерь — сумма квадратов остатков, разделенная на количество исследованных осмоляльностей (Уравнение 4):

$$loss = \frac{\sum_{Osm_0}^{Osm_n} (\widehat{Lys} - Lys)^2}{n}, \quad (4)$$

где Osm_0 — исходная осмоляльность, мОсм; Osm_n — последняя (наименьшая) исследуемая осмоляльность, мОсм; \widehat{Lys} — экспериментальный процент лизиса, %; Lys — рассчитанный при той же осмоляльности процент лизиса, %; n — количество исследованных осмоляльностей (число шагов разбавления).

Осмоляльности, соответствующие определенному проценту лизиса (включая H_{10} и H_{90}), рассчитываются по выведенной из уравнения 1 формуле (Уравнение 5):

$$H_x = H_{50} \left(\frac{100 - x}{x} \right)^{\frac{1}{h}}, \quad (5)$$

где x — процент лизировавших клеток, %.

Параметр W характеризует гетерогенность популяции клеток по их восприимчивости к лизису в осмотическом градиенте и определяется, как разность между H_{90} и H_{10} (Уравнение 6):

$$W = H_{10} - H_{90} \quad (6)$$

При использовании мануального метода лазерной дифракции расчеты параметров велись по интенсивности светорассеяния, регистрируемой на 5.5 градусах (Рис. 2а). Ключевые параметры — H_{50} , H_{10} , H_{90} , W и, при неполном лизисе, Lys_{max} (рис. 2б).

Осмотическая резистентность, таким образом, характеризуется 5 параметрами, которые наиболее полно описывают гипоосмотический лизис клеток: H_{50} , H_{10} , H_{90} , W и Lys_{max} [44]. Параметр H_{50} широко используется для описания осмотической устойчивости эритроцитов, соответствует (при равенстве Lys_{max} 100%) точке лизиса половины клеток, характеризует среднюю осмотическую устойчивость эритроцитов [1]. Параметры H_{10} и H_{90} характеризуют начало и окончание лизиса. Параметр W описывает осмотический диапазон, в котором протекает лизис клеток (неоднородность популяции по степени устойчивости). Параметр Lys_{max} характеризует максимальный процент лизиса.

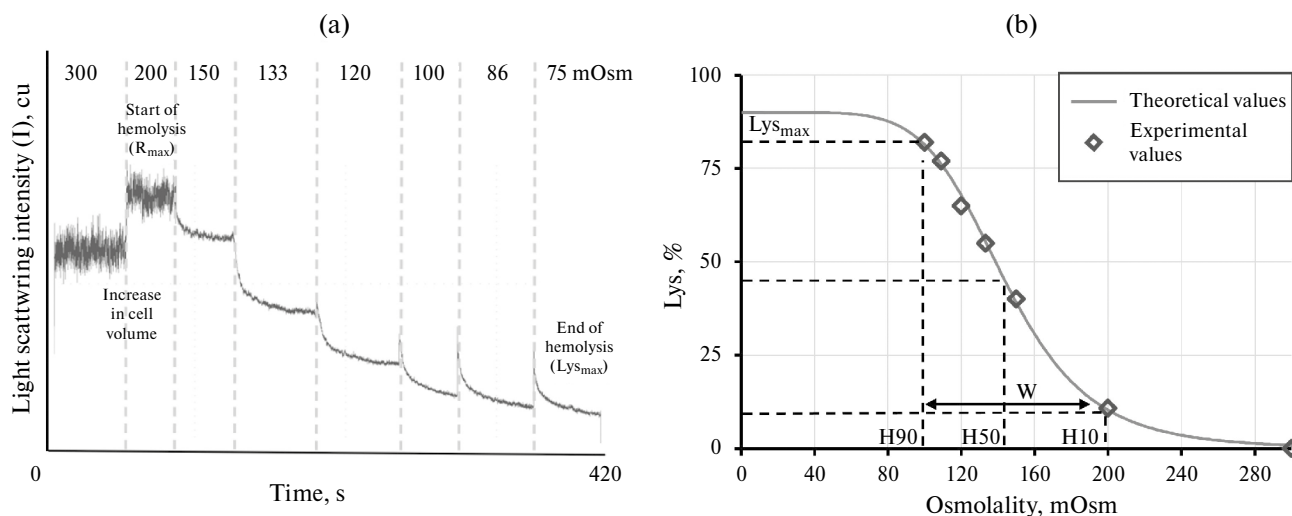


Рис. 2. Пример первичных данных, полученных мануальным методом лазерной дифракции, и визуализация ключевых параметров на лизисной кривой. (a) — метод лазерной дифракции (мануальный). Интенсивность светорассеяния возрастает ввиду роста объема клеток при осмоляльностях 200 и 150 мОсм. Затем падает по мере дальнейшего снижения осмоляльности в результате гемолиза. Точка перед началом лизиса (R_{max}) — 150 мОсм. (b) — лизисная кривая, построенная по описанному алгоритму. Данные получены на эритроцитах птиц для демонстрации неполного лизиса клеток и параметра Lys_{max} . Отображены ключевые параметры, характеризующие устойчивость эритроцитов (H_{50} , H_{90} , H_{10} , W и Lys_{max}).

Метод лазерной дифракции (автоматический).

Эксперименты проведены на лазерном анализаторе частиц LaSca-ТМ (БиоМедСистем, Санкт-Петербург, Россия). Снижение осмоляльности суспензии проводили автоматически с заданной скоростью разбавления dH₂O (8.33 мкл/с). Запись интенсивности светорассеяния (реакции клеток) осуществлялась с шагом 0.096 с. Осмоляльность суспензии в каждой точке рассчитали по формуле (уравнение 7):

$$Osm = \frac{Osm_0 * V_0}{V_0 + v_v t}, \tag{7}$$

где Osm — осмоляльность в отдельной точке, мОсм; Osm_0 — исходная осмоляльность среды, мОсм; V_0 — исходный объем среды, мкл; v_v — скорость подачи воды, мкл/с; t — время, прошедшее с начала эксперимента, с. Соответствие фактических осмоляльностей теоретическим периодически контролировали на осмометре.

Так как поддержание постоянства концентрации клеток требовало бы подключения второго насоса, подающего суспензию эритроцитов, был разработан математический алгоритм коррекции исходной экспериментальной зависимости, компенсирующий отсутствие добавок суспензии. Получили теоретическую зависимость, характеризующую падение светорассеяния при снижении концентрации дисперсных частиц (латексы известного размера) (Уравнение 8):

$$I_d = \frac{I_0 * V_0}{V_0 + k_d t}, \tag{8}$$

где I_d — интенсивность в отдельной точке, у.е.; I_0 — исходная интенсивность до начала разбавления, у.е.; k_d — экспериментально определяемый временной коэффициент, необходимый ввиду наблюдаемых отличий теоретических результатов при использовании v_v от наблюдаемых экспериментально.

Для нахождения k_d провели серию экспериментов по разбавлению частиц латекса диаметрами 6, 10 и 16 мкм в течение 5 минут. Коэффициент k_d подобран таким образом, чтобы теоретическая зависимость соответствовала экспериментальной. Наибольшее соответствие между теоретическими и экспериментальными зависимостями наблюдали при значении $k_d = 6.3$ и значении $v_v = 8.33$ (рис. 3а). Провели корректировку интенсивностей светорассеяния (Уравнение 9):

$$I = I_e * \frac{I_{e0}}{I_d}, \tag{9}$$

где I — искомая теоретическая интенсивность, рассчитываемая для каждой точки; I_e — экспериментально полученная интенсивность для той же точки; I_{e0} — начальная экспериментальная интенсивность.

Вычисление параметров осмотической резистентности проводили по скорректированной зави-

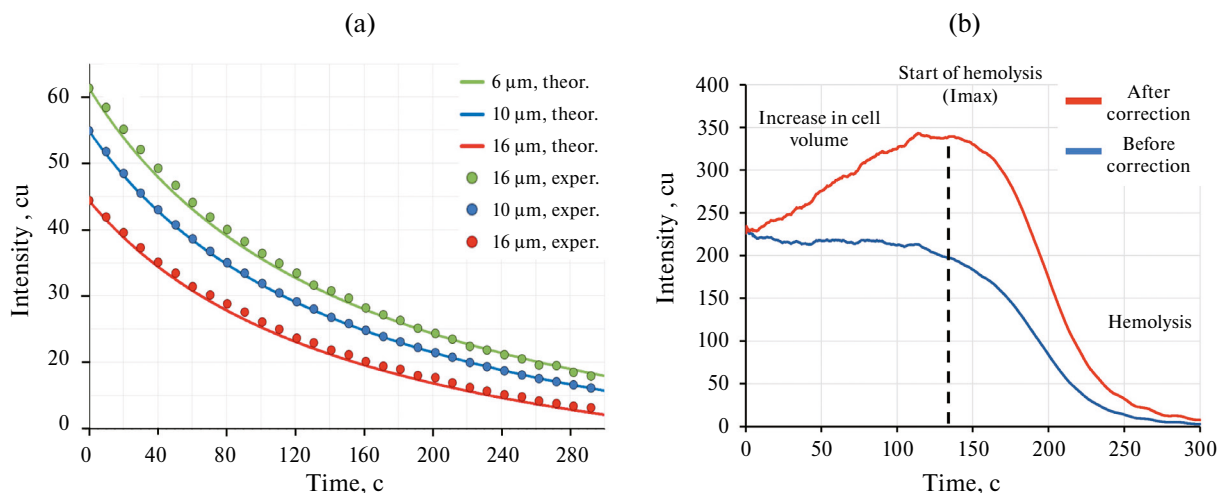


Рис. 3. Коррекция интенсивности светорассеяния. (а) — теоретические и экспериментальные зависимости интенсивности от концентрации дисперсных частиц для латексов диаметрами 6, 10 и 16 мкм. Теоретические и экспериментальные зависимости совпадают при $k_d = 6.3$, $v_p = 8.33$. (б) — интенсивности светорассеяния до и после коррекции. Данные получены на эритроцитах человека. На скорректированной зависимости представлен рост интенсивности ввиду увеличения объема эритроцитов.

симости (рис. 3b) по алгоритму, использованному для мануального метода лазерной дифракции.

Время автоматизированного анализа составляет 5–7 минут. Для общего анализа эритроцитов достаточно 5 мкл цельной крови. В предыдущих работах продемонстрировано, что использование многоэлементной системы детектирования рассеянного света так же позволяет дифференцировать процессы изменения объема и лизиса клеток, оценить функцию распределения частиц по размерам (эритроцитарную гистограмму) [36]. Таким образом, в результате исследования указанного объема крови можно получить 4–6 количественно нормируемых параметров, характеризующих объем, форму и осмотическую устойчивость эритроцитов.

Анализ данных. Проверку на нормальность распределения осуществляли при помощи Shapiro–Wilk test и Kolmogorov–Smirnov test. При множественных сравнениях статистическую обработку проводили с использованием One-way ANOVA и Tukey’s multiple comparisons test (сравнение метода лазерной дифракции с спектрофотометрией и проточной цитометрией, сравнение осмотической резистентности различных видов животных). При сравнении двух непарных переменных использовали Welch’s t test (оценка влияния температуры). При сравнении двух парных переменных — paired t-test (сравнение мануального и автоматического методов лазерной дифракции). Корреляцию оценивали по Pearson correlation coefficient. Формат представления данных — mean \pm sd. Статистически значимые различия — $p < 0.05$. Статистическая обработка проведена в Graphpad Prism 10.1.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, США). Работа с данными проточной цитометрии осуществлялась в CytExpert (Beckman-Coulter, Brea, CA, США). Данными, по-

лученными по методу лазерной дифракции, — LaSca_32v.1498 (BioMedSystems Ltd., Санкт-Петербург, Россия). Параметры осмотической резистентности рассчитывались при помощи Python 3.12.0 и следующих библиотек: Pandas 2.2.2, SciPy 1.13.0, Matplotlib 3.8.4 и Numpy 1.26.4. Python скрипт для обработки первичных данных тестов на осмотическую резистентность представлен на GitHub странице нашего проекта: <https://github.com/ldelt/OFTCalculator>.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние температуры на осмотическую резистентность эритроцитов. Известно, что осмотическая резистентность зависит от температуры [33], которая не учитывается при использовании других методов. Для оценки влияния температуры, провели серию экспериментов по определению осмотической резистентности по методу лазерной дифракции при 25°C (комнатная температура, используемая при применении других методов) и 37°C (физиологическая температура для эритроцитов человека). При 25°C существенно возрастают H_{50} и H_{90} (рис. 4a, b), однако гетерогенность популяции клеток по степени устойчивости к гипоосмотическому лизису (W) значимо не изменяется (рис. 4c). Лизисная кривая при 25°C смещена в область более высоких осмоляльностей (рис. 4d).

Так как снижение температуры относительно физиологической привело к статистически значимому снижению осмотической резистентности эритроцитов человека, эксперименты по определению осмотической устойчивости эритроцитов человека и животных далее проводили при соответ-

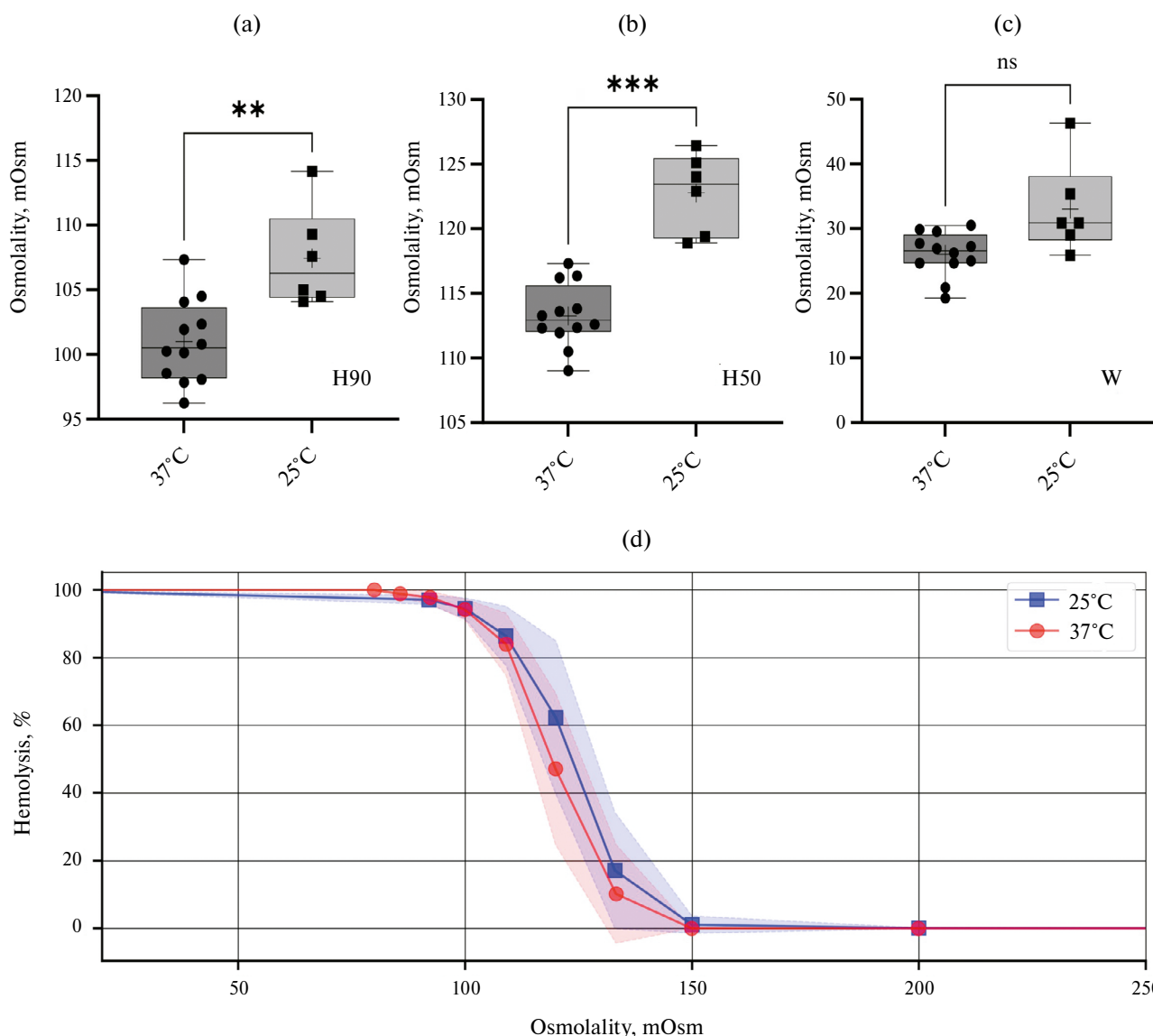


Рис. 4. Осмотическая резистентность эритроцитов человека при 25 и 37 °C. (a) — сравнение по H_{90} , (b) — сравнение по H_{50} , (c) — сравнение по W . Усы — минимум и максимум, $n = 12$ для 37 °C, $n = 6$ для 25 °C, + — среднее значение, ns — $p > 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, Welch's t test. (d) — зависимости процента лизиса (Lys) в экспериментальных точках от осмоляльности среды (Osm). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd).

ствующих физиологических температурах только методом лазерной дифракции.

Сравнение метода лазерной дифракции с методами спектрофотометрии и проточной цитометрии. Для валидации метода лазерной дифракции и представленного алгоритма оценки осмотической устойчивости, разработанный метод сравнили с спектрофотометрией и проточной цитометрией на примере человеческих эритроцитов. Температура — 25 °C. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил влияние использованного метода на параметры H_{50} ($F_{(2,14)} = 3.439$, $p > 0.05$) и W ($F_{(2,14)} = 0.7706$, $p > 0.05$), но выявил на параметр H_{90} ($F_{(2,14)} = 4.173$, $p = 0.038$). Статистически значимые различия обна-

ружены только между методами лазерной дифракции и спектрофотометрии и только параметру H_{90} (рис. 5a, b, c).

Исходя из близости лизисных кривых, построенных по экспериментальным точкам (особенно для методов лазерной дифракции и спектрофотометрии) (рис. 5g), а также из близости рассчитываемых параметров осмотической резистентности (рис. 5d, e, f), допустимо использование любого из трех описанных методов и сравнение получаемых с их помощью параметров между собой.

Сравнение мануального и автоматического методов лазерной дифракции. Для упрощения протокола эксперимента и снижения вероятности допущения

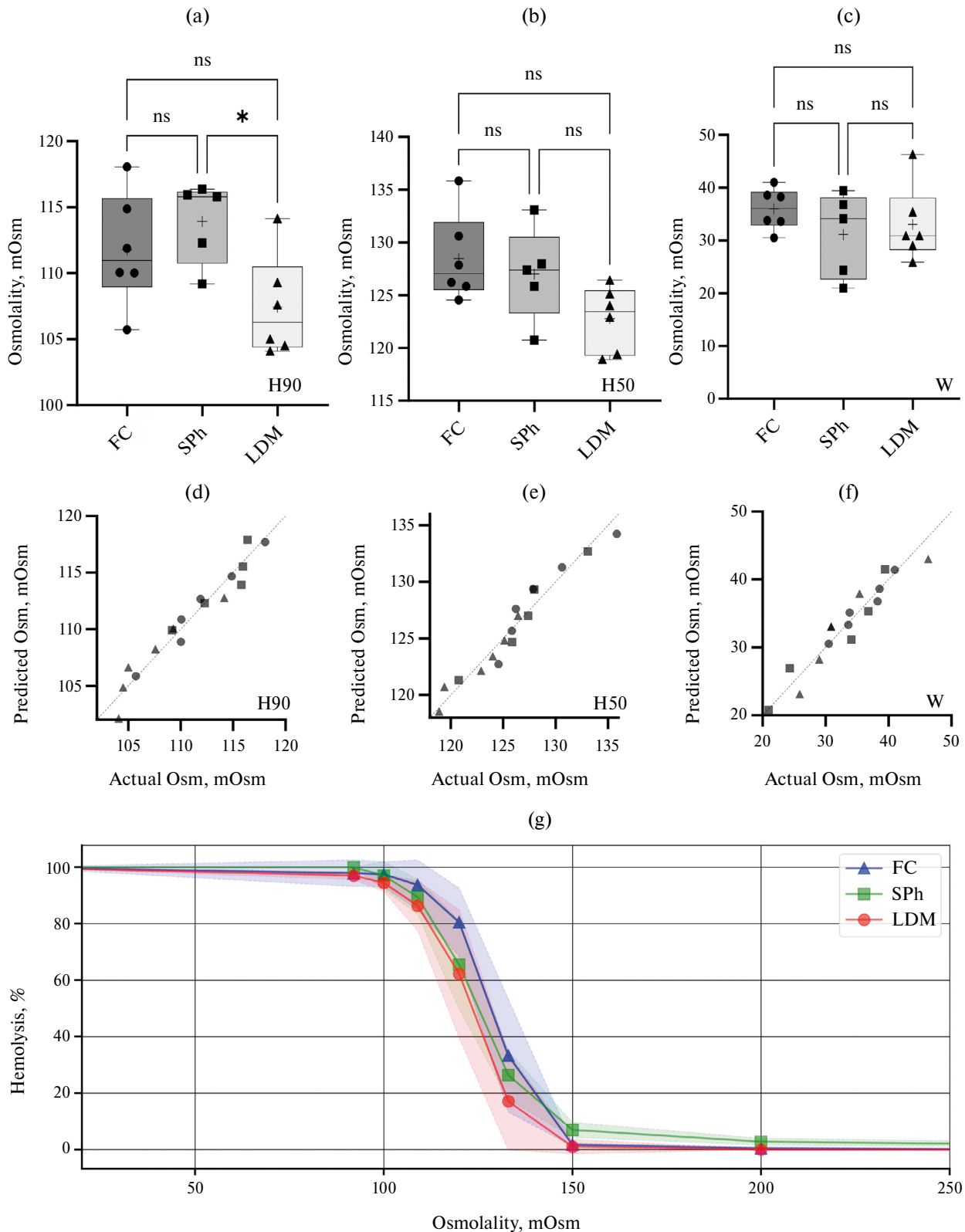


Рис. 5. Сравнение мануального метода лазерной дифракции с проточной цитометрией и спектрофотометрией при оценке осмотической резистентности эритроцитов человека. (a) — сравнение по H_{90} . (b) — сравнение по H_{50} . (c) — сравнение по W . FC — проточная цитометрия ($n = 6$), SPh — спектрофотометрия ($n = 5$), LDM — мануальный метод лазерной дифракции ($n = 6$), усы — минимум и максимум, + — среднее значение, ns — $p > 0.05$, * — $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test. (d) — QQ-plot для H_{90} . (e) — QQ-plot для H_{50} . (f) — QQ-plot для W . Predicted — квантили стандартного нормального распределения. (g) — зависимости процента лизиса (Lys) в экспериментальных точках от осмоляльности среды (Osm); полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd).

ошибок, разработали автоматический метод лазерной дифракции, который затем сравнили с ранее апробированным мануальным методом. Автоматический метод апробировали на эритроцитах человека. При оценке осмотической резистентности эритроцитов человека различий по параметрам H_{90} ,

H_{50} и W выявлено не было (рис. 6а, б, с). Распределения случайных величин подчиняются нормальному закону (Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test, $p > 0.05$) при близости распределения индивидуальных значений (рис. 6д, е, ф). Параметры H_{90} , H_{50} и W , полученные с помощью автоматического

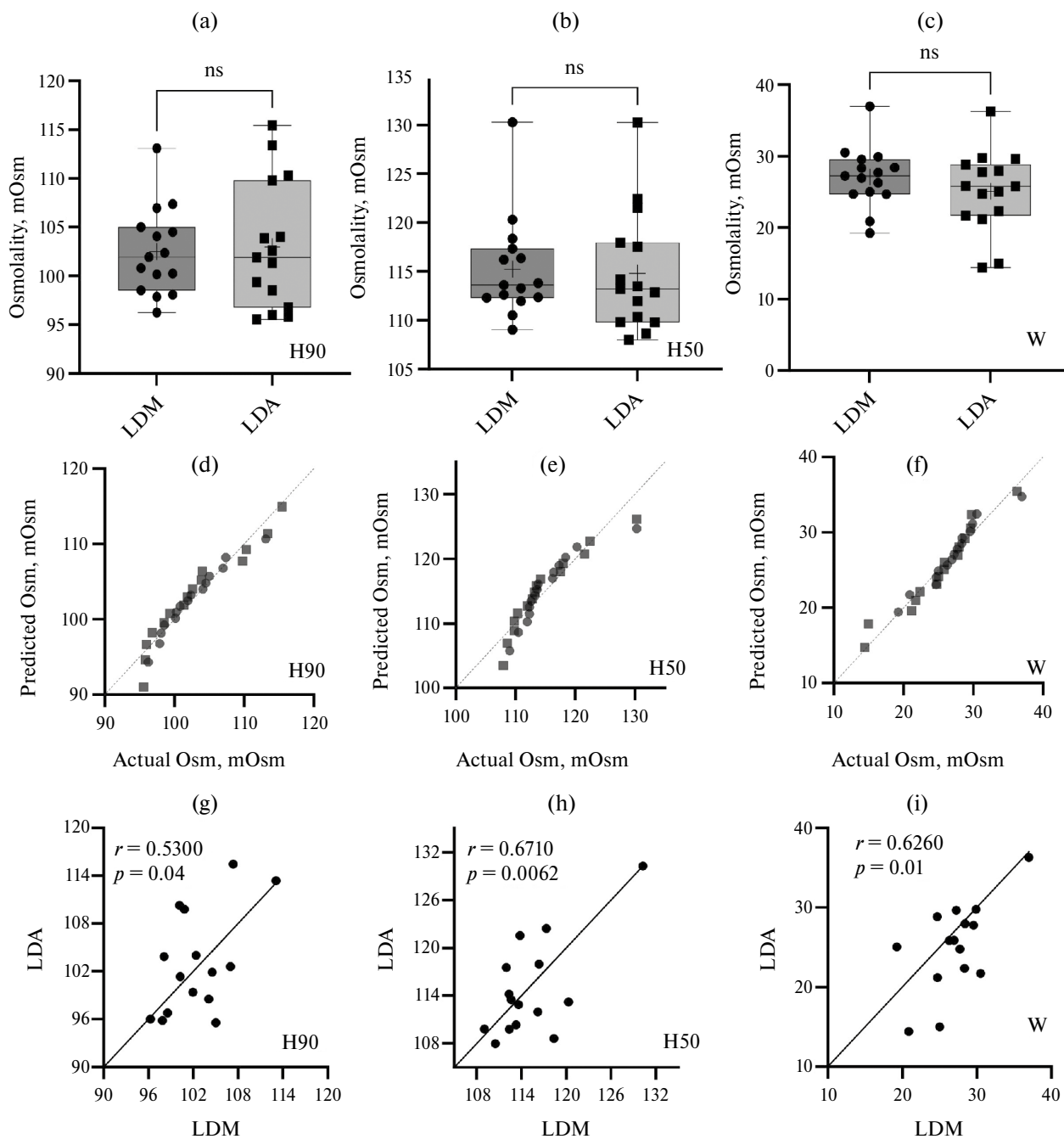


Рис. 6. Сравнение результатов автоматического и мануального методов лазерной дифракции при анализе осмотической резистентности эритроцитов человека. (а) — сравнение результатов по H_{90} . (б) — сравнение по H_{50} . (с) — сравнение по W . Усы — минимум и максимум, + — среднее значение, $n = 15$, ns — $p > 0.05$, Paired t test. (д) — QQ-plot для H_{90} . (е) — QQ-plot для H_{50} . (ф) — QQ-plot для W . Predicted — квантили стандартного нормального распределения. (г) — корреляции между мануальным и автоматическим методами по параметрам H_{90} . (h) — корреляция по H_{50} . (i) — корреляция по W . левый верхний угол — Pearson r и p -value. LDM — мануальный метод лазерной дифракции, LDA — автоматический метод лазерной дифракции.

метода, коррелируют с соответствующими параметрами для мануального метода (рис. 6g, h, i).

Для эритроцитов крыс статистически достоверных различий между методами по параметрам H_{90} , H_{50} и W не выявлено (рис. 7a, b, c). Распределения подчиняются нормальному закону (Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test, $p > 0.05$), распределения для обоих методов близки друг к другу на прямой нормального распределения (рис. 6d, e, f).

Оценка осмотической резистентности эритроцитов человека и крысы при помощи мануального и автоматического методов лазерной дифракции привела к статистически близким результатам по всем оцениваемым параметрам. Основные преимущества автоматического варианта метода: сокращение времени проведения эксперимента, снижение вероятности человеческой ошибки, отсутствие влияния на результат ошибок пипетирования и суспендирования, снижение трудозатратности эксперимента.

Сравнение осмотической резистентности эритроцитов различных таксонов позвоночных. Провели сравнительный анализ осмотической устойчивости эритроцитов различных таксонов позвоночных для выявления видовых и групповых особенностей. Использовали мануальный метод лазерной дифракции, так как он позволяет провести оценку устойчивости при физиологических температурах и также ранее уже был успешно применен для оценки осмотической резистентности эритроцитов человека и животных [37, 44]. Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимые различия между группами по параметрам H_{90} ($F_{(5,54)} = 369.5$, $p < 0.001$), H_{50} ($F_{(5,54)} = 350.0$, $p < 0.001$) и W ($F_{(5,54)} = 19.50$, $p < 0.001$). Осмотическая устойчивость эритроцитов человека и крысы не отличается по параметрам H_{90} и H_{50} , однако эритроциты крысы превосходят эритроциты человека по параметру W (рис. 8a, b, c). У птиц параметры H_{50} и W превосходят таковые для млекопитающих, однако, несмотря на существенный рост W , ста-

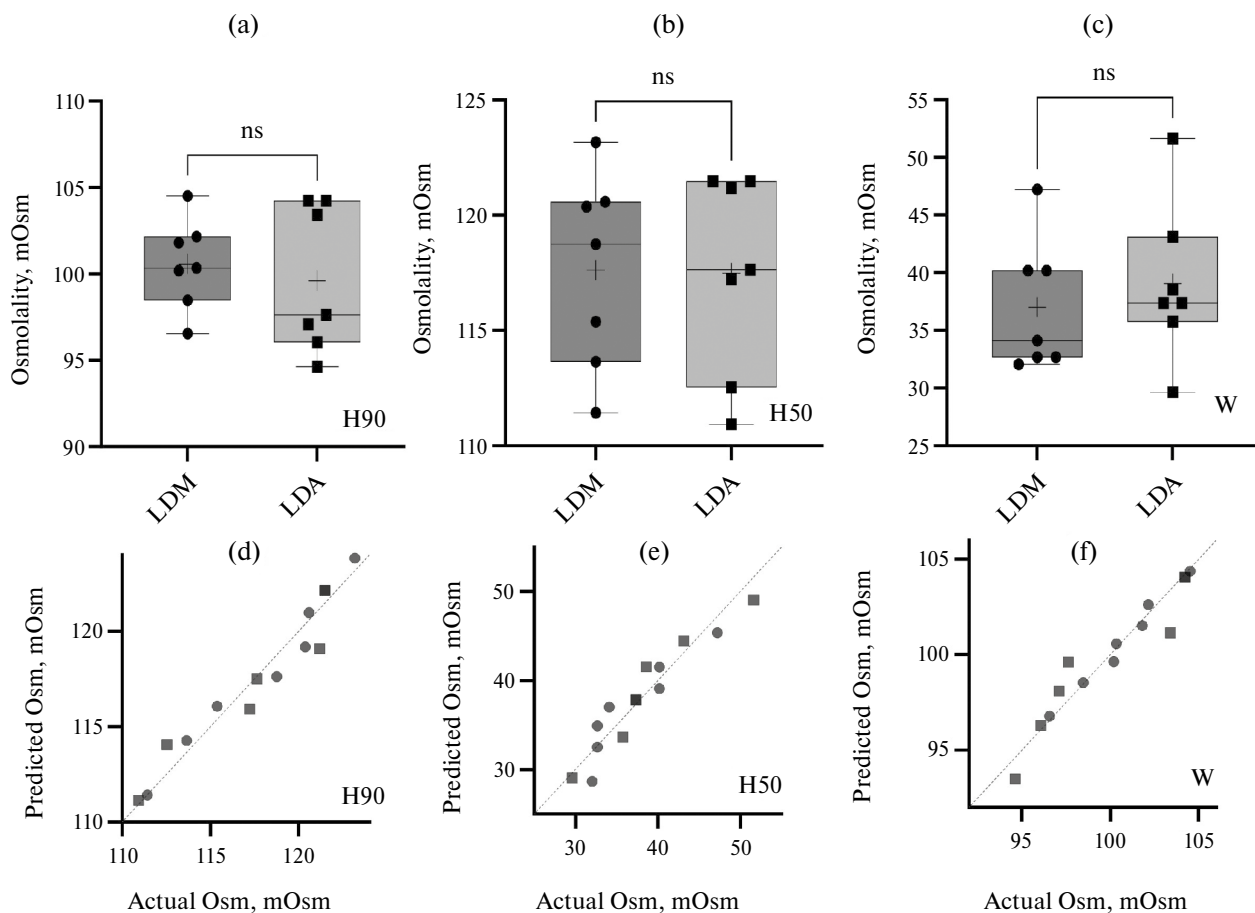


Рис. 7. Сравнение результатов автоматического и мануального методов лазерной дифракции при анализе осмотической резистентности эритроцитов крыс. (a) — сравнение результатов по H_{90} , (b) — сравнение по H_{50} , (c) — сравнение по W . Усы — минимум и максимум, + — среднее значение, $n = 7$, ns — $p > 0.05$, Paired t test. (d) — QQ-plot для H_{90} , (e) — QQ-plot для H_{50} , (f) — QQ-plot для W . Predicted — квантили стандартного нормального распределения.

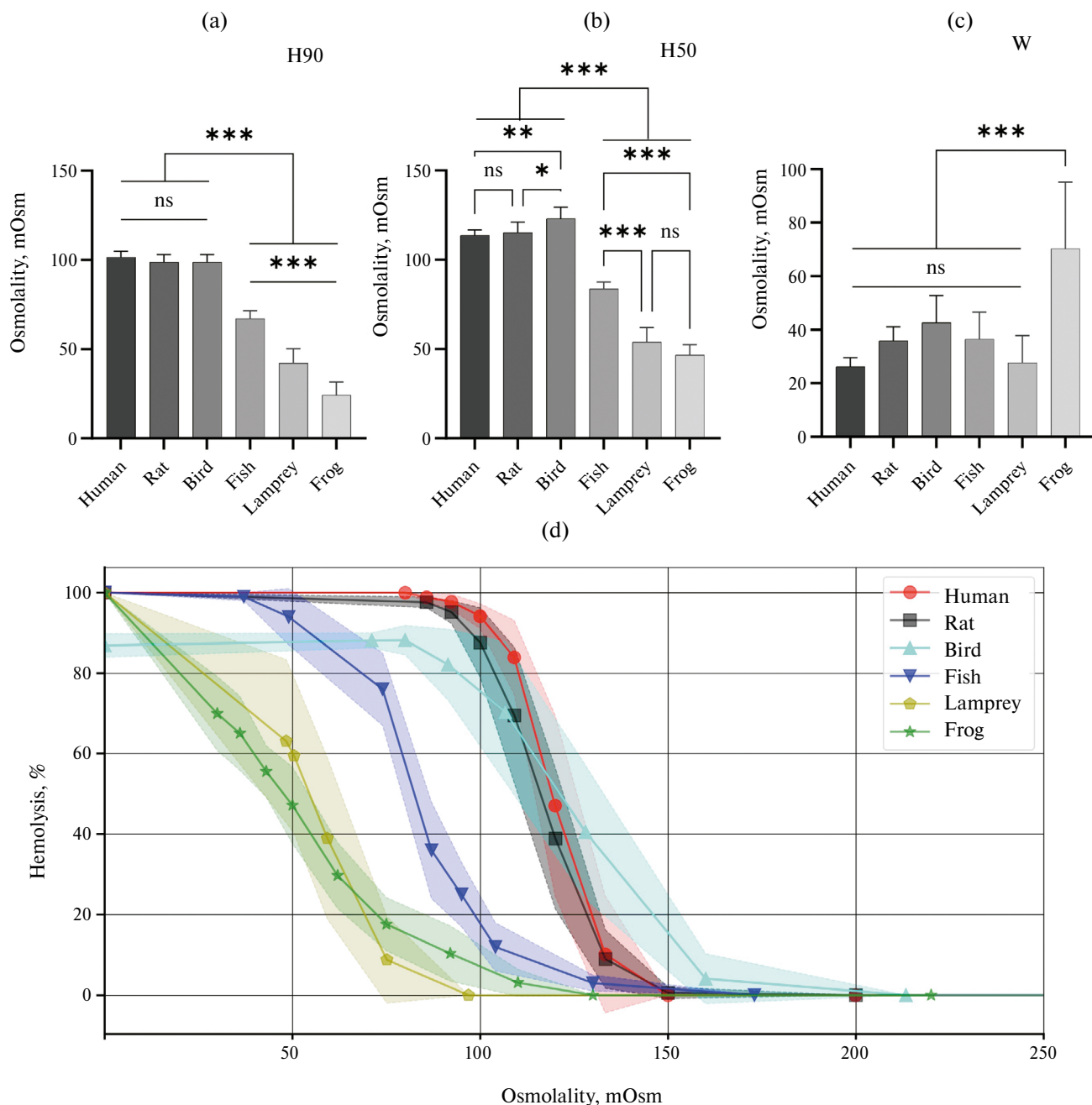


Рис. 8. Сравнение осмотической резистентности эритроцитов различных видов позвоночных. (a) — сравнение результатов по H_{90} . (b) — сравнение по H_{50} . (c) — сравнение по W . Температуры: 15°C для *Lampetra fluviatilis* ($n = 30$), 16°C для *Carassius carassius* ($n = 12$), 18°C для *Rana ridibunda* ($n = 15$), 41°C для *Coturnix japonica domestica* ($n = 6$) и 37°C для млекопитающих ($n = 15$ для *Homo sapiens*, $n = 7$ для *Rattus norvegicus*). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). ns — $p > 0.05$, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, Tukey's multiple comparisons test. (d) — зависимости процента лизиса (Lys) от осмоляльности среды (Osm). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). Использован мануальный метод лазерной дифракции.

тистически значимые различия выявлены только для H_{50} по причине высокой дисперсии параметра W и поправки на множественные сравнения (рис. 8b, c). Для птиц также выявлена устойчивая к гипоосмотическому лизису популяция эритроцитов

(Lys_{max}), которая составляет для исследованного вида $13.2 \pm 3.2\%$. Для эритроцитов амфибий, миног и рыб получены существенно более низкие значения H_{50} и H_{90} , чем для эритроцитов птиц и млекопитающих.

Осмоляльность плазмы крови отличается между различными таксонами позвоночных животных, ввиду чего снижение концентрации солей на одну и ту же величину для различных видов ведет к

различному падению осмоляльности относительно физиологической. Как следствие, сравнение осмотической резистентности в абсолютных величинах может не отражать действительную устойчивость

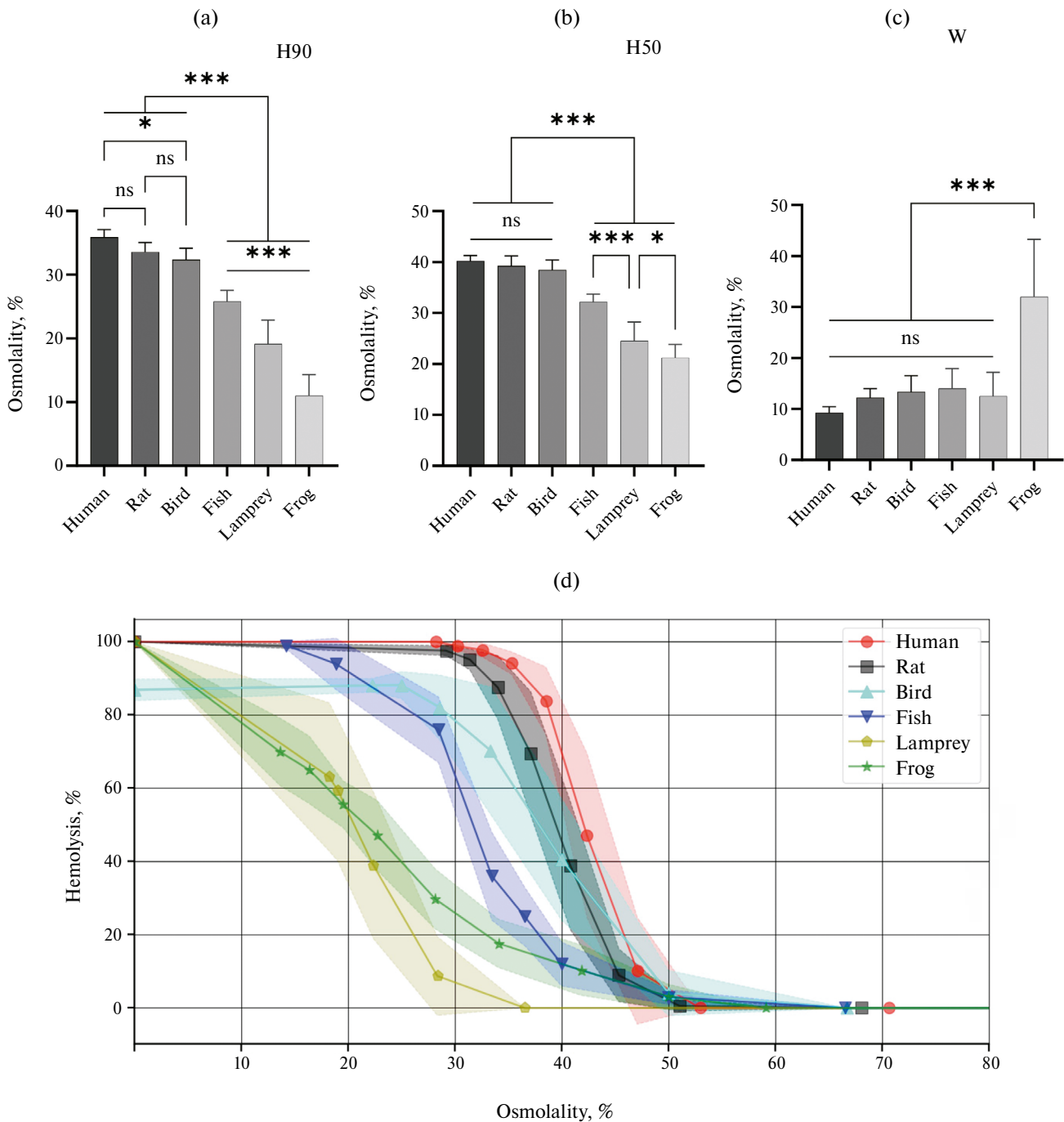


Рис. 9. Сравнение осмотической резистентности эритроцитов различных видов позвоночных в %-х от исходной осмоляльности. (a) — сравнение результатов по H_{90} . (b) — сравнение по H_{50} . (c) — сравнение по W. Температуры и физиологические осмоляльности: 15°C и 260 мОсм для *Lampetra fluviatilis* ($n = 30$), 16°C и 260 мОсм для *Carassius carassius* ($n = 12$), 18°C и 220 мОсм для *Rana ridibunda* ($n = 15$), 41°C и 320 мОсм для *Coturnix japonica* ($n = 6$), 37°C и 283 мОсм для *Homo sapiens* ($n = 15$), 37°C и 294 мОсм для *Rattus norvegicus* ($n = 7$). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). ns — $p > 0.05$, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, Tukey's multiple comparisons test. (d) — зависимости процента лизиса (Lys) от осмоляльности среды (Osm). Полупрозрачное облако — стандартное отклонение (sd). Использован мануальный метод лазерной дифракции.

клеток к перепадам в концентрациях солей относительно их нормальной концентрации. Более осмотически резистентные в абсолютных величинах (mOsm) эритроциты могут быть менее резистентны в величинах относительных (доля или процент от исходной осмоляльности плазмы) и наоборот. Чтобы проверить данную гипотезу, оценили осмотическую резистентность исследуемых таксонов в относительных величинах (рис. 9). При данном подходе различия между эритроцитами птиц и млекопитающих снижаются по H_{50} и W , однако статистически значимо возрастают по H_{90} . Так же возрастают различия по H_{50} между эритроцитами миног и земноводных. Еще более возрастает гетерогенность (W) популяции эритроцитов земноводных относительно гетерогенности эритроцитов других таксонов.

Параметр W у эритроцитов земноводных обладает значительно большим значением стандартного отклонения (sd) (рис. 8с, рис. 9с). Как следствие, невозможно выявить значимость различий по данному параметру между эритроцитами других исследованных таксонов. Дополнительное сравнение осмотической резистентности эритроцитов высших позвоночных (млекопитающих и птиц) по параметру W выявило значимые различия между эритроцитами крысы и человека, а также между эритроцитами человека и птиц (как в абсолютных, так и в относительных величинах) (рис. 10а, б). Гетерогенность популяции эритроцитов крыс и птиц не отличается статистически значимо.

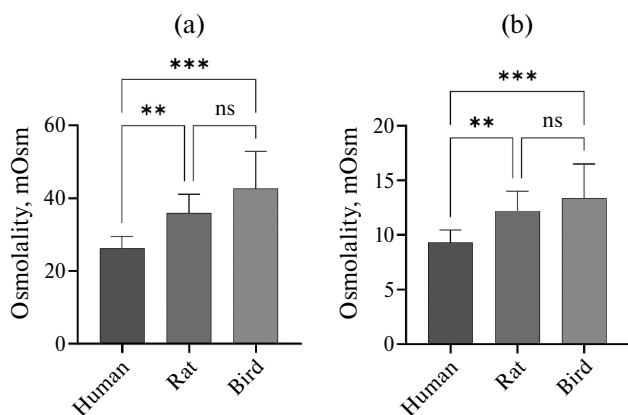


Рис. 10. Сравнение гетерогенности популяции эритроцитов высших позвоночных по устойчивости к гипоосмотическому лизису. (а) — сравнение в абсолютных величинах (mOsm). (б) — сравнение в относительных величинах (процент от физиологической осмоляльности плазмы). Температуры и физиологические осмоляльности: 41°C и 320 мОсм для *Coturnix japonica* ($n = 6$), 37°C и 283 мОсм для *Homo sapiens* ($n = 15$), 37°C и 294 мОсм для *Rattus norvegicus* ($n = 7$). Использован мануальный метод лазерной дифракции. ns — $p > 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, Tukey's multiple comparisons test.

Эритроциты амфибий наиболее осмотически резистентны по совокупности всех исследованных параметров (как в среднем, то есть по H_{50} , так и по границам осмоляльностей, в которых протекает гипоосмотический лизис — W). Лизис эритроцитов *Rana ridibunda* наблюдается почти сразу после начала снижения осмоляльности от физиологической. Тем не менее, часть популяции клеток лизирует только при очень низких осмоляльностях. Эритроциты миног продемонстрировали более высокую осмотическую резистентность в сравнении с эритроцитами рыб. Высшие позвоночные (млекопитающие и птицы) значительно менее резистентны в сравнении с низшими (миноги, рыбы, амфибии). Различия по осмотической резистентности между эритроцитами птиц и млекопитающих неоднозначны: эритроциты птиц менее устойчивы по значению половинного лизиса в абсолютных величинах, но статистически значимо не отличаются в величинах относительных. Эритроциты *Rattus norvegicus* и *Coturnix japonica* схожи по гетерогенности популяции и существенно превосходят по данному параметру эритроциты человека. Форма лизисной кривой схожа для всех исследованных таксонов, кроме птиц (по причине наличия устойчивой к лизису популяции клеток) и земноводных (более близкая к линейной зависимость, вызванная высокой гетерогенностью).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Осморегуляция — сложный физиологический процесс, заключающийся в поддержании относительного баланса воды и электролитов между внутри- и внеклеточными жидкостями. Осмотическая резистентность эритроцитов, то есть их способность претерпевать изменения осмоляльности плазмы в специфическом для конкретного вида диапазоне, связана с деформируемостью их мембраны [1]. Широко известно, что деформируемость определяется множеством факторов, однако наиболее значимым из них является поддержание структуры спектриновой решетки и стабильности ее связей с мембраной [6]. Различия эритроцитов различных таксонов животных по деформируемости и осмотической резистентности, как следствие, могут быть обусловлены разницей в структуре и составе цитоскелета, степенью фосфорилирования входящих в его состав белков [45]. Механизмы осморегуляции схожи у миног и кистеперых рыб [46], однако эритроциты *Carassius Carassius* оказались существенно менее резистентны, чем эритроциты *Lampetra fluviatilis*. Данная особенность может быть следствием дефицита band 3 в мембране эритроцитов миног, приводящего к слабой связи между цито-

скелетом и мембраной. Кроме того, цитоскелет миног обеднен анкирином, который так же участвует в закреплении цитоскелета на мембрану через анкириновый комплекс [47]. Другой возможной причиной межвидового разнообразия может быть белок 4.1R, который у позвоночных имеет спектрин-актин-связывающий домен (SAB) [48]. Данный белок усиливает связь между актином и спектрином, а его собственная активность зависит от степени фосфорилирования [49]. Кроме того, он связывает фосфатидилсерин, который при дефиците белка 4.1R переходит на внешнюю мембрану эритроцита, дестабилизируя ее [37, 50]. Так же деформируемость зависит от наличия ядра: ядерные клетки обладают дополнительными цитоскелетными связями, проходящими через ядро и микротрубочки, что теоретически может привести к снижению деформируемости [22, 47]. Эритроциты *Carassius Carassius* и эритроциты *Lampetra fluviatilis* являются ядерными, но слабые связи цитоскелета с ядром по причине дефицита band 3 и анкирина, вероятно, могут приводить к меньшему снижению осмотической резистентности у эритроцитов миног [47].

Осмотическая резистентность эритроцитов *Carassius Carassius* и *Lampetra fluviatilis* значительно превосходит резистентность эритроцитов птиц и млекопитающих. Существование в водной среде приводит к развитию особых механизмов осморегуляции. Рыбы живут в постоянном контакте с средой, осмоляльность которой существенно отличается от осмоляльности их плазмы [51]. У пресноводных рыб, включая *Carassius Carassius*, содержание соли в плазме обычно минимум в 100 раз выше, чем в окружающей среде, что компенсируется выработкой большого объема гипотонической мочи [52]. Одно- и двухвалентные ионы реабсорбируются эпителием почек и активно поглощаются через жабры и кишечник из окружающей среды и пищи [52]. Морские виды рыб, напротив, вынуждены компенсировать потерю воды и накопление неорганических ионов [51]. Так, например, известно, что эритроциты морских рыб менее устойчивы,

чем эритроциты наземных млекопитающих, а эритроциты пресноводных рыб демонстрируют существенно большую устойчивость в сравнении с пресноводными рыбами [53]. Подобная разница между осмотической резистентностью пресноводных и морских животных наблюдается повсеместно: эритроциты большинства морских беспозвоночных обладают низкой осмотической резистентностью [54], для большинства пресноводных видов рыб и амфибий H_{50} ниже 150 мОсм [55, 56], для морских рыб — значительно выше 160 мОсм [53, 56]. Особенно низкая осмотическая резистентность характерна для хрящевых рыб (акулы и скаты) [56], что объясняется очень высокой осмоляльностью их плазмы крови, достигаемой благодаря использованию мочевины в качестве осмолита [57]. Осмоляльность плазмы хрящевых рыб может превышать осмоляльность морской воды — так, например, известно, что осмоляльность плазмы *Triakidae* составляет 1000 мОсм при осмоляльности морской воды 988 мОсм [58]. Следовательно, эритроциты хрящевых рыб не подвержены дегидратации даже в очень соленых водах [57].

Объем эритроцитов коррелирует с их осмотической устойчивостью. Так, например, эритроциты овец обладают одновременно одними из самых низких значений как MCV, так и осмотической резистентности [59]. Возможная причина: для прохождения по микроциркуляции эритроциты меньшего диаметра не нуждаются в высокой деформируемости в той же степени, в которой она необходима более крупным эритроцитам [60]. Значения MCV для исследованных видов приведены в Таблице 1.

В нашем исследовании различия между эритроцитами *Homo sapiens* и *Rattus norvegicus* по осмоляльности, при которой регистрируется лизис половины клеток, статистически незначимы. В более ранних работах, однако, отмечается, что осмотическая устойчивость эритроцитов крысы значимо ниже, чем у эритроцитов человека, что может быть следствием несоблюдения физиологической температуры проведения эксперимента или большим размером выборки [66]. Тем не менее, построенная лизисная кривая смещена в область более высоких осмоляльностей. Меньшая осмотическая резистентность эритроцитов крыс может быть обусловлена их меньшим объемом в сравнении с эритроцитами человека [64, 66]. Популяция эритроцитов крыс, однако, лизирует в более широких границах осмоляльностей. Известно, что эритроциты крыс обладают меньшей деформируемостью, что обусловлено не только размером их клеток, но и повышенной кальций-индуцированной микровезикуляцией мембраны (в сравнении с эритроцитами человека) [66]. Концентрация внутрикле-

Таблица 1. MCV исследованных видов позвоночных*

Название вида	MCV, fL	Источник
<i>Rana ridibunda</i>	—	[61]
<i>Lampetra fluviatilis</i>	189	[62]
<i>Carassius carassius</i>	242.54 ± 53.28	[63]
<i>Homo sapiens</i>	91.0 ± 5.2	[64]
<i>Rattus norvegicus</i>	61.7 ± 3.6	[64]
<i>Coturnix japonica</i>	136.7 ± 0.7	[65]

* Виды приведены в порядке роста параметра H_{50} .

точного кальция в эритроцитах крыс существенно превосходит концентрацию в эритроцитах человека [67]. Кроме того, эритроциты крыс более подвержены влиянию экзогенного кальция [68]. Все наши эксперименты, однако, были выполнены в безкальциевой среде для сохранения постоянства условий для всех исследуемых таксонов, ввиду чего влияние экзогенного кальция на результат исключено.

Наибольшая осмотическая резистентность зарегистрирована у эритроцитов *Rana ridibunda* — вида, относящегося к водным амфибиям. Как уже было отмечено, размер клеток является значимым фактором, существенно влияющим на осмотическую резистентность [59]. Эритроциты амфибий в среднем являются крупнейшими среди эритроцитов позвоночных [69]. Так, например, объем эритроцитов *Pelophylax nigromaculatus* составляет 1737.5 ± 299.3 fL, существенно превышая объем эритроцитов человека (90.5 ± 11.4 fL) [70]. Известно так же, что эритроциты некоторых видов *Amphiuma* могут достигать объема более 10000 fL [69]. Хотя нет точных данных о объеме эритроцитов *Rana ridibunda*, известны значения MCV для множества других видов лягушек, включая близкородственный вид *Rana dalmatina* (486.19 ± 74.30 fL) [61]. Форма лизисной кривой у эритроцитов *Rana ridibunda* отличается от сигмоидной (начало лизиса почти в самом начале разбавления, окончание лизиса при очень низких концентрациях осмолитов). Высокая гетерогенность по степени устойчивости, возможно, обусловлена митозом и амитозом эритроцитов в циркуляции крови и, как следствие, высокой дисперсией клеток по размеру [71]. Кроме того, хотя большая часть эритроцитов амфибий обладает ядром, встречаются так же и безъядерные (у некоторых видов *Bolitoglossini* более 80% эритроцитов) [72]. Известно так же, что эритроциты наземных амфибий обладают существенно меньшей осмотической резистентностью, чем эритроциты водных, однако в среднем они более устойчивы, чем эритроциты птиц, рептилий и млекопитающих [20].

Температура также оказывает влияние на осмотическую резистентность и деформируемость эритроцитов всех видов позвоночных [21, 73], что может быть обусловлено реорганизацией цитоскелета и нарушениями функций его белков [74]. Для большинства позвоночных снижение температуры ведет к быстрому снижению устойчивости клеток, однако встречаются и обратные варианты, при которых резистентность растет при падении температуры. Так, например, известно, что эритроциты крыс, кроликов, морских свинок [75], овец и коз [76], домашних куриц и цесарок [73] становятся менее осмотически устойчивы при более низких температурах. Схоже ведут себя и эритроциты ам-

фибий [21]. Однако, встречается и обратная зависимость: эритроциты верблюдов и уток [77] менее устойчивы при повышении температуры, что может быть адаптацией к резким температурным перепадам (резкое похолодание ночью в пустыне, погружение в холодную воду). Экотермные животные нуждаются в особых механизмах защиты эритроцитов от осмотического лизиса вследствие снижения или повышения температуры плазмы, что может быть еще одним фактором, приводящим к развитию повышенной осмотической резистентности их эритроцитов [21]. Исследованные в данной работе экотермные животные (миноги, рыбы, амфибии) обладают значительно более высокой осмотической резистентностью эритроцитов в сравнении эндотермными (млекопитающие, птицы). Особенно выделяются эритроциты амфибий, что может быть вызвано существенным снижением температуры в ходе анабиоза [78, 79].

Известно, что эритроциты различных таксонов могут так же отличаться по доминирующему внутриклеточному катиону. Так, например, в эритроцитах человека, кролика, свиньи, морской свинки и крысы наблюдается повышенная концентрация внутриклеточного калия (клетки НК типа), а в эритроцитах собак, кошек, овец и коров — внутриклеточного натрия (LK тип) [59, 80]. Влияние данного фактора на осмотическую резистентность или объем клеток, однако, не прослеживается. Эритроциты собак относительно крупные (60-75 fL) [81] и одни из наиболее осмотически устойчивых среди эритроцитов млекопитающих [59]. Эритроциты овец — напротив, обладают низким объемом (29.0 ± 0.41) [60] и низкой осмотической резистентностью [59, 76]. Кроме того, наблюдается стабильное увеличение оттока калия из НК клеток при повышении температуры. В случае LK эритроцитов кошек и собак отток натрия обладает максимумом при 37°C [80]. Тем не менее, влияния данного фактора на осмотическую резистентность также, вероятно, несущественно (эритроциты верблюдов относятся к НК типу) [82].

Эритроциты птиц существенно отличаются от эритроцитов млекопитающих. $13.2 \pm 3.2\%$ эритроцитов *Coturnix japonica domestica* не подвержены гипосмотическому лизису. Тем не менее, степень гемолиза эритроцитов птиц может варьироваться в зависимости от резкости перехода с высокой на более низкую осмоляльность [22]. Показано, что эритроциты домашней курицы не лизируют до 100% при разведении в чистой воде, однако лизируют в мягких гипотонических условиях [22]. В данной работе осмоляльность снижалась в одной кювете (пробирке) с лагом приблизительно 2 минуты, процент лизиса фиксировался после каждого

шага разбавления. Половинный лизис для эритроцитов птиц оценивался, как лизис половины той части популяции клеток, которая подвержена гипоосмотическому лизису. При данном подходе эритроциты *Coturnix japonica domestica* демонстрируют меньшую осмотическую устойчивость в сравнении эритроцитами млекопитающих по осмоляльности, соответствующей половинному лизису. Эритроциты *Coturnix japonica domestica* обладают овальной формой, содержат ядро и митохондрии [83], что может быть причиной их сниженной устойчивости. Так, например, известно, что эритроциты тех птиц, клетки которых имеют более шарообразную и близкую к эритроцитам млекопитающих форму, менее подвержены гипоосмотическому лизису [83]. Тем не менее, эритроциты *Coturnix japonica domestica* нельзя однозначно назвать менее осмотически резистентными в сравнении с эритроцитами человека и крысы ввиду существенно более широких границ осмоляльностей, при которых наблюдается лизис, а также наличия устойчивой к лизису части популяции клеток. Возможно, что причина резистентности эритроцитов птиц к гемолизу в чистой воде, а так же причина вариативности степени лизиса от разбавления среды, заключаются в наличии обнаруженных в мембране эритроцитов курицы неактивных/нефункциональных аквапоринов, которые необходимы для адаптации к длительным перелетам, в ходе которых птицы потребляют только бессолевую влагу [22, 84].

Состав жирных кислот фосфолипидного бислоя эритроцитов является одним из факторов, влияющих на текучесть мембраны, однако в исследованиях последних лет было показано, что деформируемость/гибкость мембраны эритроцитов в первую очередь определяется структурой цитоскелета клеток и, в меньшей степени, составом самого фосфолипидного бислоя. Именно цитоскелет определяет морфологию, размер и биомеханические свойства мембран эритроцитов [85, 86]. У животных данных по осмотической устойчивости эритроцитов значительно меньше, но для них также предполагается преимущественное влияние цитоскелета на биофизические свойства мембраны эритроцитов. Например, эритроциты курицы были отмечены как более устойчивые к гидродинамическому разрушению по сравнению с эритроцитами рыбы, что было связано с повышенным содержанием спектрина [87]. При исследовании влияния жирнокислотного состава мембран эритроцитов у разных животных, был сделан вывод, что что бислой жирных кислот является второстепенным фактором, влияющим на гибкость эритроцитов, в части их влияния на текучесть мембраны [88].

Результаты проведенного исследования показали, что эритроциты пресноводных низших позвоночных (рыбы, многои, амфибии) в среднем обладают большей осмотической резистентностью в сравнении с эритроцитами высших (птицы, млекопитающие). Работы, в которых рассматривались пресмыкающиеся, так же подтверждают наши результаты, хотя пресмыкающиеся и занимают промежуточное положение по степени устойчивости эритроцитов [20]. Подобная градация может быть обусловлена следующими основными факторами.

1) Осмотическая резистентность зависит от температуры как для эндотермных животных, так и для эктотермных [21]. Повышенная осмотическая устойчивость эндотермных животных позволяет компенсировать ту разницу в резистентности, которая возникает из-за значительных перепадов температур. 2) Так как кожа пресмыкающихся (в отличие от кожи амфибий) водонепроницаема, не только наземные, но и околводные рептилии менее зависимы от количества солей, растворенных в воде. Как следствие, у них нет необходимости в механизмах, обеспечивающих сопоставимо высокую осмотическую резистентность клеток. 3) Так как раннее развитие анэмний всегда протекает в водной среде, они особенно остро нуждаются в возможности обеспечить высокую устойчивость эритроцитов к колебаниям осмоляльности, в то время как амниоты, включая пресмыкающихся, защищены от прямого воздействия водной среды на ранних стадиях жизненного цикла. Тем не менее, предложенной закономерности не подчиняются морские низшие позвоночные, для которых характерна сниженная осмотическая резистентность по причине высокой концентрации растворенных в воде солей.

Представленный и апробированный в данной работе метод лазерной дифракции позволил количественно оценить осмотическую устойчивость эритроцитов человека и животных при соблюдении физиологических температур для каждого исследованного таксона, что было затруднено или невозможно при использовании проточной цитометрии [34], спектрофотометрии [33], эктацитометрии [23] или оценке гипоосмотического лизиса в микроканалах [35]. Разработанный метод, возможно, обладает большим клиническим и исследовательским потенциалом, чем спектральный тест на осмотическую резистентность и цитометрический метод Won и Suh. Спектральный тест опирается на графическое нахождение зависимости процента лизированных клеток от осмоляльности. Цитометрический метод, предложенный Won и Suh, позволяет определить лишь отношения количества клеток до и после разбавления раствора. Мы предлагаем математическое описание процесса гипоосмотиче-

ского лизиса эритроцитов, при котором возможен численный расчет процента лизиса при любой заданной осмоляльности. Описанный математический алгоритм характеристики осмотической резистентности применим не только для обработки данных, полученных с помощью лазерного анализатора, но и для исследований, проводимых на спектрофотометре или проточном цитометре, что способствует унификации получаемых результатов и, как следствие, к возможности сравнения данных, получаемых в различных лабораториях. Контрольные эксперименты по модифицированным методам проточной цитометрии и спектрофотометрии дали результаты, близкие к результатам мануального метода лазерной дифракции, а полученные при помощи последнего данные о осмотической резистентности эритроцитов животных совпадают с данными ранее проведенных исследований близких таксонов. Результаты автоматического метода лазерной дифракции коррелируют с результатами мануального метода. Кроме того, в дальнейшем также планируется модификация протокола автоматического метода, которая позволит по результатам одного эксперимента получить не только информацию о осмотической резистентности эритроцитов, но зависимости изменения их формы и объема от осмоляльности среды [36]. На текущий момент опубликовано достаточно мало сравнительных исследований, посвященных осмотической резистентности эритроцитов различных животных, а имеющиеся данные часто получены при использовании различных сред, температур, рН, различных методов анализа и обработки данных. Разработанный протокол позволит унифицировать подход к оценке осмотической резистентности эритроцитов, а также существенно сократить время проведения исследования. Важной областью приложения фундаментальных исследований состояния клеток крови различных классов животных также является мониторинг состояния окружающей среды. Воздействие загрязнителей из сточных вод [89], попадание в среду фармакологических препаратов [90], аноксия, осмотический стресс и другие факторы могут приводить к изменению функции клеток [91]. С этой точки зрения данные о нормальном физиологическом ответе эритроцитов различных видов животных и человека на осмотический стресс могут в дальнейшем служить референсным уровнем при экологических исследованиях.

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

Пресноводные низшие позвоночные (рыбы, млекопитающие) обладают более осмотически резистентными эритроцитами, чем высшие позвоночные (птицы, млекопитающие).

Показаны преимущества метода лазерной дифракции для оценки биофизических параметров эритроцитов (скорость гемолиза, завершенность гемолиза, степень гетерогенности популяции клеток по степени устойчивости к гипоосмотической среде) по сравнению с методами спектрофотометрии и проточной цитометрии.

Разработаны температурные протоколы для проведения гипоосмотического теста у различных видов животных.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и дизайн эксперимента (Б.А.Г., И.В.М.), постановка экспериментов (Б.А.Г., А.Ю.А., А.А.В.), сбор данных (Б.А.Г., А.Ю.А., Е.А.С., А.А.В.), обработка данных (Б.А.Г., А.Ю.А.), написание и редактирование текста (Б.А.Г., Е.А.С., И.В.М., С.П.Г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол №1-2/ 2024 заседания №1 Комиссии по Биоэтике от 31.01.2024 г., утвержденный Приказом Директора ИЭФБ РАН №8 от 30.01.2024 г.).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все процедуры так же одобрены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол N 1–04 от 7 апреля 2022).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работы, связанные с лазерной дифракцией, поддержаны грантом РНФ 23-15-00142. Работы с животными поддержаны гос. заданием № 075-00264-24-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R (2018) Squeezing for Life — Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol* 9:656. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656>

2. *Skverchinskaya E, Levdarovich N, Ivanov A, Mindukshev I, Bukatin A* (2023) Anticancer Drugs Paclitaxel, Carboplatin, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Alter the Biophysical Characteristics of Red Blood Cells, *in vitro*. *Biology (Basel)* 12:230.
<https://doi.org/10.3390/biology12020230>
3. *Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G* (2017) Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus Med Hemother* 44:183–187.
<https://doi.org/10.1159/000452106>
4. *Baskurt OK, Meiselman HJ* (2003) Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29:435–450.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-44551>
5. *Ok B* (2008) In vivo correlates of altered blood rheology. *Biorheology* 45:
6. *Lux SE* (2016) Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* 127:187–199.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>
7. *Mohandas N, Gallagher PG* (2008) Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112:3939–3948.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
8. *Klei TRL, Meinderts SM, van den Berg TK, van Bruggen R* (2017) From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol* 8:
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00073>
9. *Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N* (2008) Hereditary spherocytosis. *Lancet* 372:1411–1426.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61588-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61588-3)
10. *Vayá A, Suescun M, Pardo A, Fuster O* (2014) Erythrocyte deformability and hereditary elliptocytosis. *Clin Hemorheol Microcirc* 58:471–473.
<https://doi.org/10.3233/CH-141889>
11. *Glogowska E, Lezon-Geyda K, Maksimova Y, Schulz VP, Gallagher PG* (2015) Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 126:1281–1284.
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-657957>
12. *Bunyaratvej A, Butthep P, Sae-Ung N, Fucharoen S, Yuthavong Y* (1992) Reduced Deformability of Thalassaemic Erythrocytes and Erythrocytes With Abnormal Hemoglobins and Relation With Susceptibility to Plasmodium falciparum Invasion. *Blood* 79:2460–2463.
<https://doi.org/10.1182/blood.V79.9.2460.2460>
13. *Vayá A, Collado S, Dasí MA, Pérez ML, Hernandez JL, Barragán E* (2014) Erythrocyte deformability and aggregation in homozygous sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 58:497–505.
<https://doi.org/10.3233/CH-131717>
14. *Mercke CE* (1981) Anaemia in patients with solid tumours and the role of erythrocyte deformability. *Br J Cancer* 44:425–432
15. *Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent J-L* (2003) Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med* 29:1052–1061.
<https://doi.org/10.1007/s00134-003-1783-2>
16. *Nemeth N, Peto K, Magyar Z, Klarik Z, Varga G, Oltean M, Mantas A, Czigany Z, Tolba RH* (2021) Hemorheological and Microcirculatory Factors in Liver Ischemia-Reperfusion Injury—An Update on Pathophysiology, Molecular Mechanisms and Protective Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 22:1864.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041864>
17. *Varga A, Matrai AA, Barath B, Deak A, Horvath L, Nemeth N* (2022) Interspecies Diversity of Osmotic Gradient Deformability of Red Blood Cells in Human and Seven Vertebrate Animal Species. *Cells* 11:1351.
<https://doi.org/10.3390/cells11081351>
18. *Waymouth C* (1970) Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In Vitro* 6:109–127.
<https://doi.org/10.1007/BF02616113>
19. *Matrai AA, Varga G, Tanczos B, Barath B, Varga A, Horvath L, Bereczky Z, Deak A, Nemeth N* (2021) In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species. *Clin Hemorheol Microcirc* 78:291–300.
<https://doi.org/10.3233/CH-211118>
20. *Aldrich K, Saunders D, Sievert L, Sievert G* (2006) Comparison of erythrocyte osmotic fragility among amphibians, reptiles, birds and mammals. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 109:149–158.
[https://doi.org/10.1660/0022-8443\(2006\)109\[149:COE-OFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1660/0022-8443(2006)109[149:COE-OFA]2.0.CO;2)
21. *Aldrich K, Saunders DK* (2001) Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. *Journal of Thermal Biology* 26:179–182.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(00\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(00)00040-1)
22. *Singh S, Ponnappan N, Verma A, Mittal A* (2019) Osmotic tolerance of avian erythrocytes to complete hemolysis in solute free water. *Sci Rep* 9:7976.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44487-7>
23. *Dobbe JGG, Hardeman MR* (2006) Red blood cell aggregation as measured with the LORCA. *Int J Artif Organs* 29:641–642; author reply 643
24. *Shin S, Hou JX, Suh JS, Singh M* (2007) Validation and application of a microfluidic ektacytometer (RheoScan-D) in measuring erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 37:319–328
25. *Dobbe JGG, Streekstra GJ, Hardeman MR, Ince C, Grimbergen CA* (2002) Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry* 50:313–325.
<https://doi.org/10.1002/cyto.10171>
26. *Föller M, Geiger C, Mahmud H, Nicolay J, Lang F* (2008) Stimulation of suicidal erythrocyte death by amantadine. *Eur J Pharmacol* 581:13–18.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.051>

27. *Hunt L, Greenwood D, Heimpel H, Noel N, Whiteway A, King M-J* (2015) Toward the harmonization of result presentation for the eosin-5'-maleimide binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Cytometry B Clin Cytom* 88:50–57. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21187>
28. *Yeow N, Tabor RF, Garnier G* (2017) Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Adv Colloid Interface Sci* 249:149–162. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.011>
29. *Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL* (1992) Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 79:1351–1358
30. *Lubiana P, Bouws P, Roth LK, Dörpinghaus M, Rehn T, Brehmer J, Wichers JS, Bachmann A, Höhn K, Roeder T, Thye T, Gutschmann T, Burmester T, Bruchhaus I, Metwalley NG* (2020) Adhesion between *P. falciparum* infected erythrocytes and human endothelial receptors follows alternative binding dynamics under flow and febrile conditions. *Sci Rep* 10:4548. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61388-2>
31. *Cluitmans JCA, Chokkalingam V, Janssen AM, Brock R, Huck WTS, Bosman GJCGM* (2014) Alterations in red blood cell deformability during storage: a microfluidic approach. *Biomed Res Int* 2014:764268. <https://doi.org/10.1155/2014/764268>
32. *Oonishi T, Sakashita K, Uyesaka N* (1997) Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am J Physiol* 273:C1828–1834. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.C1828>
33. *Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, Gregg JR, Chase AM* (1947) THE OSMOTIC RESISTANCE (FRAGILITY) OF HUMAN RED CELLS 1. *J Clin Invest* 26:636–640
34. *Won DI, Suh JS* (2009) Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry B Clin Cytom* 76:135–141. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20448>
35. *Zhan Y, Loufakis DN, Bao N, Lu C* (2012) Characterizing osmotic lysis kinetics under microfluidic hydrodynamic focusing for erythrocyte fragility studies. *Lab Chip* 12:5063–5068. <https://doi.org/10.1039/c2lc40522a>
36. *Mindukshev IV, Krivoslyk VV, Ermolaeva EE, Dobrylko IA, Senchenkov EV, Goncharov NV, Jenkins RO, Krivchenko AI* (2007) Necrotic and apoptotic volume changes of red blood cells investigated by low-angle light scattering technique. *Journal of Spectroscopy* 21:105–120. <https://doi.org/10.1155/2007/629870>
37. *Sudnitsyna J, Skverchinskaya E, Dobrylko I, Nikitina E, Gambaryan S, Mindukshev I* (2020) Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel)* 9:929. <https://doi.org/10.3390/antiox9100929>
38. *Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B* (2007) The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food Chem Toxicol* 45:1709–1718. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.005>
39. *Bonnet X, Billy G, Lakušić M* (2020) Puncture versus capture: which stresses animals the most? *J Comp Physiol B* 190:341–347. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01269-2>
40. *Goodhead LK, MacMillan FM* (2017) Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Adv Physiol Educ* 41:298–305. <https://doi.org/10.1152/advan.00083.2016>
41. *Fujii H, Nishikawa K, Na H, Inoue Y, Kobayashi K, Watanabe M* (2023) Numerical study of light scattering and propagation in soymilk: Effects of particle size distributions, concentrations, and medium sizes. *Infrared Physics & Technology* 132:104753. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2023.104753>
42. *Crump KS, Hoel DG, Langley CH, Peto R* (1976) Fundamental carcinogenic processes and their implications for low dose risk assessment. *Cancer Res* 36:2973–2979
43. *Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Millman KJ, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey CJ, Polat I, Feng Y, Moore EW, VanderPlas J, Laxalde D, Perktold J, Cimrman R, Henriksen I, Quintero EA, Harris CR, Archibald AM, Ribeiro AH, Pedregosa F, van Mulbregt P, SciPy 1.0 Contributors* (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods* 17:261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
44. *Mindukshev IV, Skverchinskaya EA, Khmelevskoy DA, Dobrylko IA, Goncharov NV* (2019) Acetylcholinesterase Inhibitor Paraoxon Intensifies Oxidative Stress Induced in Rat Erythrocytes In Vitro. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 1:85–91. <https://doi.org/10.1134/S1990747819010070>
45. *Nemeth N, Sogor V, Kiss F, Ulker P* (2016) Interspecies diversity of erythrocyte mechanical stability at various combinations in magnitude and duration of shear stress, and osmolality. *Clin Hemorheol Microcirc* 63:381–398. <https://doi.org/10.3233/CH-152031>
46. *Ferreira-Martins D, Wilson JM, Kelly SP, Kolosov D, McCormick SD* (2021) A review of osmoregulation in lamprey. *Journal of Great Lakes Research* 47:S59–S71. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.05.003>
47. *Hägerstrand H, Danieluk M, Bobrowska-Hägerstrand M, Iglíč A, Wróbel A, Isomaa B, Nikinmaa M* (2000) Influence of band 3 protein absence and skeletal structures on amphiphile- and Ca²⁺-induced shape alterations in erythrocytes: a study with lamprey (*Lampetra fluviatilis*), trout (*Onchorhynchus mykiss*) and human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes* 1466:125–138. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00184-X)

48. *Tang F, Lei X, Xiong Y, Wang R, Mao J, Wang X* (2014) Alteration Young's moduli by protein 4.1 phosphorylation play a potential role in the deformability development of vertebrate erythrocytes. *J Biomech* 47:3400–3407. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.07.022>
49. *Baines AJ, Lu H-C, Bennett PM* (2014) The Protein 4.1 family: Hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1838:605–619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.030>
50. *Jeremy KP, Plummer ZE, Head DJ, Madgett TE, Sanders KL, Wallington A, Storry JR, Gilsanz F, Delaunay J, Avent ND* (2009) 4.1R-deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins. *Haematologica* 94:1354–1361. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.006585>
51. *Evans TG* (2010) Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes. *J Fish Biol* 76:1903–1925. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02590.x>
52. *Al-Jandal NJ, Wilson RW* (2011) A comparison of osmoregulatory responses in plasma and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute salinity challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 159:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.016>
53. *Ezell GH, Sulya LL, Dodgen CL* (1969) The osmotic fragility of some fish erythrocytes in hypotonic saline. *Comparative Biochemistry and Physiology* 28:409–415. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91354-1](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91354-1)
54. *Demanche R* (1980) The Osmotic Fragility Of Red Blood Cells Of Marine Animals: A Comparative Study. <https://doi.org/10.21220/S2-1JMC-WK51>
55. *Kim HD, Isaacks RE* (1978) The osmotic fragility and critical hemolytic volume of red blood cells of Amazon fishes. *Can J Zool* 56:860–862. <https://doi.org/10.1139/z78-118>
56. *Lewis JH, Ferguson EE* (1966) Osmotic fragility of pre-mammalian erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 18:589–595. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(66\)90242-8](https://doi.org/10.1016/0010-406X(66)90242-8)
57. *Hyodo S, Kakumura K, Takagi W, Hasegawa K, Yamaguchi Y* (2014) Morphological and functional characteristics of the kidney of cartilaginous fishes: with special reference to urea reabsorption. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307:R1381–R1395. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00033.2014>
58. *Hyodo S, Tsukada T, Takei Y* (2004) Neurohypophysial hormones of dogfish, *Triakis scyllium*: structures and salinity-dependent secretion. *Gen Comp Endocrinol* 138:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.05.009>
59. *Coldman MF, Gent M, Good W* (1970) Relationships between osmotic fragility and other species-specific variables of mammalian erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 34:759–772. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)90997-7](https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)90997-7)
60. *Baskurt OK* (1996) Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology* 33:169–179. [https://doi.org/10.1016/0006-355X\(96\)00014-5](https://doi.org/10.1016/0006-355X(96)00014-5)
61. *Gül Ç, Tosunoğlu M, Erdoğan D* (2011) Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetologica* 6:137–147. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-9137
62. *Potter IC, Percy LR, Barber DL, Macey DJ* (1982) The morphology, development and physiology of blood cells. In: *Hardisty MW, Potter IC* (eds) *The Biology of Lampreys*. Academic Press, London, p V4A: 233–292
63. *Suljević D, Alijagić A, Mitrašinić-Brulić M, Focak M, Islamagic E* (2017) Comparative physiological assessment of common carp (*Cyprinus carpio*) and crucian carp (*Carrasius carassius*) based on electrolyte and hematological analysis. *Macedon. J. Animal Sci.* 6:95–100. <https://doi.org/10.54865/mjas1662095s>
64. *Chen D, Kaul DK* (1994) Rheologic and hemodynamic characteristics of red cells of mouse, rat and human. *Biorheology* 31:103–113. <https://doi.org/10.3233/bir-1994-31109>
65. *Sujata P, Mohanty PK, Mallik BK* (2014) Haematological analyses of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) at different stages of growth. *Res. J. Chem. Sci.* ISSN 2231:606X
66. *da SilveiraCavalcante L, Acker JP, Holovati JL* (2015) Differences in Rat and Human Erythrocytes Following Blood Component Manufacturing: The Effect of Additive Solutions. *Transfus Med Hemother* 42:150–157. <https://doi.org/10.1159/000371474>
67. *Morris MJ, David-Duflho M, Devynck MA* (1988) Red blood cell ionized calcium concentration in spontaneous hypertension: modulation in vivo by the calcium antagonist PN 200.110. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15:257–260. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1988.tb01068.x>
68. *Swislocki NI, Tierney JM* (1989) Different sensitivities of rat and human red cells to exogenous Ca²⁺. *Am J Hematol* 31:1–10. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830310102>
69. *Glomski CA, Tamburlin J, Hard R, Chainani M* (1997) The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. *Histol Histopathol* 12:147–170
70. *Kim G, Lee M, Youn S, Lee E, Kwon D, Shin J, Lee S, Lee YS, Park Y* (2018) Measurements of three-dimensional refractive index tomography and membrane deformability of live erythrocytes from *Pelophylax nigromaculatus*. *Sci Rep* 8:9192. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25886-8>
71. *Chen X, Wu Y, Huang L, Cao X, Hanif M, Peng F, Wu X, Zhang S* (2022) Morphology and cytochemical patterns of

- peripheral blood cells of tiger frog (*Rana rugulosa*). PeerJ 10:e13915.
<https://doi.org/10.7717/peerj.13915>
72. *Villolobos M, León P, Sessions SK, Kezer J* (1988) Enucleated Erythrocytes in Plethodontid Salamanders. *Herpetologica* 44:243–250
73. *Oyewale JO* (1992) Effects of temperature and pH on osmotic fragility of erythrocytes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and guinea-fowl (*Numida meleagris*). *Res Vet Sci* 52:1–4.
[https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90049-8](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90049-8)
74. *Parshina EY, Yusipovich AI, Brazhe AR, Silicheva MA, Maksimov GV* (2019) Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *J Biol Phys* 45:367–377.
<https://doi.org/10.1007/s10867-019-09533-5>
75. *Aloni B, Eitan A, Livne A* (1977) The erythrocyte membrane site for the effect of temperature on osmotic fragility. *Biochim Biophys Acta* 465:46–53.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90354-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90354-6)
76. *Oyewale JO* (1991) Osmotic fragility of erythrocytes of west African dwarf sheep and goats: effects of temperature and pH. *Br Vet J* 147:163–170.
[https://doi.org/10.1016/0007-1935\(91\)90107-X](https://doi.org/10.1016/0007-1935(91)90107-X)
77. *Oyewale JO, Sanni AA, Ajibade HA* (1991) Effects of temperature, pH and blood storage on osmotic fragility of duck erythrocytes. *Zentralbl Veterinarmed A* 38:261–264.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1991.tb01011.x>
78. *Skorkina MI, Derkachev RV* (2010) [Seasonal activity of frog *Rana ridibunda* erythrocytes by data of electrophoretic mobility]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 46:134–137
79. *Jørgensen C* (2008) Osmotic Regulation in the Frog, *Kana Esculenta* (L.), at Low Temperatures. *Acta Physiologica Scandinavica* 20:46–55.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1950.tb00680.x>
80. *Zeidler RB, Kim HD* (1979) Effects of low electrolyte media on salt loss and hemolysis of mammalian red blood cells. *J Cell Physiol* 100:551–561.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1041000317>
81. *Kumiega E, Michałek M, Kasztura M, Noszczyk-Nowak A* (2020) Analysis of Red Blood Cell Parameters in Dogs with Various Stages of Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Res* 64:325–332.
<https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0043>
82. *Gharaibeh NS, Rawashdeh NM* (1993) Volume-Dependent Potassium Transport in Camel Red Blood Cells. *Membrane Biochemistry* 10:99–106.
<https://doi.org/10.3109/09687689309150257>
83. *Viscor G, Palomeque J* (1982) Method for determining the osmotic fragility curves of erythrocytes in birds. *Laboratory Animals* 16:48–50
84. *Benga G* (2009) Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life* 61:112–133.
<https://doi.org/10.1002/iub.156>
85. *Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim C-T, Suresh S* (2010) Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull* 35:382–388.
<https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>
86. *Barshtein G, Gural A, Arbell D, Barkan R, Livshits L, Pajic-Lijakovic I, Yedgar S* (2023) Red Blood Cell Deformability Is Expressed by a Set of Interrelated Membrane Proteins. *Int J Mol Sci* 24:12755.
<https://doi.org/10.3390/ijms241612755>
87. *Cassoly R, Stetzkowski-Marden F, Scheuring U* (1989) A mixing chamber to enucleate avian and fish erythrocytes: preparation of their plasma membrane. *Anal Biochem* 182:71–76.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90720-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90720-3)
88. *Plasenzotti R, Windberger U, Ulberth F, Osterode W, Losert U* (2007) Influence of fatty acid composition in mammalian erythrocytes on cellular aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 37:237–243
89. *Вафис АА, Пескова ТЮ* (2009) Реакции крови озерной лягушки *Rana ridibunda* pal. на воздействие сточных вод сахарных заводов. Вопросы современной науки и практики Университет им ВИ Вернадского. [Vafis AA, Peskova TY (2009) Blood reactions of the lake frog *Rana ridibunda* pal. on the impact of wastewater from sugar factories. Voprosy sovremennoi nauki i praktiki Universitet im VI Vernadskogo (In Russ)]
90. *Vijitkul P, Kongsema M, Toommakorn T, Bullangpoti V* (2022) Investigation of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after fluoxetine exposure. *Toxicology Reports* 9:588–596.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.031>
91. *Giraud-Billoud M, Moreira DC, Minari M, Andreyeva A, Campos ÉG, Carvajalino-Fernández JM, Istomina A, Michaelidis B, Niu C, Niu Y, Ondei L, Prokić M, Rivera-Ingraham GA, Sahoo D, Staikou A, Storey JM, Storey KB, Vega IA, Hermes-Lima M* (2024) REVIEW: Evidence supporting the ‘preparation for oxidative stress’ (POS) strategy in animals in their natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 293:111626.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111626>

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE OSMOTIC FRAGILITY OF ERYTHROCYTES ACROSS VARIOUS TAXA OF VERTEBRATES

**B. A. Gerda^{a, #}, E. A. Skverchinskaya^a, A. Y. Andreeva^{a, b}, A. A. Volkova^a,
S. Gambaryan^a and I. V. Mindukshev^a**

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

^b *A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian*

[#] *e-mail: bgergda2525@gmail.com*

The osmotic fragility of erythrocytes serves as a crucial parameter indicating the cells' ability to endure variations in the osmotic environment. Disorders in this attribute are often correlated with a spectrum of pathologies, encompassing hemolytic anemias, malignant tumors, and cardiovascular dysfunctions. Notably, osmotic fragility exhibits variability across different animal species and closely intertwines with their respective ecosystems. A methodology for assessing osmotic fragility has been devised utilizing a laser particle analyzer, facilitating the real-time monitoring of cell concentration changes under controlled temperature conditions. The species examined include *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus domestica*, *Coturnix japonica domestica*, *Rana ridibunda*, *Carassius carassius*, and *Lampetra fluviatilis*. The methodology is presented in two variants: (1) manual water additions and (2) automated medium dilution. Key parameters characterizing osmotic fragility include H_{50} (the osmolality causing lysis in half of the susceptible cells), H_{90} (lysis in 90% of the cells), and W (heterogeneity in lysis fragility within the cell population). The findings obtained through the developed method did not show statistically significant deviations from the results obtained using spectrophotometry and flow cytometry concerning parameters such as H_{50} and W. Moreover, no noteworthy disparities were observed between the outcomes of the automatic and manual methodologies. Erythrocytes of aquatic and semi-aquatic animals exhibit significantly higher resistance to hypotonic lysis. Among all species examined, amphibian (*Rana ridibunda*) and lamprey (*Lampetra fluviatilis*) erythrocytes demonstrated the lowest osmotic fragility. The most pronounced variability in resistance levels was detected among amphibians, with differences nearly doubling in comparison to other taxa examined. While mammalian erythrocytes (including those of humans and rats) exhibited similar fragility levels, they displayed less uniformity in their resistance profiles. Bird erythrocytes, on the other hand, demonstrated a half-lysis occurrence at higher osmolality levels compared to mammalian erythrocytes. Nonetheless, bird erythrocytes (*Coturnix japonica domestica*) lysed over a considerably wider osmotic range and contained a subset of cells resilient to hypotonic lysis. These findings indicate that erythrocytes of lower vertebrates possess lower osmotic fragility compared to those of higher vertebrates, a phenomenon likely attributable to embryonic characteristics, ecto-/endothermy, and habitat considerations.

Keywords: Osmotic fragility, erythrocytes, laser scattering, comparative analysis

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОПРЕПАРАТИВНОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО ЛИЗАТА В ИССЛЕДОВАНИИ ВЛИЯНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ НА ФЕНОТИП, МИГРАЦИЮ И АПОПТОЗ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

© 2024 г. А. В. Корневский*, Ю. П. Милютина, С. К. Бочковский,
А. А. Ошколова, О. Н. Беспалова, С. А. Сельков, Д. И. Соколов

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д. О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: a.korenevsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

После доработки 28.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

Естественные киллеры (НК-клетки) — популяция клеток врожденного иммунитета, обладающая цитотоксическими функциями и участвующая в защите организма от вирусов и трансформированных клеток. Развитие плаценты во многом определяется взаимодействием децидуальных НК-клеток и клеток трофобласта. При наступлении беременности НК-клетки аккумулируются вокруг клеток трофобласта, принимая участие в регуляции пролиферации, миграции и инвазии трофобласта за счет секреции цитокинов и ростовых факторов. Трофобласт в свою очередь секретирует хемокины и экспрессирует лиганды к адгезионным рецепторам НК-клеток. Таким образом, регуляция функции трофобласта и НК-клеток носит взаимный характер. Несмотря на интенсивные исследования, роль НК-клеток и методы коррекции их функциональной активности в репродукции остаются спорными. Целью настоящего исследования явилось изучение с использованием нового методического подхода влияния белковых фракций лизата НК-клеток на фенотип, миграцию и апоптоз клеток трофобласта в модельном эксперименте *in vitro*. В результате хроматографического разделения было получено шесть фракций с различным набором входящих в их состав белков. Установлено, что интенсивность экспрессии поверхностного маркера CD105 (эндоглин) клетками трофобласта линии JEG-3 после их культивирования в присутствии высоко- (< 250 кДа) и низкомолекулярных (< 45 кДа) фракций лизата клеток линии НК-92 была снижена по сравнению со спонтанной экспрессией, при этом относительное количество клеток трофобласта с фенотипом CD105+ также оказалось ниже. Кроме того, низкомолекулярная фракция уменьшала интенсивность экспрессии рецептора TRAIL-R2 клетками трофобласта. Показано, что высокомолекулярные фракции не позволили клеткам трофобласта полностью мигрировать через полупроницаемую мембрану, при этом площадь, занимаемая мигрировавшими клетками, не превышала значение площади базового контроля. Установлено, что высокомолекулярная фракция, содержащая димер TGFβ, вызывает повышение уровня p-SMAD2/3 в клетках трофобласта через час после сокультивирования с последующим снижением содержания данной фосфорилированной формы через два и более часов, а также повышает уровень прокаспазы-3 через сутки после сокультивирования. Полученные данные гипотетически отражают возможное поведение клеток хориона под влиянием разрушающихся НК-клеток в случае их гибели как при физиологических, так и при патологических состояниях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, а также другими стрессорными факторами, приводящими к репродуктивной патологии.

Ключевые слова: естественные киллеры, трофобласт, фенотип, миграция, каспаза-3

DOI: 10.31857/S0044452924050033, **EDN:** XPNTJM

ВВЕДЕНИЕ

Естественные киллеры (НК-клетки) — популяция клеток врожденного иммунитета, обладающая цитотоксическими функциями и играющая регу-

ляторную роль в отношении взаимодействующих с ними клеток благодаря рецепторному аппарату и за счет продукции цитокинов [1]. Во время беременности стромальные клетки децидуальной оболоч-

ки и клетки трофобласта объединяются в матке как часть микроокружения децидуальных НК-клеток и регулируют гетерогенность их пула [2]. Взаимодействие НК-клеток и клеток трофобласта лежит в основе формирования иммунологической толерантности в системе “мать-плод” и поддержания физиологического течения беременности.

Известно, что НК-клетки подготавливают децидуальную ткань матки, продуцируя ингибирующие инвазию цитокины $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, а также цитокины $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IP-10$ (C-X-C motif chemokine ligand 10, interferon gamma-induced protein 10, small-inducible cytokine B10) и LIF (leukemia inhibitory factor), которые стимулируют инвазию трофобласта [3, 4]. Кроме того, НК-клетки экспрессируют широкий спектр активирующих и ингибирующих рецепторов [5]. Вследствие взаимодействия этих рецепторов с лигандами на поверхности трофобласта (например, HLA-G, HLA-C, MICA/B) НК-клетки реализуют цитотоксический эффект, подавляя тем самым чрезмерную инвазию трофобластов [6]. В то же время влияние цитокинов НК-клеток на возможное фосфорилирование SMAD, опосредующего сигнал $TGF\beta$ и, как следствие, регулирующего апоптоз в клетках трофобласта, остается малоизученным.

Трофобласт также влияет на НК-клетки, например, экспрессируя CD95L (FasL), который может инициировать апоптоз НК-клеток [7], и продуцируя индоламин-2,3-диоксигеназу, которая может играть иммуносупрессивную роль [8]. Недавно была показана экспрессия рецептора адгезии CD54, а также рецепторов цитокинов клетками трофобласта [9, 10].

Ранее нами были получены данные о влиянии микровезикул НК-клеток на функциональное состояние клеток трофобласта в системе *in vitro* [11]. Было установлено, что микровезикулы не влияют на экспрессию рецепторов CD54, CD105, CD126, CD130, CD181, CD119 и CD120a клетками трофобласта линии JEG-3 и не приводят к появлению рецепторов CD45 и CD56 на мембранах этих клеток. Также было установлено, что микровезикулы клеток линии НК-92 вызывают активацию каспазы-8 в клетках трофобласта с образованием промежуточного фрагмента и без окончательного расщепления до активной каспазы-8, при этом в клетках-мишенях наблюдалось увеличение активности каспазы-3 и каспазы-9 [12]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что микровезикулы НК-клеток влияют на функциональные характеристики клеток трофобласта и подтверждают предположение о том, что микровезикулы способны переносить свое содержимое в клетки-мишени, включая цитотоксический белок гранзим В, вызывающий апоптоз.

Имеются свидетельства в пользу активации других клеток-мишеней белковыми фракциями лизата клеток линии НК-92 [13]. Так, было установлено, что интенсивность экспрессии рецептора CD54 (ICAM-1) эндотелиальными клетками линии EA.hy926 после культивирования в присутствии среднемoleкулярных (<80 кДа) фракций была выше по сравнению с интенсивностью экспрессии того же рецептора неактивированными клетками. При этом низкомолекулярные (<20 кДа) фракции не оказывали влияния на экспрессию рецепторов CD54 (ICAM-1), CD34, CD119 ($IFN\gamma R1$) и CD31 (PECAM-1) эндотелиальными клетками. Показано, что, в отличие от белковых фракций лизата самих НК-клеток, фракции лизата их микровезикул не оказывали влияния на экспрессию рецептора CD54 (ICAM-1) [14]. Миграция клеток-мишеней после их совместного культивирования в присутствии белковых фракций лизата НК-клеток или их микровезикул изменялась разнонаправленно или оставалась неизменной в зависимости от фракции и степени ее обогащенности белком. Полученные данные об изменении фенотипа и функции эндотелиальных клеток линии EA.hy926 под влиянием белковых фракций лизата клеток линии НК-92 или их микровезикул подтверждают вовлеченность эффекторных белков в обеспечение коммуникации НК-клеток с клетками эндотелия и указывают на специфичное участие белков, переносимых микровезикулами, в механизмах ангиогенеза.

Таким образом, в зависимости от выбранной модели взаимодействия НК-клеток с различными клетками-мишенями, исследователи приходят к неоднозначным выводам относительно влияния клеток врожденного иммунитета на клетки микроокружения, в том числе на эндотелий и трофобласт. Такая неопределенность требует дальнейшего раскрытия биологических механизмов, лежащих в основе нарушений иммунологической толерантности при беременности, плацентарной недостаточности, иных патологических состояний, вызываемых вирусными и бактериальными инфекциями, и, как следствие, репродуктивных потерь. Указанный методологический подход может дополнить полученные ранее данные о взаимодействии НК-клеток и клеток трофобласта как при контактном, так и при дистантном взаимодействии (секреция биологически активных продуктов и продукция микровезикул), моделируя процессы, происходящие *in vivo*.

Учитывая многосложность взаимодействия НК-клеток и их микроокружения, в том числе клеток трофобласта, целью данного исследования с использованием нового методического подхода явилось изучение влияния белковых фракций лизата

НК-клеток, полученных в результате микропрепаративного хроматографического разделения, на фенотип, миграцию и апоптоз клеток трофобласта в модельном эксперименте *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток

В качестве НК-клеток использовали клетки линии НК-92, полученной в АТТС (США), которые культивировали в соответствии с указаниями производителя. Клетки линии НК-92 воспроизводят основные фенотипические и функциональные характеристики активированных НК-клеток [15]. В качестве объекта воздействия клеток линии НК-92 использовали клетки трофобласта линии JEG-3, полученной в АТТС (США), которые культивировали в соответствии с указаниями производителя. Эти клетки воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики клеток инвазивного трофобласта первого триместра беременности [16]. Все эксперименты проводили при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи раствора трипанового синего (Sigma-Aldrich Chem. Co., США), при этом она составляла не менее 96%.

Индукторы

В качестве индукторов клеток трофобласта линии JEG-3 использовали белковые фракции, полученные в результате разделения лизата клеток линии НК-92 с помощью метода микропрепаративной эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления (см. ниже).

Приготовление клеточного лизата

Культуральную среду, содержащую клетки линии НК-92, центрифугировали при 500g (комн. темп., 10 мин), осадок собирали и трижды промывали охлажденным фосфатным буфером PBS (0.01 M; pH 7.4) (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Очищенный осадок ресуспендировали в деионизированной воде стандарта MilliQ с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в концентрациях, указанных изготовителями, и хранили при -80°C до анализа. В день эксперимента клетки размораживали и подвергали пятикратному повторному замораживанию-оттаиванию, после чего интенсивно гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в течение 5 мин. Полученный материал центрифугировали при 19800g

(4°C, 20 мин), а полученный супернатант отбирали для дальнейшего исследования.

Препаративная хроматография

Для разделения тотального лизата 5.4×10^7 клеток на белковые фракции (субфракции цитоплазматической фракции) использовали хроматограф жидкостной 1260 Agilent Technologies Infinity II с программным обеспечением OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies, Inc., США). Хроматографическое разделение проводили в неденатурирующих условиях на колонке Agilent Bio SEC-3 Size Exclusion Column, 3µm, 300Å, 4.6×300 мм, (Agilent Technologies, Inc., США). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду. Анализ проводили в изократическом режиме при температуре +4°C со скоростью потока подвижной фазы 0.35 мл/мин. В качестве детектора использовали диодную матрицу, регистрирующую поглощение при 210 и 230 нм. Время анализа составило 45 мин. Деление на фракции осуществлялось по временным отрезкам длительностью 3 мин, начиная с 6-ой мин. В результате эксперимента было проведено 15 итераций деления. Полученные фракции концентрировали на вакуумном испарителе CentriVac Vacuum Concentrator (Labconco Corp., США) до объема, в котором концентрация общего белка превышала значение 5 мг/мл. Полученные концентраты стерилизовали пропусканием через шприцевые фильтры с диаметром пор 0.45 мкм (Corning Inc., США), замораживали при -80°C и хранили до проведения анализа не более двух недель.

Спектрофотометрия

Содержание общего белка в клеточных лизатах и белковых фракциях определяли по методу Бредфорда, используя спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific, США).

Электрофорез

Образцы белковых фракций лизата клеток линии НК-92 с равным количеством общего белка разделяли по молекулярным массам в 10% полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Все образцы были проанализированы трижды независимо друг от друга.

Оценка цитотоксичности

Для определения минимальной токсической дозы подвижной фазы для хроматографии и полученных белковых фракций лизата клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 в лунки 96-луночного плоскодонного планшета для

адгезионных культур (BD, США) вносили клетки линии JEG-3 в концентрации 3.5×10^3 клеток на лунку в 100 мкл полной культуральной среды с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Во избежание краевого эффекта в этом и всех последующих экспериментах с использованием планшетов, крайние лунки по всему периметру заливали средой и не использовали в дальнейшем. Затем клетки культивировали в течение 24 ч в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO_2 . После этого клеткам заменяли культуральную среду на подвижную фазу для хроматографии или белковые фракции лизата клеток линии NK-92 в нескольких разведениях. Для этого путем последовательного титрования на полной культуральной среде с добавлением 10% ЭТС готовили серию разведений подвижной фазы или белковых фракций в соотношениях: 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.20% и 0.10% (v/v). Для получения статистически достоверных результатов каждое разведение препарата готовили в шести повторах. В качестве контроля использовали культуральную среду с добавлением 10% ЭТС. После этого клетки вновь культивировали в течение 24 ч в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO_2 . Спустя сутки из всех лунок планшета удаляли среду и окрашивали клетки 0.2% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich Chem. Co., США), содержащим 5% метанола, для чего в каждую лунку вносили 100 мкл раствора красителя и инкубировали 10 мин. Затем, после четырехкратной отмывки лунок дистиллированной водой, планшет высушивали, а краситель экстрагировали добавлением в лунки 100 мкл раствора уксусной кислоты. Учет оптической плотности проводили на фотометре для микропланшет ELx808 (BioTek Instruments Inc., США) при длине волны 540 нм (отсекающая длина волны 630 нм). О снижении жизнеспособности клеток судили по изменению оптической плотности анализируемой пробы по сравнению с контролем.

Оценка минимальной токсической дозы подвижной фазы для хроматографии и белковых фракций лизата клеток линии NK-92 показала, что в неразведенном состоянии и разведении культуральной средой в соотношении 50% и 25% они были токсичны в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 (отличие от жизнеспособности интактных клеток: $p < 0.001$). В разведении культуральной средой в соотношениях 12.5%, 6.25% и во всех последующих разведениях подвижная фаза и белковые фракции не оказывали токсического воздействия на клетки трофобласта (отличие от жизнеспособности интактных клеток: $p > 0.05$).

Проточная цитофлуориметрия

Для оценки влияния белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на фенотип клеток трофобласта линии JEG-3 в лунки 24-луночного плоскодонного планшета помещали клетки в концентрации 1.8×10^5 клеток в 1 мл полной культуральной среды DMEM (ООО "БиолоГ", Россия) и культивировали в течение 24 ч до образования монослоя. Затем культуральную среду удаляли так, чтобы при добавлении фракций общий объем в лунке составлял 500 мкл. После этого в часть лунок добавляли белковые фракции в объеме 50 мкл. Часть клеток трофобласта инкубировали в лунках планшета в полной культуральной среде без добавления индукторов. В качестве положительного контроля клетки трофобласта культивировали в полной культуральной среде в присутствии TNF α (50 Ед/мл). Спустя сутки монослой клеток трофобласта дезинтегрировали теплым раствором версена (ООО "БиолоГ", Россия) и трижды отмывали в растворе Cell Wash (BD, США). После этого клетки обрабатывали антителами к CD54 (BD, США), CD105 (R&D, США), CD253 (BD, США), TRAIL-R1 (BD, США), TRAIL-R2 (BD, США), TNF-R1 (R&D, США), TNF-R2 (R&D, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для контроля неспецифического связывания антител использовали изотипические антитела в соответствии с рекомендациями производителя (BD, США; R&D, США). Относительное количество и интенсивность экспрессии рецепторов клетками трофобласта оценивали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD, США). Все эксперименты повторяли трижды независимо друг от друга. Влияние каждой белковой фракции было проанализировано в двух повторах для каждого разведения.

Оценка миграции

Во вставки с поликарбонатной мембраной с размером пор 8 мкм для 24-луночного культурального планшета с плоским дном (BD, США) добавляли клетки трофобласта в концентрации 1.0×10^5 клеток в 200 мкл полной культуральной среды с добавлением 2% ЭТС на лунку. Через три часа в лунки добавляли 10 мкл растворов индукторов, приготовленных на культуральной среде с добавлением 10% ЭТС (конечные содержания каждой фракции составляли 0.05% (v/v)). В контрольные вставки вносили среду с добавлением 10% ЭТС без индукторов. В лунки планшета под вставки добавляли 700 мкл питательной среды, содержащей 10% ЭТС от общего объема, и культивировали 120 ч. После инкубации вставки промывали теплым раствором Хенк-

са (ООО “БиолоГ”, Россия), стараясь не задевать внешнюю сторону доньшка мембраны вставки. Фиксация клеток производилась с помощью 10% водного раствора формалина. Затем клетки окрашивали гематоксилином (15 мин) и свежеприготовленным 0.1% водным раствором азур-эозина (40 мин). После окрашивания вставки высушивали в течение 24 ч при 37°C для полного удаления влаги. Затем ватным диском удаляли клетки с внутренней стороны вставки и фотографировали клетки на внешней стороне вставки с помощью микроскопа Zeiss AXIO Observer.Z1 и камеры AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Industrielle Messtechnik GmbH, ФРГ) для получения трех полей обзора из каждой лунки.

В каждом поле зрения учитывали площадь и количество ядер мигрировавших через мембрану клеток при помощи программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Сингапур). Миграцию клеток оценивали по изменению указанных параметров по сравнению с базовым контролем (полная культуральная среда с добавлением 10% ЭТС). Влияние каждого из индукторов анализировали в 18 повторах.

Оценка влияния белковых фракций лизата клеток NK-92 на активацию каспазы-3 и сигнального SMAD-пути в клетках трофобласта линии JEG-3

Для получения субконфлюэнтного монослоя клеток трофобласта линии JEG-3 производили пересев и культивацию 3.4×10^6 клеток при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO₂ в течение 24 ч. По истечении суток в культуральных флаконах осуществляли замену питательной среды и вносили такой объем индукторов в каждый флакон, чтобы концентрация вносимого белка в нем составила 0.1 мкг/мл либо 1.0 мкг/мл питательной среды. Клетки культивировали в присутствии белковых фракций при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO₂ в течение 1, 2, 6 либо 24 ч. В контрольные флаконы вносили дополнительный объем питательной среды, равный объему вносимого индуктора. С контрольных флаконов клетки снимали по истечении шести либо 24 ч с момента добавления индукторов.

Иммуноблоттинг

Прокультивированные клетки трофобласта линии JEG-3 лизировали в буфере RIPA (50 мМ Трис-HCl pH 8.1; 1% Тритон X-100; 0.1% додецилсульфата натрия; 0.5% дезоксихолата натрия; 150 мМ хлорида натрия), содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Для осаждения клеточного дебриса пробы центрифугировали при 20000g (+4°C, 20 мин). Лизат клеток

линии JEG-3 либо белковые фракции лизата клеток линии NK-92, содержащие по 50 мкг общего белка, разделяли в 10% полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в денатурирующих условиях по методу Лэммли и переносили на PVDF-мембрану (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 3% водным раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в буфере TBST (50 мМ Трис-HCl; 150 мМ хлорида натрия; 0.1% (v/v) Tween 20; pH 7.5). Содержание белков интереса в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к гранзиме В (Granzyme B Mouse mAb, BioLegend, США), TGFβ (TGF-beta Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, США), SMAD2/3 (SMAD2/3 (D7G7) XP® Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, США), фосфорилированной форме SMAD2/3 (Phospho-SMAD2 (Ser465/467) / SMAD3 (Ser423/425) (D27F4) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, США), каспазе-3 (Caspase-3 Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, США). Инкубацию проводили при +4°C в течение ночи. Далее, после инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1/1000; Bio-Rad, США), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминесценцию Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Мембраны сканировали в геле-документирующей системе ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, США), интенсивность полос определяли при помощи программного обеспечения ImageLab Software (Bio-Rad, США). Полученные данные были нормализованы по содержанию общего белка в геле [17], определяемому с применением технологии stain-free (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Statistica и GraphPad Prism 8. Для проверки достоверности различий применяли непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считались достоверными при $p < 0.05$. Результаты в таблице представлены в виде абсолютных значений, на рисунках — в виде графических данных, медианы, первого и третьего квартиля (Me {Q1, Q3}), а также как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), иллюстрирующие изменения исследуемых показателей относительно контроля.

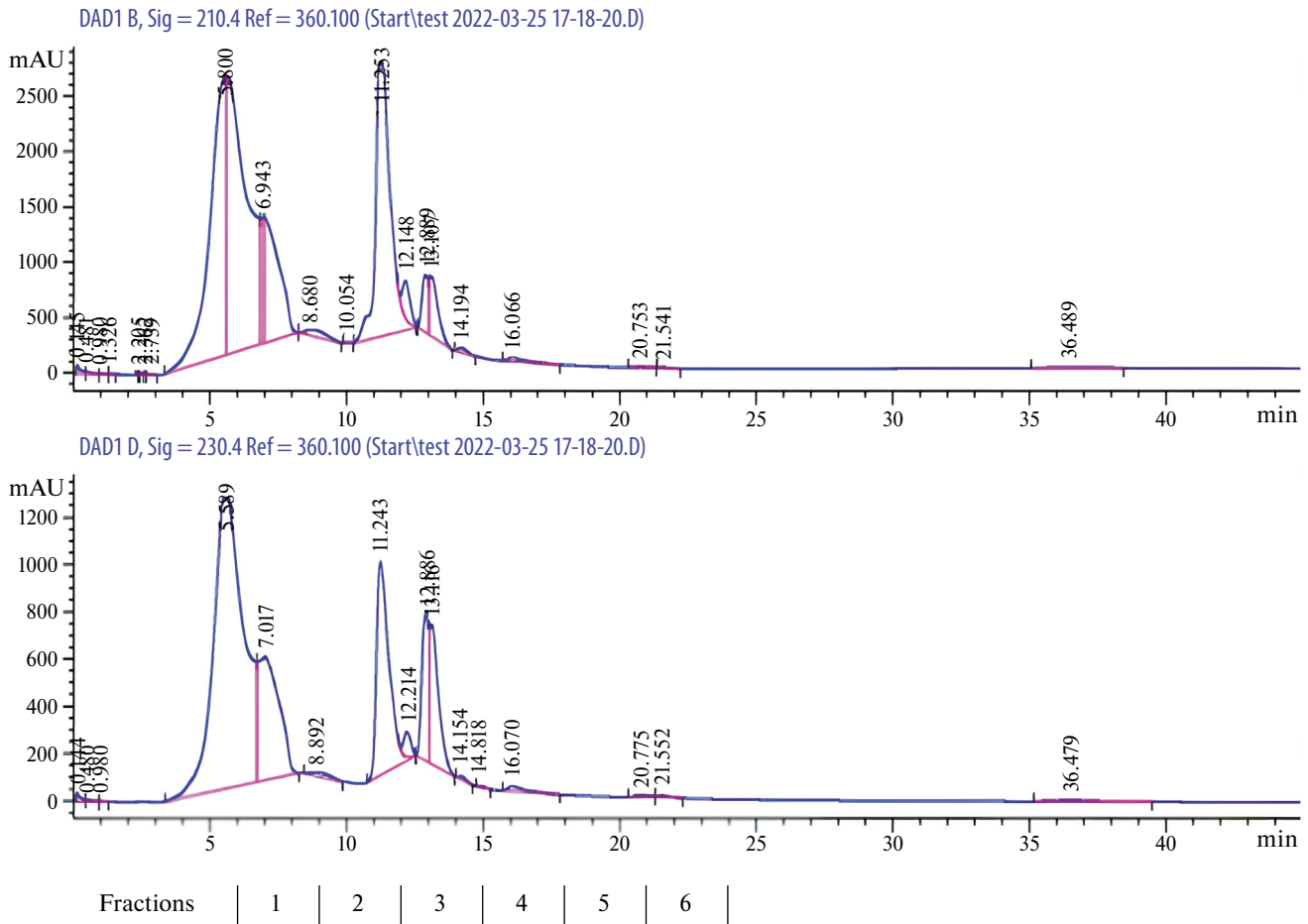


Рис. 1. Хроматографический профиль лизата естественных киллеров линии НК-92 при длинах волн 210 и 230 нм (время удерживания фракций составляет три минуты).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препаративное фракционирование лизата клеток линии НК-92

В результате микропрепаративного хроматографического разделения был получен профиль лизата клеток линии НК-92, состоящий из шести фракций (рис. 1).

Содержание общего белка в лизате составило 60.2 ± 6.1 мкг/ 10^6 клеток. Электрофоретическое разделение белков в полученных фракциях показало следующее распределение доминирующих молекулярных масс: 35–250 кДа (фракция №1), 25–70 кДа (фракция №2), 45–65 кДа (фракция №3), 45–50 кДа (фракция №4), “не определено” (фракции №№ 5–6) (рис. 2).

Оценка данных белкового профиля фракций №№ 1–4, полученных с использованием 10% одномерных коммерческих гелей в камере для вертикального электрофореза, представлена в табл. 1.

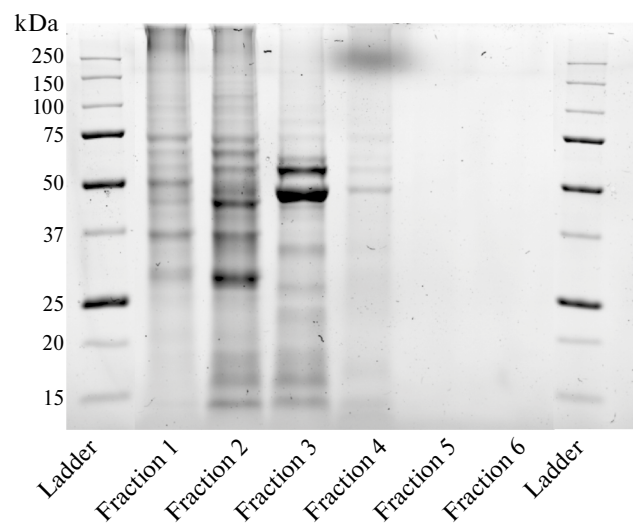


Рис. 2. Электрофореграммы белковых фракций лизата естественных киллеров линии НК-92 (Ladder — раствор стандартной смеси белков с известными молекулярными массами).

Стандартная методика электрофоретического разделения не позволила визуально определить следовые количества белка, содержащегося во фракциях №№ 5–6.

Оценка влияния белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на фенотип клеток трофобласта линии JEG-3

В предварительном эксперименте, проведенном с целью подбора оптимальных условий последующих испытаний, было показано, что индукторы не оказывали влияния на аутофлуоресценцию клеток трофобласта.

Установлено, что интенсивность экспрессии поверхностного маркера CD105 клетками трофобласта после их культивирования в присутствии фракций №№ 1–2, 5–6 была снижена на 7.4–17.7% по сравнению со спонтанной экспрессией (рис. 3а). Относительное количество клеток трофобласта с фенотипом CD105+ в присутствии всех индукторов также оказалось ниже, на 2.9–8.9%, при сравнении с таковым при спонтанной экспрессии (рис. 3б). Помимо этого, фракция №5 уменьшала интенсивность экспрессии рецептора TRAIL-R2 клетками трофобласта на 24.5% по сравнению со спонтанной экспрессией (рис. 3с), не изменяя, однако, относительного количества клеток, экспрессирующих этот рецептор (рис. 3д).

Показано, что по сравнению со спонтанной экспрессией все использованные в настоящем исследовании индукторы не влияли на интенсивность экспрессии клетками-мишенями поверхностных маркеров CD54, CD253, TRAIL-R1, TNF-R1 и

TNF-R2, а также на относительное количество клеток трофобласта, экспрессирующих эти рецепторы.

Оценка влияния белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на миграцию клеток трофобласта линии JEG-3

В качестве базового контроля использовали культуральную среду, содержащую 10% ЭТС: при этом медиана количества мигрировавших клеток составила 1090.3 {1047.8; 1213.7}, а таковая площади, занимаемой мигрировавшими клетками, — 0.96 {0.93; 1.02} мм².

Установлено, что фракции №№1–2 не позволили клеткам трофобласта мигрировать через мембрану полностью. В случае добавления в культуральную среду фракций №№3–6 достоверных различий обнаружено не было (рис. 4а). Было показано также, что площадь, занимаемая мигрировавшими клетками при совместном культивировании с фракциями №№1–2, не превышала значение площади базового контроля, в иных случаях (фракции №№3–6) достоверных различий обнаружено не было (рис. 4б).

Оценка влияния белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на содержание белков канонического сигнального пути TGFβ и активацию каспазы-3 в клетках трофобласта линии JEG-3

Принимая во внимание данные об эффекте влияния фракций №№1–2 на активность миграции клеток трофобласта и отсутствие такового других фракций, далее было изучено распределение содержания белков интереса в эффективных фракциях лизата клеток линии NK-92, обнаруженных с помощью метода иммуоблоттинга (рис. 5).

Таблица 1. Белковый профиль цитоплазматических фракций лизата естественных киллеров линии NK-92

Фракция №1		Фракция №2		Фракция №3		Фракция №4	
Молекулярная масса, кДа	Доля, % от общего количества белка	Молекулярная масса, кДа	Доля, % от общего количества белка	Молекулярная масса, кДа	Доля, % от общего количества белка	Молекулярная масса, кДа	Доля, % от общего количества белка
250.0	73.9	250.0	3.3	—	—	—	—
—	—	73.9	4.6	—	—	—	—
—	—	66.1	7.5	62.4	7.5	—	—
—	—	57.9	7.9	57.8	29.7	—	—
—	—	49.0	15.0	—	—	—	—
51.7	14.0	45.1	17.8	47.2	62.8	49.7	100.0
36.7	12.1	36.4	14.6	—	—	—	—
—	—	28.8	29.3	—	—	—	—

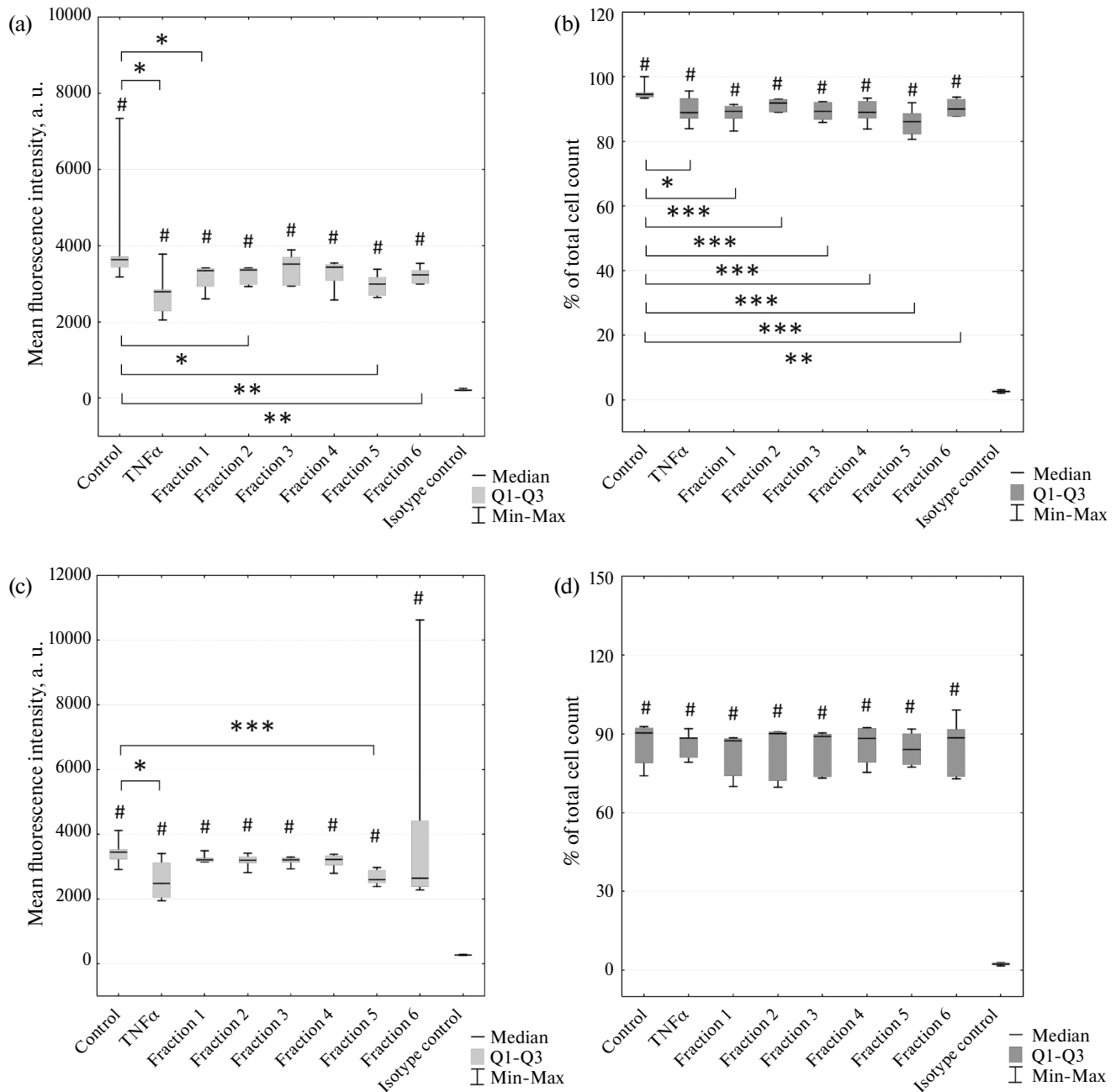


Рис. 3. Фенотипические характеристики клеток трофобласта линии JEG-3, экспрессирующих поверхностные маркеры в присутствии фракций лизата естественных киллеров линии NK-92: (a) — интенсивность экспрессии CD105; (b) — относительное количество клеток, экспрессирующих CD105; (c) — интенсивность экспрессии TRAIL-R2; (d) — относительное количество клеток, экспрессирующих TRAIL-R2. Достоверность различий: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ относительно контроля (спонтанная экспрессия); # $p < 0.001$ относительно изотипического контроля.

Установлено, что высокомолекулярная фракция № 1, содержащая TGF β , вызывает повышение на 16% уровня p-SMAD2/3 в клетках трофобласта через час после сокультивирования с последующим снижением на 15–16% содержания данной фосфорилированной формы через два и более часов (рис.

6). Показано повышение на 6% уровня прокаспазы-3 в клетках трофобласта после часового сокультивирования с той же фракцией (рис. 6). Несмотря на то, что гранзим В также содержится преимущественно во фракции № 1, сокультивирование с ней клеток трофобласта в течение исследованных про-

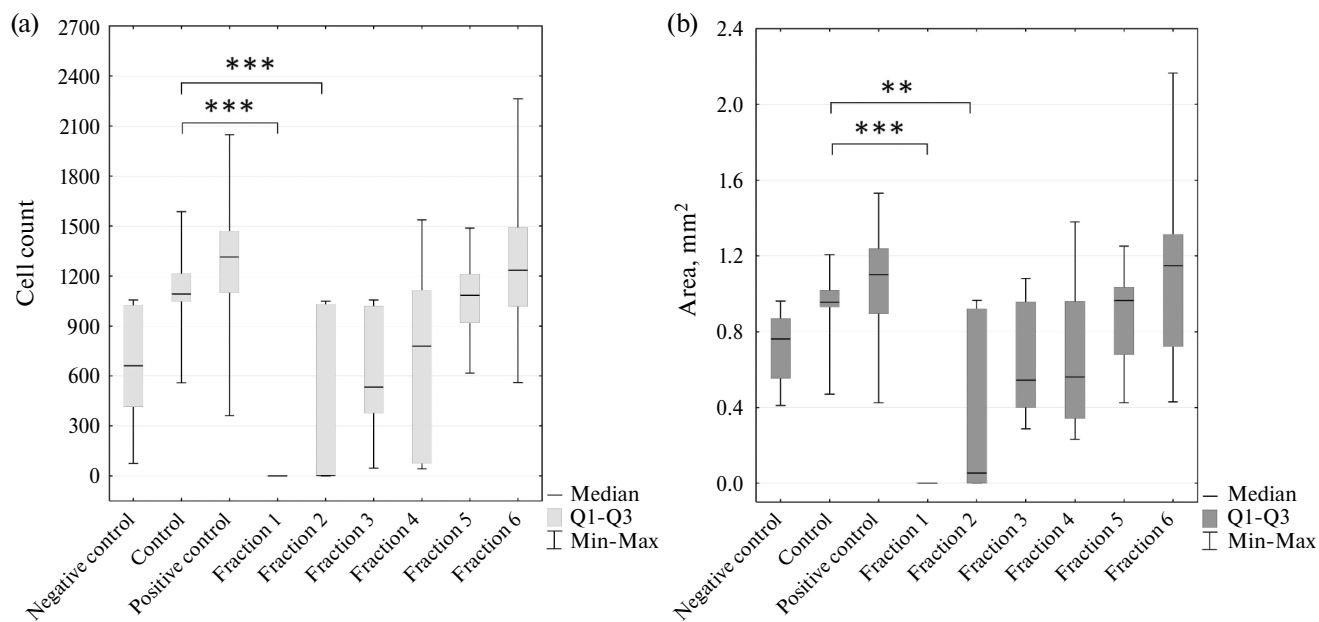


Рис. 4. Миграционная активность клеток трофобласта линии JEG-3, мигрировавших через мембрану в присутствии фракций лизата естественных киллеров линии NK-92: (a) — количество мигрировавших клеток; (b) — площадь, занимаемая мигрировавшими клетками. Достоверность различий относительно базового контроля: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

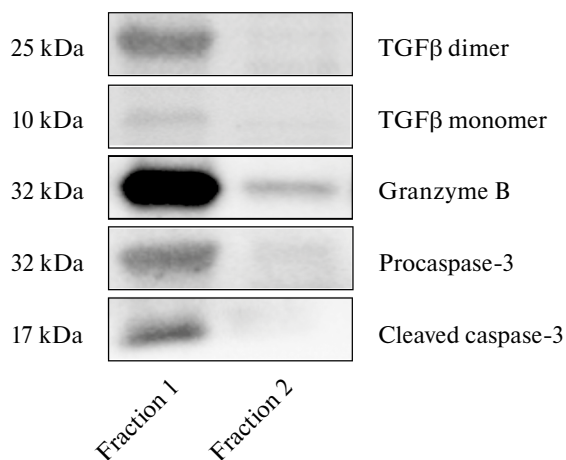


Рис. 5. Распределение содержания белков интереса во фракциях №№1-2 лизата естественных киллеров линии NK-92.

межутков времени не приводило к активации в них каспазы-3, что подтверждается отсутствием выявления расщепленного фрагмента активной каспазы-3.

На основании полученных данных о том, что изменения содержания исследуемых белков после сокультивирования с фракцией № 2 (предположительно, обогащенной цитокинами) обнаружены не были, было принято решение увеличить в даль-

нейшем концентрацию общего белка во фракциях при сокультивировании в десять раз. Этот методический подход, однако, не привел к каким-либо значимым результатам. Так несмотря на то, что исследуемые нами белки преимущественно распределены во фракции № 1 (рис. 5), после сокультивирования с ней (1.0 мкг/мл среды) клеток трофобласта в последних не было получено достоверных различий в уровнях SMAD2/3, p-SMAD2/3, прокаспазы-3 и активной каспазы-3 относительно контроля. Не были обнаружены достоверные изменения содержания тех же белков и при сокультивировании клеток трофобласта с фракцией № 2.

Для оценки возможных вторичных эффектов, вызываемых совместным культивированием клеток трофобласта с белковыми фракциями лизата НК-клеток, было решено увеличить время экспозиции до 24 часов при сохранении высокой концентрации общего белка во фракциях (1.0 мкг/мл среды). В новых условиях проведения эксперимента в клетках трофобласта было показано небольшое снижение содержания SMAD2/3 относительно контроля при сокультивировании с фракцией № 2 (рис. 7) и более резкое повышение содержания прокаспазы-3 относительно контроля после сокультивирования с фракцией №1 (на 29%) и фракцией № 2 (на 63%) (рис. 7). При этом фрагмент активной каспазы-3 в клетках трофобласта также не был обнаружен, что указывает на отсутствие активации каспазы-3 по-

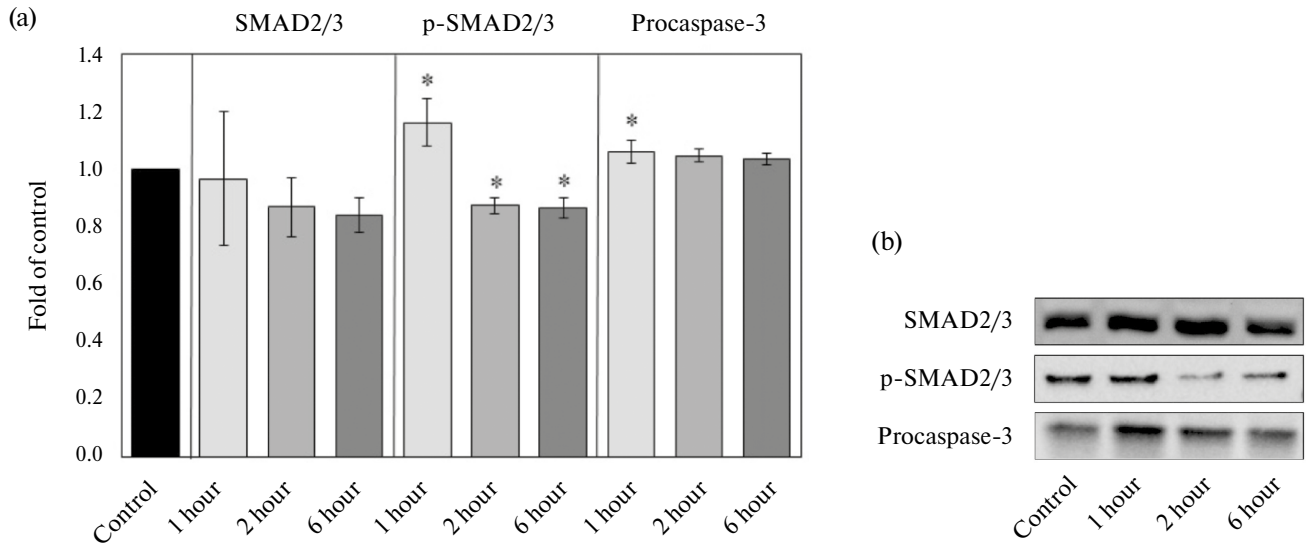


Рис. 6. (a) — Оценка содержания SMAD2/3, p-SMAD2/3 и прокаспазы-3 в клетках трофобласта линии JEG-3 после сокультивирования с фракцией №1 (0.1 мкг/мл среды) лизата клеток естественных киллеров линии NK-92 в течение одного, двух и шести часов (достоверность различий относительно контроля: * $p < 0.05$); (b) — репрезентативные изображения иммуноблотов белков интереса SMAD2/3, p-SMAD2/3 и прокаспазы-3 в клетках трофобласта линии JEG-3 в тех же условиях.

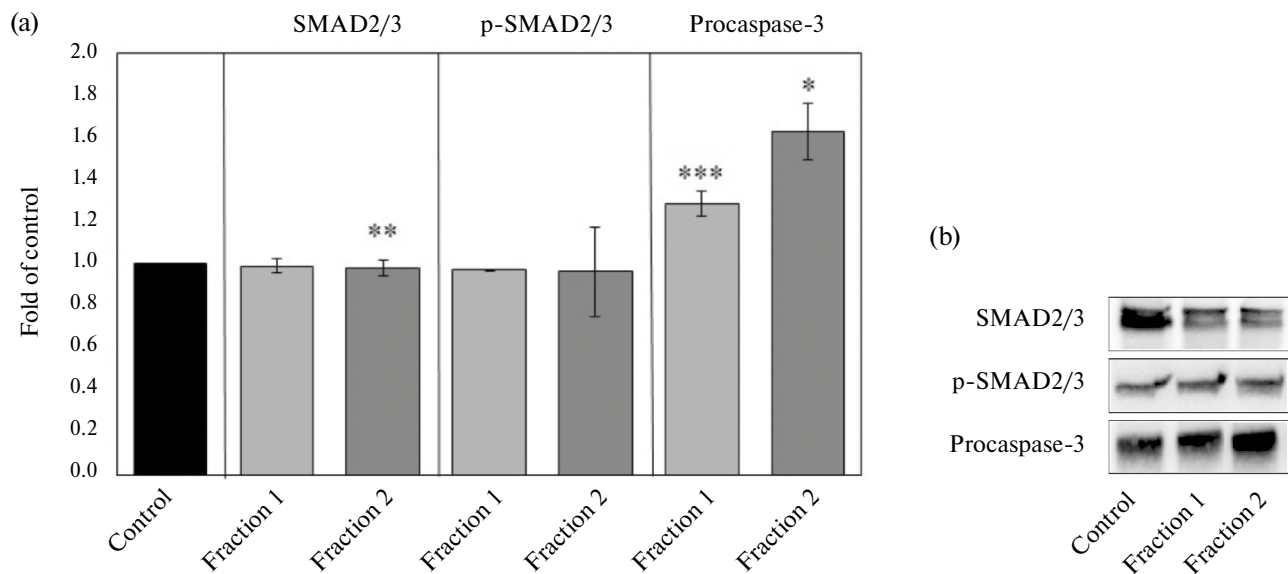


Рис. 7. (a) — Оценка содержания SMAD2/3, p-SMAD2/3 и прокаспазы-3 в клетках трофобласта линии JEG-3 после сокультивирования с фракциями №№1-2 (1.0 мкг/мл среды) лизата клеток естественных киллеров линии NK-92 в течение 24 часов (достоверность различий относительно контроля: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$); (b) — репрезентативные изображения иммуноблотов белков интереса SMAD2/3, p-SMAD2/3 и прокаспазы-3 в клетках трофобласта линии JEG-3 в тех же условиях.

сле их сокультивирования с отдельными белковыми фракциями лизата NK-клеток.

Таким образом, были получены данные об эффектах белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на фенотип, миграцию и апоптоз клеток

трофобласта линии JEG-3 при использовании метода микропрепаративного хроматографического фракционирования и последующего культивирования клеток-мишеней в присутствии индукторов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использованные в настоящем исследовании клетки линии NK-92 позволяют воспроизвести *in vitro* основные биохимические процессы, происходящие в клетках *in vivo*, а клетки трофобласта линии JEG-3 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики клеток инвазивного трофобласта первого триместра беременности [15, 16].

В настоящей работе мы проанализировали влияние белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на экспрессию клетками трофобласта линии JEG-3 поверхностных маркеров CD54 (ICAM-1), CD105, CD253 (TRAIL), TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1, TNF-R2. Выбор указанных рецепторов для оценки их экспрессии клетками-мишенями отчасти обусловлен тем, что ранее в нашей лаборатории было установлено отсутствие влияния микровезикул клеток линии NK-92 на экспрессию клетками трофобласта линии JEG-3 маркеров CD54, CD105, TNF-R1 и ряда других молекул в условиях их совместного культивирования [11].

Установлено, что белки высоко- и низкомолекулярных фракций №№ 1–2, 5–6 снижали экспрессию поверхностного маркера CD105 клетками трофобласта. Помимо этого, фракция №5 снижала интенсивность экспрессии клетками-мишенями рецептора TRAIL-R2. Уменьшение интенсивности экспрессии отдельных поверхностных маркеров клетками трофобласта свидетельствует об ингибировании активации клеток-мишеней белками, содержащимися в высоко- и низкомолекулярных фракциях лизата NK-клеток. В то же время отсутствие изменения экспрессии CD54, CD253, TRAIL-R1, TNF-R1 и TNF-R2 клетками трофобласта в условиях их совместного культивирования в присутствии всех использованных в настоящем исследовании индукторов свидетельствует о том, что во фракциях отсутствуют белки, способные изменить экспрессию этих молекул. Такое различие в индукции поверхностных молекул на плазматической мембране клеток трофобласта линии JEG-3 микровезикулами клеток линии NK-92 и фракциями лизата тех же самых клеток может являться дополнительным аргументом в пользу специфичности сигналов, передаваемых клетками при помощи микровезикул [11, 18].

Поверхностный маркер CD105 (эндоглин) является корцептором TGF β и экспрессируется на поверхности клеток трофобласта [19], где выступает “переключателем” клеточной поверхности, модулируя перенос сигналов от рецепторов TGF β , которые опосредуют клеточные миграцию, пролиферацию, образование клеточных кластеров [20]. Таким обра-

зом, подавление экспрессии CD105 приводит к усилению секреции TGF β [21]. Сам же TGF β снижает цитотоксичность NK-клеток и регулирует инвазивную способность клеток трофобласта [22]. Поэтому следующим этапом нашего исследования явилась оценка влияния фракций лизата клеток линии NK-92 на миграцию клеток трофобласта линии JEG-3.

Известно, что TGF β представляет собой плейотропный цитокин, обладающий как ингибирующим [23], так и стимулирующим [24, 25] действием на миграцию клеток. Показано TGF β -зависимое ингибирование инвазии вневорсинчатого трофобласта [26] и клеток линии HTR-8/SVneo [27], при этом при исследовании хориокарцином, таких как JAR или JEG, данный эффект либо не наблюдался, либо исследователи отмечали активацию миграции в присутствии TGF β [28]. В частности, TGF β 1 способствовал инвазии клеток трофобласта линии JEG-3 через сигнальный путь SMAD, однако данный эффект отсутствовал при концентрациях TGF β 1 ниже 5 нг/мл [29]. Несмотря на то что в нашей работе фракция №1 в концентрации 0.1 мкг/мл, по-видимому, содержит количество TGF β 1, достаточное для активации SMAD-зависимого пути, миграция клеток трофобласта не усиливается, более того, наблюдается выраженное ее снижение, которое, однако, согласуется с полученными нами данными по снижению количества CD105 на плазматической мембране клеток трофобласта. Показано, что подавление CD105 снижает миграцию клеток [30], а его сверхэкспрессия, напротив, способствует инвазии и миграции клеток хориокарциномы [31].

Нами показано преимущественное подавление миграции клеток трофобласта под влиянием высокомолекулярных фракций №№ 1–2 (что не наблюдалось в отношении средне- и низкомолекулярных фракций №№ 3–6) за счет сниженного количества клеток, мигрировавших через мембрану. Полученный результат можно объяснить наличием в данных фракциях большого разнообразия белков, способных оказывать широкий спектр различных воздействий на клетку-мишень, а также повышенной каспаза-3-независимой гибелью клеток трофобласта. Более того, ранее с помощью метода масс-спектрометрии в клетках линии NK-92 были обнаружены каспазы, гранзим А, IL-12, INF β [13], что также свидетельствует в пользу активного влияния NK-клеток на функциональное состояние клеток трофобласта.

Параллельно с этим установлено, что низкомолекулярная фракция №5 снижала интенсивность экспрессии рецептора TRAIL-R2 клетками трофобласта.

TRAIL-R — рецепторы клеточной гибели. Они экспрессируются клетками различных тканей при физиологических условиях и при патологиях, включая опухоли. Установлено, что некоторые клетки избирательно экспрессируют один из этих рецепторов. Например, эндотелий сосудов головного мозга не экспрессирует TRAIL-R1, но экспрессирует TRAIL-R2 [32]. При связывании TRAIL-R1 и TRAIL-R2 с лигандами TRAIL (CD253) запускается процесс апоптоза клетки, несущей TRAIL-R. Уменьшение экспрессии TRAIL-R2 клетками трофобласта при культивировании с низкомолекулярной фракцией может свидетельствовать либо о его шеддинге, либо о наличии в этой фракции цитокинов, снижающих экспрессию данного рецептора. К таким цитокинам, потенциально входящим в состав лизата клеток линии NK-92, можно отнести IFN γ [33]. Нам не удалось найти в литературе данные о возможности избирательного подавления только одного из TRAIL-R каким-либо из цитокинов или их комбинацией, поэтому обнаруженный феномен требует дальнейшего изучения.

Показано также, что высокомолекулярная фракция № 1, содержащая TGF β , вызывает повышение уровня p-SMAD2/3 в клетках трофобласта через час после сокультивирования с последующим снижением данной фосфорилированной формы через два и более часов. Последнее наблюдение, вероятно, может быть связано с тем, что эффект активации SMAD-пути достигает максимума ранее. Например, максимум активации SMAD2/3 в модели сокультивирования первичных трофобластов человека и клеточной линии HTR8/SVneo с миостатином приходится на интервал 30-60 мин от начала эксперимента [34], а в модели сокультивирования клеток HTR8/SVneo с костным морфогенетическим белком 2 максимум активации SMAD2/3 достигается в течение 30 мин после начала эксперимента [35].

Повышение уровня прокаспазы-3 при отсутствии обнаружения фрагментов активной каспазы-3 не является достаточным для предположения об активации ее апоптотических функций. Возможно, низкий уровень стресса и отсутствие активной каспазы-3 обусловлено ее ролью в активации PKB [36], mTOR [37] или NF- κ B [38], связанных с реализацией ее неапоптотических функций.

Обнаруженное нами отсутствие значимых различий в содержании SMAD2/3, p-SMAD2/3, прокаспазы-3 и активной каспазы-3 в клетках трофобласта при сокультивировании с высокомолекулярной фракцией № 1 (1.0 мкг/мл среды; 1–6 ч) может быть следствием того, что данная фракция представлена высоким разнообразием белков,

способных оказывать различные воздействия на клетку-мишень, порой противоположные по своему эффекту. Необходимо отметить, что процедура пробоподготовки лизата клеток линии NK-92 для хроматографического разделения предполагает отсутствие в нем белков плазматических мембран, к которым, в частности, относятся лиганды рецепторов смерти, способных активировать внешний путь апоптоза в клетках-мишенях [39]. Известно также, что для активации ряда сигнальных путей в клетках-мишенях при моделях их взаимодействия с NK-клетками необходимо образование с ними иммунологического синапса, в частности для передачи цитотоксических белков [40]. Ранее нами было показано, что активация каспазы-3 происходит только при наличии непосредственного контакта между клетками линий JEG-3 и NK-92 [41]. Поэтому, несмотря на то что нами показано наличие гранзима В преимущественно во фракции № 1, предполагающее ее участие в реализации проапоптотических процессов в клетках-мишенях, важной особенностью используемой нами экспериментальной модели является отсутствие образования иммунологического синапса, без которого активация ряда сигнальных путей в клетках трофобласта не происходит. Предположение о том, что добавление в культуральную среду отдельных белковых фракций не приводит к усилению передачи апоптотических сигналов в клетках трофобласта, соотносится с полученными нами данными по отсутствию увеличения (а скорее даже снижения) экспрессии TRAIL-рецепторов на поверхности клеток трофобласта под воздействием белковых фракций лизата NK-клеток.

Несмотря на то, что во фракции № 2 соотношение белков со средней массой к белкам с большой массой смещено в сторону первых, а именно ими являются большинство цитокинов, хемокинов и факторов роста, отсутствие эффектов на клетки-мишени может являться следствием того, что при приготовлении лизата самих клеток линии NK-92 мы получили данные белки в виде их предшественников и неактивных форм, требующих дополнительной активации, в том числе протеолитической. Отсутствие эффекта можно объяснить меньшим содержанием белков, способных активировать сигнальные пути SMAD и другие пути, участвующие в активации клеточной миграции [42, 43]. Это подтверждает важность способа передачи сигнала (цитокины) для реализации его специфического действия как при контактном, так и при различных вариантах дистантного взаимодействия.

Повышение содержания прокаспазы-3 относительно контроля после сокультивирования с фракциями №№ 1–2 можно связать с воздействием провоспалительных цитокинов IL-18 (18.2 кДа), IL-27 (23.4 кДа) и IL-35 (49.0 кДа), экспрессируемых НК-клетками [44]. Предположительно, эти белки могут преимущественно содержаться во фракции №2.

Таким образом, представленные в исследовании данные об изменении фенотипа, миграции и апоптоза клеток трофобласта линии JEG-3 под влиянием белковых фракций лизата клеток линии НК-92 подтверждают тот факт, что некоторые белковые компоненты, обеспечивающие коммуникацию НК-клеток с клетками трофобласта, вызывают изменения в фенотипических и функциональных характеристиках последних. Данные изменения гипотетически отражают возможное поведение клеток хориона под влиянием разрушающихся НК-клеток в случае их гибели как при физиологических, так и при патологических состояниях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, а также другими стрессорными факторами, приводящими к репродуктивной патологии.

Для уточнения иммунологических и биохимических механизмов, лежащих в основе этих процессов, необходимы дальнейшие исследования, направленные на идентификацию эффекторных белков НК-клеток и прямые доказательства их связи с эффектами, наблюдаемыми при их взаимодействии с клетками трофобласта.

Проведенное исследование позволяет также оценить различия в данных по оценке влияния тех или иных биологически активных клеточных продуктов при межклеточных взаимодействиях, зависящих от способа передачи сигнала и от конкретной модели их изучения.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А.В.К. — идея работы и планирование эксперимента, интерпретация результатов, написание статьи; Ю.П.М. — интерпретация результатов; С.К.Б. — проведение экспериментов; А.А.О. — проведение экспериментов; О.Н.Б. — одобрение финальной версии статьи; С.А.С. — редактирование статьи; Д.И.С. — редактирование статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 1021062512052-5-3.2.2 “Разработка диагностических критериев прогнозирования и преодоления

репродуктивных потерь” (2022–2024 гг.) при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (задача №13: “Оценить морфофункциональные особенности НК-клеток при различных формах репродуктивной патологии, приводящие к невынашиванию беременности”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность студентке ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)” В. А. Резюкиной за помощь в проведении исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Del Zotto G, Marcenaro E, Vacca P, Sivori S, Pende D, Della Chiesa M, Moretta F, Ingegnere T, Mingari MC, Moretta A, Moretta L* (2017) Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry. Part B, Clin Cytom* 92: 100–114. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21508>
2. *Mikhailova VA, Belyakova KL, Selkov SA, Sokolov DI* (2017) Peculiarities of NK cells differentiation: CD56dim and CD56bright NK cells at pregnancy and in non-pregnant state. *Med Immunol (Russia)* 19: 19–26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>
3. *Zhang X, Wei H* (2021) Role of decidual natural killer cells in human pregnancy and related pregnancy complications. *Front Immunol* 12: 728291. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728291>
4. *Pitman H, Innes BA, Robson SC, Bulmer JN, Lash GE* (2013) Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. *Hum Reprod* 28: 2075–2086. <https://doi.org/10.1093/humrep/det233>
5. *Tyshchuk EV, Mikhailova VA, Selkov SA, Sokolov DI* (2021) Natural killer cells: origin, phenotype, function. *Med Immunol (Russia)* 23: 1207–1228. (In Russ.). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-NKC-2330>
6. *Díaz-Hernández I, Alecsandru D, García-Velasco JA, Domínguez F* (2021) Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction. *Hum Reprod Update* 27: 720–746. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa062>
7. *Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, Gilbert-Barness E, Good RA* (1997) Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 3: 655–662. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.8.655>

8. *Pietra G, Vitale M, Moretta L, Mingari MC* (2012) How melanoma cells inactivate NK cells. *Oncoimmunology* 1: 974–975.
<https://doi.org/10.4161/onci.20405>
9. *Hannan NJ, Jones RL, White CA, Salamonsen LA* (2006) The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. *Biol Reprod* 74: 896–904.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045518>
10. *Bazhenov DO, Mikhailova VA, Furaeva KL, Vyaz'mina LP, Sokolov DI, Sel'kov SA.* (2022) The role of cytokines in maintaining the dynamics of cell-cell interaction between natural killer cells and trophoblast cells. *Bull Exp Biol Med* 172: 622–631.
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05444-z>
11. *Sokolov D, Gorshkova A, Markova K, Milyutina Y, Pyatygina K, Zementova M, Korenevsky A, Mikhailova V, Selkov S* (2023) Natural killer cell derived microvesicles affect the function of trophoblast cells. *Membranes* 13: 213.
<https://doi.org/10.3390/membranes13020213>
12. *Milyutina YP, Korenevskii AV, Vasilyeva VV, Bochkovskii SK, Ishchenko AM, Simbirtsev AS, Sokolov DI, Selkov SA* (2022) Caspase activation in trophoblast cells after interacting with microparticles produced by natural killer cells in vitro. *J Evol Biochem Physiol* 58: 1834–1846.
<https://doi.org/10.1134/S002209302206014>
13. *Korenevsky AV, Gert TN, Berezkina ME, Sinyavin SA, Mikhailova VA, Markova KL, Simbirtsev AS, Selkov SA, Sokolov DI* (2022) Protein fractions of natural killer cell lysates affect the phenotype, proliferation and migration of endothelial cells in vitro. *J Evol Biochem Physiol* 58: S134–S150.
14. *Korenevsky AV, Berezkina ME, Gert TN, Sinyavin SA, Selkov SA, Sokolov DI* (2022) Phenotypic and functional characteristics of endothelial cells: the in vitro effects of protein fractions from the lysate of natural killer-derived microvesicles. *Med Immunol (Russia)* 24: 463–480.
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-PAF-2376>
15. *Gong, JH, Maki G, Klingemann HG* (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8: 652–658.
16. *Kohler PO, Bridson WE* (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin EndocrinolMetab* 32: 683–687.
<https://doi.org/10.1210/jcem-32-5-683>
17. *Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ* (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 27: 4–25.
<https://doi.org/10.1111/sms.12702>
18. *Sokolov DI, Markova KL, Mikhailova VA, Vyaz'mina LP, Milyutina YuP, Kozyreva AR, Zhdanova AA, Malygina DA, Onokhin KV, Ivanova AN, Korenevsky AV, Selkov SA* (2019) Phenotypic and functional characteristics of microvesicles produced by natural killer cells. *Med Immunol (Russia)* 21: 669–688.
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-4-669-688>
19. *Mano Y, Kotani T, Shibata K, Matsumura H, Kawachi F, Sugiyama C, Hironaka M, Tsuda H, Sumigama S, Hayakawa H* (2010) P28 The role of endoglin in human extravillous trophoblast. *Pregnancy Hypertens* 1: S50.
[https://doi.org/10.1016/S2210-7789\(10\)60194-8](https://doi.org/10.1016/S2210-7789(10)60194-8)
20. *Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S* (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984–992.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0634rev>
21. *Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP* (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534–1537.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1534>
22. *Бабышкина НН, Малиновская ЕА, Стахеева МН, Волкоморов ВВ, Уфандеев АА, Слонимская ЕМ* (2010) Роль трансформирующего ростового фактора TGF-β1 в патогенезе рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал* 6: 63–70. [*Babyshkina NN, Malinovskaya EA, Stakheyeva MN, Volkomorov VV, Ufandiev AA, Slonimskaya EM* (2010) Role of transforming growth factor TGF-β1 in pathogenesis of breast cancer. *Siberian Oncol J* 6: 63–70. (In Russ)].
23. *Yang D, Dai F, Yuan M, Zheng Y, Liu S, Deng Z, Tan W, Chen L, Zhang Q, Zhao X, Cheng Y* (2021) Role of transforming growth factor-β1 in regulating fetal-maternal immune tolerance in normal and pathological pregnancy. *Front Immunol* 12: 689181.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689181>
24. *Xiong S, Cheng JC, Klausen C, Zhao J, Leung PC* (2016) TGF-β1 stimulates migration of type II endometrial cancer cells by down-regulating PTEN via activation of SMAD and ERK1/2 signaling pathways. *Oncotarget* 7: 61262–61272.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11311>
25. *Zhu D, Zhao J, Lou A, Huang Q, OuYang Q, Zhu J, Fan M, He Y, Ren H, Yang M* (2019) Transforming growth factor β1 promotes fibroblast-like synoviocytes migration and invasion via TGF-β1/Smad signaling in rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem* 459: 141–150.
<https://doi.org/10.1007/s11010-019-03557-0>
26. *Fafet P, Rebouissou C, Maudelonde T, Vignais ML* (2008) Opposite effects of transforming growth factor-beta activation and rho-associated kinase inhibition on human trophoblast migration in a reconstituted placental-endometrial coculture system. *Endocrinology* 149: 4475–4485.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0253>
27. *Xu XH, Jia Y, Zhou X, Xie D, Huang X, Jia L, Zhou Q, Zheng Q, Zhou X, Wang K, Jin LP* (2019) Downregulation of lysyl oxidase and lysyloxidase-like protein 2 suppressed the migration and invasion of trophoblasts by activating the TGF-β/collagen pathway in preeclampsia. *Exp Mol Med* 51: 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0211-9>

28. *Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK* (1994) Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp Cell Res* 214: 93–99.
<https://doi.org/10.1006/excr.1994.1237>
29. *Huang Z, Li S, Fan W, Ma Q* (2017) Transforming growth factor β 1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via TGF- β /Smad3 signaling pathway. *Oncotarget* 8: 33560–33570.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16826>
30. *Dolinsek T, Sersa G, Prosen L, Bosnjak M, Stimac M, Razborsek U, Cemazar M* (2015) Electrotransfer of plasmid DNA encoding an anti-mouse endoglin (CD105) shRNA to B16 melanoma tumors with low and high metastatic potential results in pronounced anti-tumor effects. *Cancers* 8: 3.
<https://doi.org/10.3390/cancers8010003>
31. *Wang X, Zong L, Wang W, Yang J, Xiang Y* (2020) CD105 overexpression mediates drug-resistance in choriocarcinoma cells through BMP9/Smad pathway. *J Cancer* 11: 272–283.
<https://doi.org/10.7150/jca.34965>
32. *Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S* (2004) Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52: 821–831.
<https://doi.org/10.1369/jhc.3A6112.2004>
33. *Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Wiley SR* (1999) IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 163: 920–926.
34. *AbdelHafez F, Klausen C, Zhu H, Leung PCK* (2022) Myostatin increases human trophoblast cell invasion by upregulating N-cadherin via SMAD2/3-SMAD4 signaling. *Biol Reprod* 106: 1267–1277.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iaob238>
35. *Zhao HJ, Klausen C, Li Y, Zhu H, Wang YL, Leung PCK* (2018) Bone morphogenetic protein 2 promotes human trophoblast cell invasion by upregulating N-cadherin via non-canonical SMAD2/3 signaling. *Cell Death Dis* 9: 174.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0230-1>
36. *Khalil H, Peltzer N, Walicki J, Yang JY, Dubuis G, Gardiol N, Held W, Bigliardi P, Marsland B, Liaudet L, Widmann C* (2012) Caspase-3 protects stressed organs against cell death. *Mol Cell Biol* 32: 4523–4533.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00774-12>
37. *Porta C, Paglino C, Mosca A* (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol* 4: 64.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>
38. *Hussain AR, Ahmed SO, Ahmed M, Khan OS, Al Abdulmohsen S, Plataniias LC, Al-Kuraya KS, Uddin S* (2012) Cross-talk between NF κ B and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. *PloS One* 7: e39945.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039945>
39. *Wajant H* (2003) Death receptors. *Essays Biochem* 39: 53–71.
<https://doi.org/10.1042/bse0390053>
40. *Santoni G, Amantini C, Santoni M, Maggi F, Morelli MB, Santoni A* (2021) Mechanosensation and mechanotransduction in natural killer cells. *Front Immunol* 12: 688918.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.688918>
41. *Milyutina YP, Mikhailova VA, Pyatygina KM, Demidova ES, Malygina DA, Tertychnaia TE, Arutjunyan AV, Sokolov DI, Selkov SA* (2019) Role of caspases in the cytotoxicity of NK-92 cells in various models of coculturing with trophoblasts. *Biochemistry (Mosc)* 84: 1186–1196.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919100079>
42. *Attisano L, Lee-Hoeflich ST* (2001) The Smads. *Genome Biol* 2: REVIEWS3010.
<https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-reviews3010>
43. *Гребенкина ПВ, Михайлова ВА, Ошколова АА, Вершинина СО, Духинова МС, Баженов ДО, Сельков СА, Соколов ДИ* (2022) Децидуальные естественные киллеры и клетки трофобласта: клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы взаимодействия. *Медицинская иммунология* 24: 1085–1108. [*Grebenskina PV, Mikhailova VA, Oshkolova AA, Verzhinina SO, Dukhinova MS, Bazhenov DO, Selkov SA, Sokolov DI* (2022) Decidual natural killer cells and trophoblast cells: cellular, humoral and molecular mechanisms of interaction. *Med Immunol (Russia)* 24: 1085–1108. (In Russ.)]
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-DNK-2540>
44. *Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S* (2018) Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol* 9: 1869.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>

USE OF MICROPREPARATIVE CELL LYSATE FRACTIONATION IN STUDYING THE EFFECT OF NATURAL KILLER CELLS ON THE PHENOTYPE, MIGRATION AND APOPTOSIS OF TROPHOBLAST CELLS *IN VITRO*

A. V. Korenevsky[#], Yu. P. Milyutina, S. K. Bochkovsky, A. A. Oshkolova,
O. N. Bespalova, S. A. Selkov and D. I. Sokolov

D. O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russia

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

Natural killer (NK) cells are a population of innate immune cells that have cytotoxic functions and are involved in protecting the body from viruses and transformed cells. Placental development is determined largely by the interaction of decidual NK cells and trophoblast cells. During pregnancy, NK cells accumulate around trophoblast cells, while regulating trophoblast proliferation, migration and invasion through the secretion of cytokines and growth factors. The trophoblast, in turn, secretes chemokines and expresses ligands for NK cell adhesion receptors. Thus, the regulation of trophoblast and NK cell function is reciprocal. Despite intensive research, the role of NK cells and methods for correcting their functional activity in reproduction remain controversial. The aim of this study was to assess the effect of protein fractions of NK cell lysate on the phenotype, migration and apoptosis of trophoblast cells in an *in vitro* model experiment, using a new methodological approach. With chromatographic separation, we obtained six fractions with different protein cargoes therein. It was found that CD105 (endoglin) expression by trophoblast cells of the JEG-3 cell line after their cultivation in the presence of high- (<250 kDa) or low molecular weight (<45 kDa) fractions of NK-92 natural killer cell lysate was reduced compared to spontaneous expression, while the relative count of trophoblast cells with the CD105+ phenotype was also lowered. Besides, one of the low molecular weight fractions decreased TRAIL-R2 receptor expression by trophoblast cells. The high molecular weight fractions did not enable trophoblast cells to migrate completely through the semi-permeable membrane, with the area occupied by the migrated cells not exceeding the base control area. In addition, the high molecular weight fraction containing the TGF β dimer increased p-SMAD2/3 level in trophoblast cells one hour after co-culture, followed by a decrease in this phosphorylated form content after two or more hours, and also elevated procaspase-3 level one day after co-culture. The data obtained hypothetically reflect the possible behavior of chorion cells under the influence of collapsing NK cells in the event of their death in both normal and pathological conditions caused by viral and bacterial infections, as well as other stress factors leading to reproductive pathology.

Keywords: natural killer cells, trophoblast, phenotype, migration, caspase-3

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА Q_{10} ГИБЕРНИРУЮЩИХ СУСЛИКОВ *UROCITELLUS UNdulATUS* И ОХЛАЖДЕННЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© 2024 г. Н. М. Захарова^{1, *}, Ю. С. Тараховский^{1, 2, **}, М. О. Хренов¹

¹ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

* e-mail: n_m_zakharova@pbcras.ru

** e-mail: tarahov@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

После доработки 12.07.2024 г.

Принята к публикации 23.07.2024 г.

Проведен анализ температурного коэффициента Q_{10} частоты сердечных сокращений ($Q_{10_{HR}}$) и потребления кислорода ($Q_{10_{Ox}}$) при пробуждении длиннохвостых сусликов *Uroditellus undulatus*, а также при отогревании предварительно охлажденных взрослых крыс и крысят. Величину $Q_{10_{Ox}}$ вычисляли по стандартной формуле, тогда как для вычисления $Q_{10_{HR}}$ формула была эмпирически модифицирована для отслеживания изменений этого параметра в широком диапазоне температур тела (T_b). Установлено, что у сусликов в начальный период выхода из спячки, при $T_b \leq 10$ °C, наблюдались высокие значения температурных коэффициентов $Q_{10_{HR}} = 40 - 50$ и $Q_{10_{Ox}} = 6 - 7$. Еще более высокие значения $Q_{10_{HR}} > 100$ были обнаружены в начале отогревания крысят, хотя у них был низкий уровень $Q_{10_{Ox}} = 1.2$. Взрослые крысы не выдерживали охлаждения ниже 16 °C и демонстрировали умеренную вариабельность как $Q_{10_{HR}} = 2.0 - 4.0$, так и $Q_{10_{Ox}} = 2.0 - 2.2$. В процессе восстановления нормальной T_b значения $Q_{10_{HR}}$ у всех животных приближались к величине ~ 2.0 , предсказанной правилом Вант Гоффа-Аррениуса для химических реакций в живой и неживой природе. Мы предполагаем, что высокие значения $Q_{10_{HR}}$ и $Q_{10_{Ox}}$, обнаруженные в ранний период выхода сусликов из гибернации, могут свидетельствовать о функционировании адаптационных механизмов, направленных на ускорение согревания тела. Устойчивость к охлаждению и высокий коэффициент $Q_{10_{HR}}$ у крысят, как представителей отряда *Rodentia*, к которому относятся также естественные гибернаторы — суслики, могут свидетельствовать о функционировании в ювенальный период крыс рудиментарных механизмов адаптации к охлаждению и гетеротермии.

Ключевые слова: крысы; крысята; суслики; гибернация; частота сердцебиения; потребление кислорода

DOI: 10.31857/S0044452924050045, **EDN:** XPMDWF

ВВЕДЕНИЕ

При снижении температуры тела (T_b), млекопитающие могут приобрести устойчивость к действию экстремальных факторов внешней среды, острым патологическим процессам или тяжелым травмам. Охлаждение тела на несколько градусов широко используется в медицине, но естественные

гибернаторы являются рекорсменами по способности переносить снижение T_b до 0 °C и ниже.

Охлаждение активирует терморегуляторные реакции, необходимые для минимизации потерь тепла, такие как периферическая вазоконстрикция и пилоэрекция, а также реакции продуцирования тепла в скелетных мышцах (дрожательный термогенез) и бурой жировой ткани (недрожательный или метаболический термогенез), тем самым предотвращая снижение T_b . [1, 2]. Если система терморегуляции не справляется со своей задачей, T_b у гомеотермных животных значительно падает, что приводит к их гибели вследствие остановки сердца [3].

Однако некоторые виды млекопитающих адаптировались к охлаждению тела благодаря спо-

Сокращения: HR — частота сердечных сокращений; BPM — удары сердца в минуту; ECG — электрокардиограмма; i — момент, для которого производятся расчеты; V_{Ox} — удельные скорости потребления кислорода; T_a — температура окружающей среды; T_b — температура тела; T_h — температура сердца; Q_{10} — температурный коэффициент; $Q_{10_{HR}}$ — температурный коэффициент Q_{10} , рассчитанный из зависимости HR от величины T_b ; $Q_{10_{Ox}}$ — температурный коэффициент Q_{10} , рассчитанный из зависимости V_{Ox} от величины T_b .

способности впадать в состояние пониженной активности и обмена веществ, называемом торпором. Их T_b падает до значений, которые лишь на несколько градусов превышают температуру окружающей среды (T_a) [4, 5]. Понимание естественных механизмов адаптивной гипотермии и торпора у млекопитающих имеет большое значение для использования этих состояний не только в классической медицине [6–9], но также в космической медицине [10–12] и в медицине катастроф [13–15].

В последнее время достигнут значительный прогресс в разработке фармакологических и нефармакологических подходов, способных инициировать глубокую гипотермию или формирование торпороподобных состояний у животных, не способных к гибернации в естественных условиях [16–19]. Внедрение в медицину искусственно вызываемых состояний гипотермии и торпора способствует появлению новой концепции лечения тяжелых травм, острой гипоксии, восстановления после остановки сердца, инсультов или в целях реанимации [20–22]. Кроме того, подавление клеточного метаболизма при охлаждении обеспечивает безопасные подходы для долгосрочного хранения органов и тканей, используемых в клинической трансплантологии [23–26].

Для оценки реакции организма на изменение T_b используют удобный и наглядный критерий: температурный коэффициент Q_{10} , определяемый как скорость физиологического процесса при определенной температуре по сравнению со скоростью при температуре на 10°C ниже или выше [27–29]. Согласно правилу Вант Гоффа — Аррениуса считается, что величина $Q_{10} \sim 2$ отражает естественное влияние температуры на химические реакции. В исследованиях температурной зависимости физиологических процессов, включая HR и V_{Ox} , проводимых на различных животных и людях, среднее значение Q_{10} обычно находится в пределах от 2 до 3 [30–33].

Однако было обнаружено, что в некоторых случаях, эта величина может существенно отклоняться от указанного значения, что свидетельствует об участии физиологических механизмов регуляции скорости метаболизма. Например, у животных возможны индивидуальные различия Q_{10} от 1 до 8, что может быть связано с большой вариабельностью HR и V_{Ox} [34, 35]. Кроме того, было показано, что Q_{10} может сильно варьировать в зависимости от T_b в момент тестирования. Так, при исследовании метаболизма, определяемого по скорости потребления кислорода мозгом собак при охлаждении, было обнаружено, что в интервале температур от 37°C до 27°C показатель Q_{10} составлял 2.23, а в интервале от 27°C до 14°C средний показатель Q_{10} увеличивался

вдвое и достигал 4.53 [36]. Значительное увеличение Q_{10} до 9.5, определяемого по скорости потребления кислорода, наблюдалось также у сумчатых животных в конце отогрева после гибернации, особенно в пределах термонейтральной зоны, тогда как низкие значения Q_{10} ($Q_{10} = 1.9$) наблюдались ниже $T_a = 20^\circ\text{C}$ [37]. Большая вариабельность Q_{10} также наблюдалась при исследовании отдельных белков, например, при оценке тепловой активации проводимости одиночных ионных каналов рецептора капсаицина VR1, ответственных за болевые ощущения при повреждающем нагревании тканей. Так, при нагревании в диапазоне физиологически нейтральных T_a , были зарегистрированы величины $Q_{10} < 2$, а при повреждающем нагревании наблюдалось увеличение до $Q_{10} = 32$ [38]. Значительное влияние температуры на Q_{10} наблюдалось также при анализе проводимости потенциал-зависимых ионных каналов Na^+ и K^+ нервов и мышц млекопитающих. Было обнаружено, что для альфа-субъединицы этого белка зависимость проводимости от величины приложенного потенциала характеризовалась $Q_{10} = 2.2$. Для бета-субъединицы была характерна $Q_{10} = 14$, что отражает неаррениусовское отклонение указанной величины, наблюдаемое при пониженных температурах [39].

Для анализа изменчивости Q_{10} при различных температурах был предложен метод сканирования значения Q_{10} , который присваивает Q_{10} каждой фиксированной точке T_b . Использование этого подхода позволило получить необычайные изменения значения Q_{10} . Так, в исследовании белка TRPA1, который является молекулярной основой способности ямочных органов змей воспринимать инфракрасное излучение, значение Q_{10} , получаемое при измерении зависимости проводимости от температуры, могло достигать $\sim 100\,000$, что может объяснить исключительно высокую термическую чувствительность ямочных органов гремучей змеи [27].

В представленной работе мы предлагаем простую модификацию стандартной формулы вычисления Q_{10} , позволяющую проводить сравнительный анализ этой величины во всем диапазоне изменений T_b . Этот подход мы используем для вычислений Q_{10} для зависимости HR от температуры при выходе из спячки сусликов (*Urocitellus undulatus*) или при отогревании лабораторных крыс после контролируемого предварительного охлаждения. В исследование также были включены крысята, у которых механизмы терморегуляции не полностью сформированы, но которые способны выдерживать большую степень охлаждения тела, чем взрослые крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на животных

Суслики. Работа выполнена на длиннохвостых сусликах *Urocitellus undulatus*, Pallas (прежнее название *Spermophilus undulatus*) обоего пола ($n = 9$, вес 590 ± 50 г). Животные были отловлены в конце августа в естественной среде обитания (долина реки Лены, Якутия) и доставлены в лабораторию. В активный период сусликов содержали в индивидуальных клетках, находящихся в специальном помещении с достаточным количеством зерна и овощей и с соблюдением естественного фотопериода. В начале ноября клетки с животными переносили в темное помещение, где они содержались при температуре T_a от 0°C до $+2^\circ\text{C}$ до окончания гибернационного периода. В это время питание не предоставлялось. Для мониторинга баутов в период спячки часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики ($20 \times 20 \times 25$ см), в дно которых был установлен термистор (чувствительность, $0,2^\circ\text{C}$). Во время спячки температура гнезда находилась в пределах $1-2^\circ\text{C}$. Для провокации пробуждения животных извлекали из ящика в середине баута (5–6 сутки гипотермии) и переносили в помещение с температурой воздуха $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Пробуждение сусликов в среднем занимало 170–180 мин.

Крысы. Самцов крыс *Wistar*, ($n = 5$, вес 240 ± 20 г) охлаждали с использованием метода закрытого сосуда [40, 41]. Животных помещали в герметичную камеру, объемом 5 л и $T_a = 7^\circ\text{C}$, где они находились в течение 3–4 ч. Камеры были оснащены газовыми датчиками O_2 и CO_2 (Vernier, США). В процессе потребления кислорода животными в камере создавались условия гипоксии/гиперкапнии. Измерения показали, что в результате дыхания, через 3 ч содержание кислорода в камере снижалось с 21% до 5%, а содержание углекислого газа повышалось с 0.03% до 2.5%. Эти изменения приводили к подавлению метаболизма и вызывали у животных состояние гипотермии до значений $T_b = 14^\circ\text{C} - 18^\circ\text{C}$. Для восстановления физиологически нормального T_b животных извлекали из камеры, помещали в клетку и доставляли в помещение с $T_a = 20 \pm 1^\circ\text{C}$, где в течение 3–4 ч (в среднем, в течение 210 мин) восстанавливалась нормотермия. Данная процедура оказывала мягкое воздействие на организм, и после окончания эксперимента у животных не наблюдалось видимых отклонений в поведении [42, 43].

Крысы. Крысят *Wistar* раннего постнатального периода ($n = 6$, возраст 7–8 дней, вес 20 ± 2 грамм) охлаждали методом закрытого сосуда. Крысят содержали в герметичной камере объемом 0.8 л при $T_a = 7^\circ\text{C}$ в течение 2 ч в условиях нарастающей гипоксии/гиперкапнии [40, 41], регистрируемых га-

зовыми датчиками O_2 и CO_2 (Vernier, США), что инициировало снижение T_b до $7^\circ\text{C} - 10^\circ\text{C}$. После извлечения из камеры и доставки в помещение с $T_a = 20 \pm 1^\circ\text{C}$, у крысят приблизительно через 3 ч (в среднем, за 170 мин) восстанавливалась нормотермия.

Измерения

На сусликах, измерения физиологических параметров проводили в процессе отогрева после 5–6 дней гибернации. На взрослых или крысах соответствующие измерения проводили при отогреве после нескольких часов охлаждения. Датчики температуры вводили в прямую кишку на глубину 4 см у крыс и сусликов или на глубину 2 см у крысят. Дистальную часть датчика надежно закрепляли у основания хвоста мягким зажимом. У крыс и сусликов, T_b регистрировали каждую минуту с помощью датчика RET-2, у крысят — RET-3. (Physitemp, США, точность $\pm 0,1^\circ\text{C}$).

Удельную скорость потребления кислорода (V_{O_2} , мл/кг/ч) регистрировали с помощью системы метаболического мониторинга MM-100 (CWE incorporated, США). Прибор позволял проводить несколько, обычно от 3 до 10 измерений, за время эксперимента.

Для измерения частоты сердечных сокращений, иглы из нержавеющей стали вводили подкожно в плечевые области правой и левой лап для записи ECG по стандартной схеме. Проблем для закрепления датчиков не было, так как суслики находились в состоянии торпора, а крысы и крысята в состоянии так называемого «холодового наркоза». При повышении температуры до контрольных значений, животные еще оставались в состоянии пониженной двигательной активности. И хотя ЭКГ становилась более зашумленной, считывание и последующий анализ частоты сердечных сокращений (HR) не составляло труда. Данные ECG передавались на компьютер, где каждую минуту автоматически оценивалась HR.

Вычисления

Температуру сердца вычисляли из данных изменений ректальной температуры. Известно, что при выходе сусликов из гибернации передняя часть тела, включая сердце, разогревается быстрее, чем задняя часть тела. Разница температур T_h и T_b у сусликов связана с характерной особенностью кровотока этих животных при выходе из гибернации, что не наблюдается у крыс при согревании после охлаждения. Поэтому стандартные измерения ректальной температуры (T_b) у сусликов не отражают температуру сердца (T_h) [44]. Однако, как нами было показано ранее [45], связь между ректальной и сердечной температурами, измеренными у сусликов при

спровоцированном пробуждении, представляет собой сигмоидальную кривую:

$$T_h = 36.88 \left[1 + e^{\frac{T_b - 10.08}{3.5}} \right]^{-1} \quad (1)$$

Где: T_h — температура сердца ($^{\circ}\text{C}$); T_b — ректальная температура ($^{\circ}\text{C}$). Коэффициенты: 36.88 — максимальная температура, достигнутая при обогреве после гибернации; 10.08 — середина сигмовидной кривой; 3.5 — крутизна сигмоидальной кривой. Установлено, что применение этой формулы дает хорошее соответствие экспериментальным точкам: $n = 96$, $R^2 = 0.977$ [45].

В представленной работе, все данные T_h у сусликов были получены путем вычислений по формуле (1). В экспериментах на крысах мы считали, что $T_b \approx T_h$. Поэтому в коррекции не было необходимости [44].

Для расчета коэффициента $Q10$ на основе удельных скоростей потребления кислорода ($Q10_{Ox}$) мы использовали стандартную формулу [46, 27, 32]:

$$Q10_{Ox} = \left(\frac{V_{Ox2}}{V_{Ox1}} \right)^{\frac{10}{T_{h2} - T_{h1}}} \quad (2)$$

Где V_{Ox1} и V_{Ox2} — удельные скорости потребления кислорода при температурах T_{h1} и T_{h2} соответственно.

Представленная формула (2) удобна для определения температурного коэффициента $Q10_{Ox}$, поскольку имеющееся оборудование позволяло провести всего 3–10 измерений кислорода, потребляемого за все время эксперимента. Однако, поскольку для расчета $Q10_{HR}$ измерения HR и T_h проводились каждую минуту в течение нескольких часов, мы получили обширный массив данных. Это позволило нам провести множественные расчеты значения $Q10_{HR}$ в течение всего периода обогрева животных. Поэтому, для определения значения $Q10_{HR}$ при температуре, зарегистрированной в момент времени i , мы предлагаем следующую эмпирическую модификацию стандартной (2):

$$Q10_{HR} = \left(\frac{HR_{(i+15)}}{HR_{(i-15)}} \right)^{\frac{10}{T_{h(i+15)} - T_{h(i-15)}}} \quad (3)$$

Где HR — частота сердечных сокращений через 15 измерений после $(i+15)$ или до $(i-15)$ контрольного момента (i) при температурах $T_{h(i+15)}$ и $T_{h(i-15)}$ соответственно. Расчеты по формуле (3) дают набор значений $Q10_{HR}$ для всего периода измерений. При этом, сдвиг между соседними значениями i (и соответствующими величинами $Q10_{HR}$) составляет одну минуту, а интервал через ± 15 измерений соответ-

ствует получасовому периоду, при условии проведения ежеминутных измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вычисления $Q10_{HR}$

Эксперименты на сусликах. При расчете $Q10_{HR}$ по формуле (3) мы протестировали разные интервалы для i и пришли к выводу, что получасовой интервал ($i \pm 15$ измерений) является оптимальным. При меньших значениях полученные кривые выглядели очень зашумленными, а значительное увеличение интервала приводило к огрублению результатов. Поэтому мы отдали предпочтение получасовому интервалу для всех расчетов $Q10_{HR}$, представленных в данной работе. Измерение частоты сердечных сокращений и ректальной температуры (T_b) у сусликов начинались с 0°C — 3°C (рис. 1а). Прогревание животных продолжалось около двух часов, что позволяло сделать многочисленные измерения и провести тщательный анализ динамики изменения коэффициента $Q10_{HR}$.

При спровоцированном выходе сусликов из гибернации, в первые 40 мин после начала пробуждения, при $T_h \leq 10^{\circ}\text{C}$, характерные значения $Q10_{HR}$ были высокими и достигали ~ 35 – 50 единиц (рис. 1а и 2а). При дальнейшем повышении температуры, наблюдалось постепенное снижение $Q10_{HR}$. В середине измерений, на 40–90 мин, что соответствовало интервалу температур $T_h = 10^{\circ}\text{C}$ — 35°C (рис. 1а), значения $Q10_{HR}$ постепенно снижались до величин 1.1–1.2 (рис. 1а и 2а).

Эксперименты на крысах. В наших экспериментах, охлаждение взрослых крыс до T_b ниже 16°C приводило к их гибели. В начале согревания, у крыс $Q10_{HR}$ резко увеличивалось примерно с 2.0 до 11.0 единиц (рис. 2б). Максимальное значение $Q10_{HR}$ наблюдалось при 18.5°C . Однако при дальнейшем повышении T_h до 35°C , наблюдалось постепенное снижение $Q10_{HR}$ примерно до 1.7.

Крысята переносили охлаждение тела лучше, чем взрослые. Известно, что в естественных условиях в гнезде T_b крысят может опускаться до 25°C при $T_a = 13^{\circ}\text{C}$ [47]. В наших экспериментах, крысята показали хорошую выживаемость при охлаждении тела до 10°C . Установлено, что в начале согревания, при $T_h \sim 10^{\circ}\text{C}$, величина $Q10_{HR}$ достигала 50 единиц (рис. 2с), но постепенно снижалась при повышении температуры до $T_h = 27^{\circ}\text{C}$. Дальнейший рост T_h у крысят был очень медленным, а полное восстановление T_h длилось примерно 3 ч и выходило за временные рамки наших экспериментов. Следует также отметить, что в норме, средний показатель T_b у крысят был значительно ниже, чем у взрослых крыс, и не превышал 33°C [48].

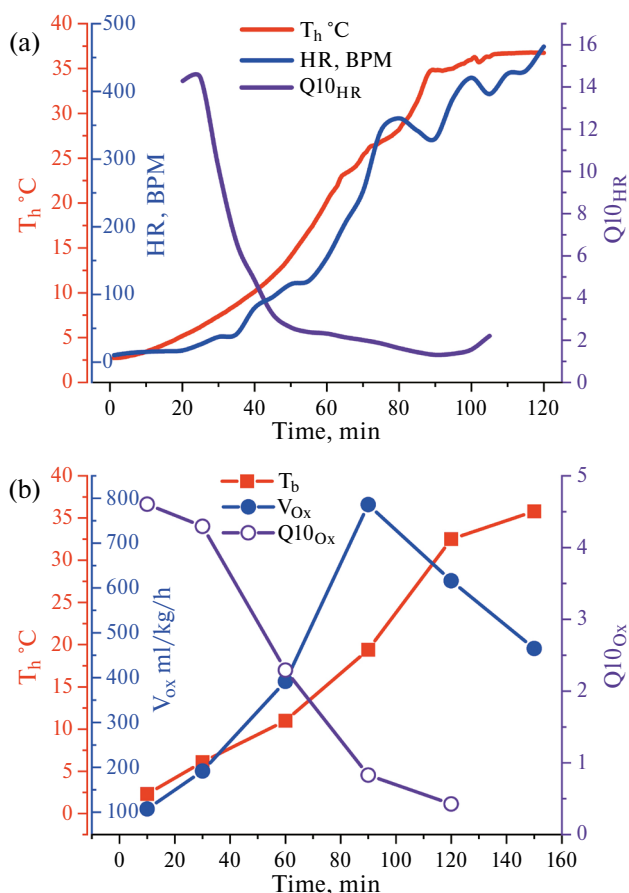


Рис. 1. Избранные примеры экспериментов, показывающие связь коэффициентов Q_{10} с изменением температурных и физиологических показателей, полученных при пробуждении сусликов. (a) — Изменение во времени полученных в эксперименте параметров T_h и HR, а также величин Q_{10HR} , вычисленных с использованием (3). Примечание: кривая Q_{10HR} короче кривых T_h и HR, поскольку, в соответствии с (3), кривая Q_{10HR} не включает первые и последние 15 минут измерений. (b) — Изменение во времени полученных в эксперименте параметров T_b и V_{Ox} , а также величин Q_{10Ox} , вычисленных с использованием (2).

Вычисления Q_{10Ox}

У сусликов, при выходе из гибернации, кривая роста T_h имела S-образную форму (рис. 1b). Аналогичным образом, увеличивалась также V_{Ox} в первые 90 мин, в течение которых температура сердца достигала комнатной температуры ($T_h = T_a = 20^\circ\text{C}$). В этот период происходило постепенное уменьшение Q_{10Ox} от 5 — 7 до 1 (рис. 1b и 2a'). При дальнейшем росте температуры ($T_h > T_a$) величина V_{Ox} парадоксальным образом уменьшалась (рис. 1b), что можно охарактеризовать как инверсию температурной зависимости: уменьшение потребления кислорода с увеличением T_b . Вследствие инверсии, при температуре T_b выше 20°C уровень Q_{10Ox} опускался ниже 1.0 (рис. 2 a').

В отличие от сусликов, при согревании взрослых крыс и крысят, коэффициент Q_{10Ox} не зависел от температуры и был постоянным во всем изученном диапазоне T_b . Так, у взрослых крыс Q_{10Ox} находился в пределах 2.0–2.1 (рис. 2b') в том же диапазоне температур ($20^\circ\text{C} - 32^\circ\text{C}$), в котором у сусликов наблюдалось снижение Q_{10Ox} до значений 1.0 — 0.0. У крысят Q_{10Ox} был близок к 1.2 во всем наблюдаемом диапазоне $8^\circ\text{C} - 35^\circ\text{C}$ (рис. 2c').

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы провели сравнительное исследование изменения температурного коэффициента Q_{10} для двух физиологических параметров при выходе из гибернации у сусликов, являющихся природными гибернаторами, а также при отогревании предварительно охлажденных взрослых крыс и крысят, которые не способны к гибернации в естественных условиях. Для вычисления величины Q_{10Ox} по формуле (2) мы измеряли объем потребляемого животными кислорода (V_{Ox}), а для вычисления величины Q_{10HR} по формуле (3) мы измеряли частоту сердечных сокращений (HR).

Необходимо отметить, что суслики, находящиеся в состоянии торпора, могут снижать температуру тела до околонулевых значений и находиться в этом состоянии в течение многих дней, тогда как лабораторные крысы погибают при охлаждении $T_b < 16^\circ\text{C}$. Поскольку диапазон изменения T_b при согревании у сусликов был значительно больше, чем у крыс, стало возможным более детальное исследование влияния температуры на исследуемые параметры. В наших экспериментах были использованы также крысята раннего постнатального периода, что позволило расширить возможности исследования этих животных, поскольку крысята способны выдерживать более интенсивное охлаждение, чем взрослые крысы, вплоть до 10°C [49].

В наших экспериментах на сусликах было использовано спровоцированное пробуждение за счет повышения внешней температуры. Таким образом, способ отогревания был единым для всех животных, поскольку в экспериментах на предварительно охлажденных взрослых крысах и крысятах, перемещение животных в теплое помещение для отогрева было строго необходимо.

В представленном исследовании мы использовали стандартная формула (2) для расчета Q_{10Ox} и эмпирически модифицированная формула (3) для общего анализа Q_{10HR} во всем диапазоне изменений T_b . Использование модифицированной формулы было связано с тем, что стандартная формула позволяет вычислять величину Q_{10} только для одной, произвольно выбранной точки, что следует из формулы. При этом, температурный диапазон для

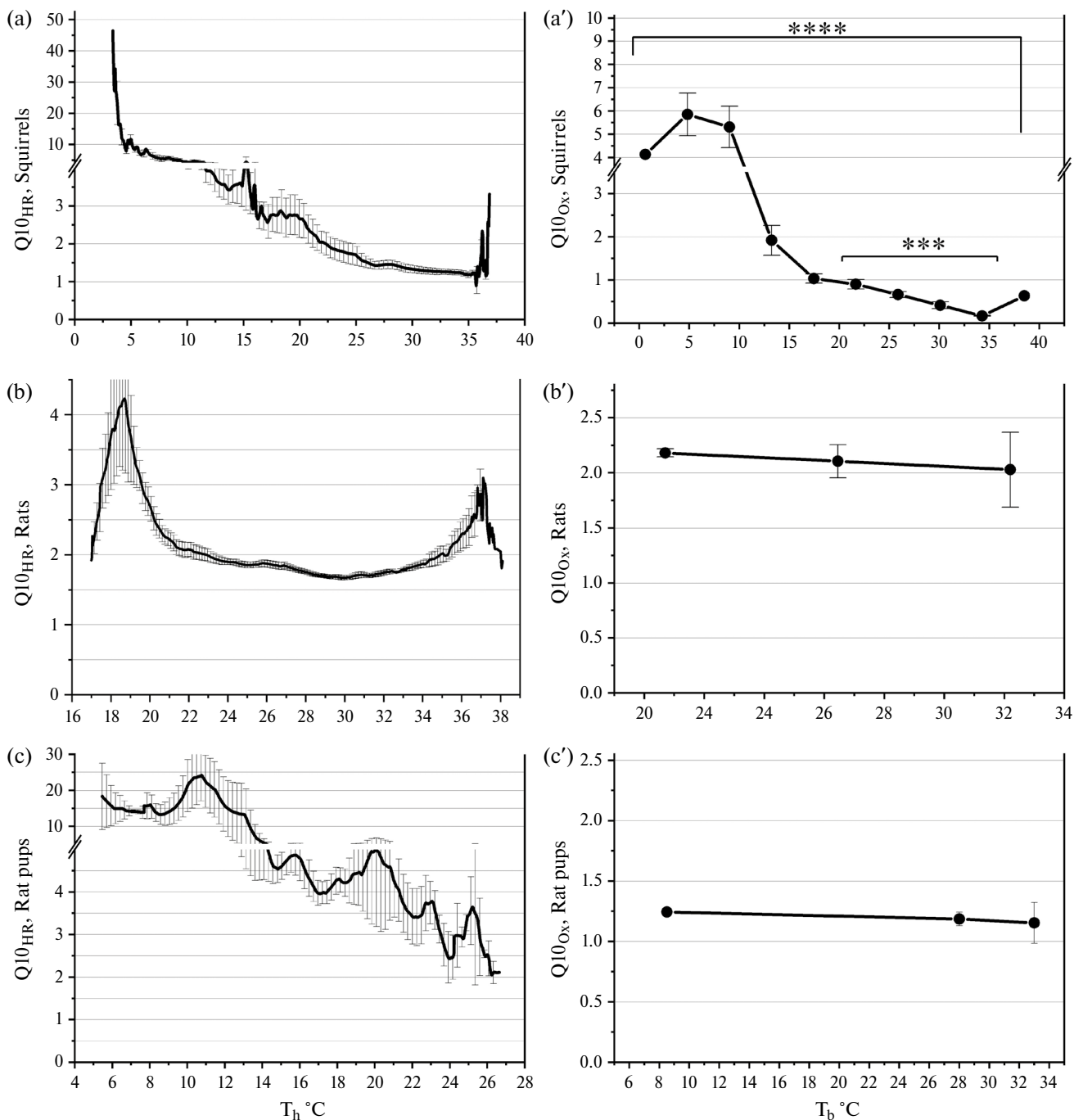


Рис. 2. Зависимость коэффициентов Q10 от температуры. Представлена зависимость Q10_{HR} от T_h, а также зависимость Q10_{Ox} от T_b. Где: (a, a') — спящие суслики, (b, b') — взрослые крысы, (c, c') — крысят. Значения представлены в форме Mean ± SEM, n = 5–10. Примечание: кривые a, b и c получены с использованием (3), тогда как кривые a', b' и c' получены с использованием (2). Однофакторный тест ANOVA (программное обеспечение GraphPad Prism 8) показывает, что средние данные Q10_{Ox} сусликов (a') зависели от температуры: **** P < 0.0001. Зависимость от температуры наблюдалась также при анализе выделенного диапазона температур 20°C — 35°C, когда значения находились в диапазоне 0 ≤ Q10_{Ox} ≤ 1, *** p < 0.0005. У взрослых крыс и крысят (b' и c') величины Q10_{Ox} статистически не зависели от температуры: p < 0.05.

вычислений также берется произвольно. При таком подходе невозможно получить объективную картину изменений этого параметра во всем диапазоне исследуемых температур. Применение модифици-

рованной формулы для расчета Q10_{HR} было оправданным, поскольку мы ежеминутно регистрировали частоту сердечных сокращений во время отогрева животных, продолжавшегося несколько часов, что

позволяло получить большой массив данных. Напротив, в измерениях потребления кислорода, имеющееся у нас оборудование позволяло провести в ходе эксперимента лишь несколько измерений, что делало целесообразным использование стандартной формулы для расчета $Q10_{Ox}$. Эксперименты на сусликах показали, что в начальный период повышения температуры после гибернации наблюдались неожиданно высокие значения $Q10_{Ox}$ (рис. 1а, 2а') и $Q10_{HR}$ (рис. 1б и 2а). У крысят аналогичное увеличение в ранние моменты согревания выявлено также в расчетах $Q10_{HR}$ (рис. 2с), но не $Q10_{Ox}$ (рис. 2с').

Известно, что выход из гибернации происходит под контролем симпатoadреналовой системы, что способствует увеличению частоты сердечных сокращений, кровотока и артериального давления. Эти изменения наиболее выражены на начальных этапах согревания тела [50]. Как недавно было показано, активация симпатической и депрессия парасимпатической нервной системы участвуют в повышении частоты сердечных сокращений во время пробуждения [51, 52, 52]. В начальный период выхода из гибернации животным необходимо удовлетворить возросшие энергетические потребности. Поэтому, активируется сердечно-сосудистая система и HR увеличивается [53, 33]. Повышение метаболической активности необходимо для энергетического обеспечения организма при согревании за счет различных физиологических процессов, таких как дрожательный и недрожательный термогенез [54, 55].

Повышенный уровень $Q10_{Ox}$ и $Q10_{HR}$ (рис. 2а-с, с') может быть связан с ускорением метаболизма и HR на фоне малых изменений T_b , наблюдающихся в начале отогрева, и может указывать на физиологическую регуляцию метаболических процессов, направленную на скорейшее повышение температуры тела за счет активации теплопродукции. Упомянутые высокие значения $Q10$, наблюдающиеся в начале отогрева, могут служить адаптивным механизмом, облегчающим выход из гипотермии у гибернирующих сусликов и у охлажденных крысят. Этот процесс существенно менее выражен у неадаптированных к гипотермии и неспособных гетеротермии взрослых крыс.

Можно предположить, что у крысят раннего постнатального периода проявляется способность к гетеротермии, учитывая отмеченную выше лучшую выживаемость крысят при охлаждении по сравнению со взрослыми крысами, а также повышенный уровень $Q10_{HR}$ в ранний период отогрева крысят и гибернирующих сусликов. Это согласуется с высказанным ранее предположением, что у крысят нормальная температура $T_b = 33^\circ\text{C}$ (что на 4°C ниже нормальной T_b у взрослых животных) необходима для защиты их ЦНС от аноксии [48]

Известно, что виды, способные к гетеротермии, широко распространены в большинстве групп млекопитающих [31]. Следует упомянуть, что суслики и крысы близко родственны, поскольку относятся к отряду *Rodentia*. Однако, способность к гетеротермии или её отсутствие может наблюдаться даже у систематически близких видов. Например, было известно, что мыши при определенных условиях способны к гетеротермии, тогда как у взрослых крыс ее не наблюдалось [56]. Однако, недавно было обнаружено, что дикая австралийская кустарниковая крыса *Rattus fuscipes* также обладает рудиментарными способностями к гетеротермии [57].

ВЫВОДЫ

В большинстве публикаций приводятся примеры усредненных данных о значении температурного коэффициента $Q10$ при исследовании температурной зависимости биологических процессов, как у гибернирующих, так и у негибернирующих гомеотермных организмов. При использовании этого подхода моменты, когда изменения T_b были небольшими или нестабильными, например, на начальном или конечном этапах охлаждения или согревания, часто игнорировались как нерепрезентативные.

Основываясь на экспериментальных данных, полученных на животных разных видов и возрастов, мы предлагаем подход к полному определению $Q10$ во всем диапазоне изменений T_b , который позволяет нам анализировать эти "неудобные" области, где мы обнаружили необычно высокие или низкие коэффициенты $Q10$ по сравнению с теми, которые предсказываются теорией Вант Гоффа — Аррениуса. Такие значения не характерны для большинства химических процессов в неживой материи и могут рассматриваться как результат регуляции физиологических процессов у живых организмов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.М.З.), сбор данных (Н.М.З., М.О.Х.), обработка данных (Ю.С.Т.), написание и редактирование манускрипта (Ю.С.Т., Н.М.З.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим д.ф.-м.н. Людмилу Владимировну Якушевич (ИБК РАН) за критический анализ статьи и полезные рекомендации по ее совершенствованию.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Представленная работа выполнена в соответствии с Этическим кодексом Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация) Директива ЕС 2010/63/EU для экспериментов на животных. Протоколы экс-

периментов одобрены Комиссией по биоэтике ИБК РАН (Идентификаторы: № 4/092021 от 08.09.2021 г. и 05/092021 от 08.09.2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания Института биофизики клетки РАН, 075-00609-24-01 и Институту теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tansey EA, Johnson CD* (2015) Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Ed* 39:139–148. <https://doi.org/10.1152/advan.00126.2014>
2. *Horii Y, Shiina T, Shimizu Y* (2018) The Mechanism Enabling Hibernation in Mammals. *Adv Exp Med Biol* 1081:45–60. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_3
3. *Ivanov KP* (2000) Physiological blocking of the mechanisms of cold death: theoretical and experimental considerations. *J Thermal Biol* 25:467–479. [https://doi.org/10.1016/s0306-4565\(00\)00012-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4565(00)00012-7)
4. *Carey HV, Andrews MT, Martin SL* (2003) Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature. *Physiol Rev* 83:1153–1181. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2003>
5. *Ruf T, Geiser F* (2014) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev* 90:891–926. <https://doi.org/10.1111/brv.12137>
6. *Davidson JO, Wassink G, van den Heuvel LG, Bennet L, Gunn AJ* (2015) Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy — Where to from Here? *Front Neurol* 6:198. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00198>
7. *Han Z, Liu X, Luo Y, Ji X* (2015) Therapeutic hypothermia for stroke: Where to go? *Experimental Neurology* 272:67–77. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.06.006>
8. *Huang F-Y, Huang B-T, Wang P-J, Zuo Z-L, Heng Y, Xia T-L, Gui Y-Y, Lv W-Y, Zhang C, Liao Y-B, Liu W, Chen M, Zhu Y* (2015) The efficacy and safety of prehospital therapeutic hypothermia in patients with out-of-hospital cardiac arrest: A systematic review and meta-analysis. *Resuscitation* 96:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2015.08.005>
9. *Otto KA* (2015) Therapeutic hypothermia applicable to cardiac surgery. *Vet Anaesth Analg* 42:559–569. <https://doi.org/10.1111/vaa.12299>
10. *Cerri M, Hitrec T, Luppi M, Amici R* (2021) Be cool to be far: Exploiting hibernation for space exploration. *Neurosci Biobehav Rev* 128:218–232. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.037>
11. *Choukèr* (2018) Hibernating astronauts—science or fiction? *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.*
12. *Zakharova NM, Tarahovsky YS, Komelina NP, Fadeeva IS, Kovtun AL* (2021) Long-term pharmacological torpor of rats with feedback-controlled drug administration. *Life Sci Space Res* 28:18–21. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2020.11.002>
13. *Kornhall DK, Martens-Nielsen J* (2016) The prehospital management of avalanche victims. *J R Army Med Corps* 162:406–412. <https://doi.org/10.1136/jramc-2015-000441>
14. *Sward DG, Bennett BL* (2014) Wilderness medicine. *World J Emerg Med* 5:5–15. <https://doi.org/10.5847/wjem.j.isn.1920-8642.2014.01.001>
15. *Alam HB* (2012) Translational barriers and opportunities for emergency preservation and resuscitation in severe injuries. *Br J Surg* 99 Suppl 1:29–39. <https://doi.org/10.1002/bjs.7756>
16. *Tarahovsky YS, Khrenov MO, Kovtun AL, Zakharova NM* (2020) Comparison of natural and pharmacological hypothermia in animals: Determination of activation energy of metabolism. *Journal of Thermal Biology* 92:102658. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102658>
17. *Zakharova NM, Tarahovsky YS, Fadeeva IS, Zakharova NM* (2019) A pharmacological composition for induction of a reversible torpor-like state and hypothermia in rats. *Life Sci* 219:190–198. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.023>
18. *Shimaoka H, Shiina T, Suzuki H, Horii Y, Horii K, Shimizu Y* (2021) Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci* 71:10. <https://doi.org/10.1186/s12576-021-00794-1>
19. *Yang Y, Yuan J, Field RL, Ye D, Hu Z, Xu K, Xu L, Gong Y, Yue Y, Kravitz AV, Bruchas MR, Cui J, Brestoff JR, Chen H* (2023) Induction of a torpor-like hypothermic and hypometabolic state in rodents by ultrasound. *Nat Metab* 5:789–803. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00804-z>
20. *Bridwell RE, Willis GC, Gottlieb M, Koyfman A, Long B* (2021) Decompensated hypothyroidism: A review for the emergency clinician. *Am J Emerg Med* 39:207–212. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.09.062>
21. *Naito H, Nojima T, Fujisaki N, Tsukahara K, Yamamoto H, Yamada T, Aokage T, Yumoto T, Osako T, Nakao A* (2020) Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine. *Acute Med Surg* 7:e501. <https://doi.org/10.1002/ams2.501>
22. *Zakharova NM, Tarahovsky YS, Komelina NP, Khrenov MO, Kovtun AL* (2021) Pharmacological torpor prolongs rat survival in lethal normobaric hypoxia. *J Thermal Biol* 98:102906. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102906>

23. *Bejaoui M, Pantazi E, Folch-Puy E, Baptista PM, García-Gil A, Adam R, Roselló-Catafau J* (2015) Emerging concepts in liver graft preservation. *World J Gastroenterol* 21:396–407.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i2.396>
24. *Minor T, Paul A* (2013) Hypothermic reconditioning in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 18:161–167.
<https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32835e29de>
25. *Søreide K* (2014) Clinical and translational aspects of hypothermia in major trauma patients: from pathophysiology to prevention, prognosis and potential preservation. *Injury* 45:647–654.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.12.027>
26. *Soo E, Welch A, Marsh C, McKay D* (2020) Molecular strategies used by hibernators: Potential therapeutic directions for ischemia reperfusion injury and preservation of human donor organs. *Transplant Rev* 34:100512.
<https://doi.org/10.1016/j.trre.2019.100512>
27. *Kang K* (2016) Exceptionally high thermal sensitivity of rattlesnake TRPA1 correlates with peak current amplitude. *Biochim Biophys Acta* 1858:318–325.
<https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.12.011>
28. *Hiebert SM, Noveral J* (2007) Are chicken embryos endotherms or ectotherms? A laboratory exercise integrating concepts in thermoregulation and metabolism. *Adv Physiol Educ* 31:97–109.
<https://doi.org/10.1152/advan.00035.2006>
29. *Schmidt-Nielsen K* (1990) *Animal physiology: Adaptation and environment*, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, New York
30. *Geiser F* (2016) Conserving energy during hibernation. *J Exp Biol* 219:2086–2087.
<https://doi.org/10.1242/jeb.129171>
31. *Geiser F* (2004) Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Ann Rev Physiol* 66:239–274.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>
32. *Kampmann B, Bröde P* (2019) Heat Acclimation Does Not Modify Q10 and Thermal Cardiac Reactivity. *Front Physiol* 10:1524.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01524>
33. *Currie SE, Noy K, Geiser F* (2015) Passive rewarming from torpor in hibernating bats: minimizing metabolic costs and cardiac demands. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308:R34–41.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00341.2014>
34. *Bröde P, Kampmann B* (2018) Accuracy of metabolic rate estimates from heart rate under heat stress—an empirical validation study concerning ISO 8996. *Ind Health* 57:615–620.
<https://doi.org/10.2486/indhealth.2018-0204>
35. *Kampmann B, Bröde P* (2015) Metabolic costs of physiological heat stress responses — Q10 coefficients relating oxygen consumption to body temperature. *Extrem Physiol Med* 4:A103.
<https://doi.org/10.1186/2046-7648-4-S1-A103>
36. *Michenfelder JD, Milde JH* (1991) The relationship among canine brain temperature, metabolism, and function during hypothermia. *Anesthesiology* 75:130–136.
<https://doi.org/10.1097/0000542-199107000-00021>
37. *Song X, Körtner G, Geiser F* (1997) Thermal relations of metabolic rate reduction in a hibernating marsupial. *Am J Physiol* 273:R2097–104.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R2097>
38. *Liu B, Hui K, Qin F* (2003) Thermodynamics of Heat Activation of Single Capsaicin Ion Channels VR1. *Biophysical Journal* 85:2988–3006.
39. *Fohlmeister JF* (2015) Voltage gating by molecular subunits of Na⁺ and K⁺ ion channels: higher-dimensional cubic kinetics, rate constants, and temperature. *J Neurophysiol* 113:3759–3777.
<https://doi.org/10.1152/jn.00551.2014>
40. *Andjus RK, Smith AU* (1954) Revival of hypothermic rats after arrest of circulation and respiration. *J Physiol* 123:66P–67P.
41. *Andjus RK, Smith AU* (1955) Reanimation of adult rats from body temperatures between 0 and + 2 degrees C. *J Physiol* 128:446–472.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1955.sp005318>
42. *Andjus RK, Dzakula Z, Markley JL, Macura S* (2005) Brain energetics and tolerance to anoxia in deep hypothermia. *Ann N Y Acad Sci* 1048:10–35.
<https://doi.org/10.1196/annals.1342.003>
43. *Lomako VV, Shilo AV* (2009) Effect of General Cooling on Rat Behaviour in "Open Field" Test. *Probl Cryobiol* 19:421–430.
44. *Bullard RW, Funkhouser GE* (1962) Estimated regional blood flow by rubidium 86 distribution during arousal from hibernation. *Am J Physiology-Legacy Content* 203:266–270.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.203.2.266>
45. *Zakharova NM* (2014) Some features of body warming at provoked awakening of hibernating ground squirrels *Spermophilus undulatus*. *Fundamental Res* 6:1401–1405. (In Russ).
46. *Mundim KC, Baraldi S, Machado HG, Vieira FMC* (2020) Temperature coefficient (Q10) and its applications in biological systems: Beyond the Arrhenius theory. *Ecol Model* 431:109127.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109127>
47. *Rogalska J, Caputa M* (2005) Spontaneously reduced body temperature and gasping ability as a mechanism of extreme tolerance to asphyxia in neonatal rats. *J Thermal Biol* 30:360–369.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.02.003>
48. *Kletkiewicz H, Rogalska J, Nowakowska A* (2016) Effects of body temperature on post-anoxic oxidative stress from the perspective of postnatal physiological adaptive processes in rats. *J Physiol Pharmacol* 67:287–299.
49. *Geiser F, Currie SE, O'Shea KA, Hiebert SM* (2014) Torpor and hypothermia: reversed hysteresis of metabolic rate and body temperature. *Am J Physiol-Regul, Integrat Comparat Physiol* 307:R1324–R1329.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00214.2014>

50. Lyman CP, Williams JS, Malan A, Wang LCH (1984) Hibernation and torpor in mammals and birds. Academic Press, New York.
51. Zanetti F, Chen C-Y, Baker HA, Sugiura MH, Drew KL, Barati Z (2023) Cardiac Rhythms and Variation in Hibernating Arctic Ground Squirrels. *Physiol Biochem Zool* 96:167–176.
<https://doi.org/10.1086/724688>
52. MacCannell ADV, Jackson EC, Mathers KE, Staples JF (2018) An improved method for detecting torpor entrance and arousal in a mammalian hibernator using heart rate data. *J Exp Biol* 221.
<https://doi.org/10.1242/jeb.174508>
53. Milsom WK, Zimmer MB, Harris MB (1999) Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. *Com Biochem Physiol Part A: Mol & Integrat Physiol* 124:383–391.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00130-0](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00130-0)
54. Shinde AB, Song A, Wang QA (2021) Brown Adipose Tissue Heterogeneity, Energy Metabolism, and Beyond. *Front Endocrinol* 12:651763.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.651763>
55. Nedergaard J, Cannon B (2018) Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00009-6>
56. Shimaoka H, Kawaguchi T, Morikawa K, Y Sano, K Naitou, H Nakamori, T Shiina, Y Shimizu (2017) Induction of hibernation-like hypothermia by central activation of the A1 adenosine receptor in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci* 68:425–430.
<https://doi.org/10.1007/s12576-017-0543-y>
57. Nowack J, Turbill C (2022) Survivable hypothermia or torpor in a wild-living rat: rare insights broaden our understanding of endothermic physiology. *J Comp Physiol B* 192:183–192.
<https://doi.org/10.1007/s00360-021-01416-3>

COMPARATIVE STUDY OF THE TEMPERATURE COEFFICIENT Q10 OF HIBERNATING GROUND SQUIRRELS *UROCITELLUS UNDULATUS* AND COOLED RATS OF DIFFERENT AGES

N. M. Zakharova^{a, #}, Y. S. Tarahovsky^{a, b, ##} and M. O. Khrenov^a

^a Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia

[#] e-mail: n_m_zakharova@pbcra.ru

^{##} e-mail: tarahov@rambler.ru

The temperature coefficients $Q10$ of heart rate ($Q10_{HR}$) or oxygen consumption ($Q10_{Ox}$) were analyzed during the arises from torpor of long-tailed ground squirrels *Urocitellus undulatus*, as well as during the rewarming of precooled adult rats and rat pups. The $Q10_{Ox}$ value was calculated using a standard equation, whereas for calculating $Q10_{HR}$, the equation was empirically modified to track changes in this parameter over a wide range of body temperatures (T_b). It was found that during the initial period of rewarming from torpor, at $T_h \leq 10$ °C, ground squirrels experienced a sharp increase in the temperature coefficients up to $Q10_{HR} = 40 - 50$ and $Q10_{Ox} = 6 - 7$. Even higher values of $Q10_{HR} > 100$ were found at the beginning of rewarming of rat pups, although they had a low level of $Q10_{Ox} = 1.2$. Adult rats could not withstand cooling below 16 °C and demonstrated moderate variability of both $Q10_{HR} = 2.0 - 4.0$ and $Q10_{Ox} = 2.0 - 2.2$. During the restoration of normal T_b , the $Q10_{HR}$ in all animals approached the level ~ 2.0 predicted by the Van't Hoff-Arrhenius rule for chemical reactions in both living and inanimate nature. We assume that high values of $Q10_{HR}$ and $Q10_{Ox}$, detected in the early period of ground squirrel's arousal from hibernation, may reveal the functioning of adaptive processes aimed at accelerating body warming. Resistance to cooling and high $Q10_{HR}$ coefficient in the rat pups may indicate rudimentary adaptability to hibernation in the juvenile period of rats, as representatives of the order Rodentia, which also includes natural hibernators such as ground squirrels.

Keywords: Rat; Rat pup; Ground squirrel; Hibernation Q10 coefficient; Heart rate; Oxygen consumption

ЭФФЕКТЫ СТИМУЛЯЦИИ БОЛЬШОГО ЯДРА ШВА НА НОЦИЦЕПТИВНЫЕ НЕЙРОНЫ КАУДАЛЬНОЙ ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ РЕТИКУЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫСЫ В НОРМЕ И ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО КИШЕЧНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

© 2024 г. Б. М. Сушкевич¹, И. Б. Сиваченко¹, О. А. Любашина^{1, *}

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

* e-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Поступила в редакцию 26.06.2024 г.

После доработки 29.07.2024 г.

Принята к публикации 30.07.2024 г.

Большое ядро шва (БЯШ) является ключевой структурой эндогенной антиноцицептивной системы, в регуляции активности которой важную роль играют серотониновые 5-НТ1А рецепторы. К реципиентам нисходящих проекций БЯШ относится каудальная вентролатеральная ретикулярная область продолговатого мозга (кВЛРО) — первый супраспинальный центр обработки висцеральных и соматических болевых сигналов. Известно, что кишечная патология вызывает в БЯШ устойчивые функциональные перестройки, ассоциированные с развитием висцеральной и соматической гипералгезий. Предположительно, следствием таких перестроек могут являться изменения в модулирующих влияниях БЯШ на ноцицептивную активность кВЛРО. Однако конкретные нейрональные и молекулярные механизмы, лежащие в основе таких влияний в норме, а также их изменения при патологии остаются неисследованными. Целью наших нейрофизиологических экспериментов на анестезированных взрослых самцах крыс Вистар являлось сравнительное изучение эффектов электростимуляции БЯШ на активность нейронов кВЛРО, вызываемую висцеральным (колоректальное растяжение, КРР) и соматическим (сдавливание хвоста) болевыми стимулами, в норме и после перенесенного кишечного воспаления (колита) с оценкой вклада в эти процессы супраспинальных 5-НТ1А рецепторов при их активации интрацеребровентрикулярным введением буспирона. Показано, что БЯШ способно оказывать тормозное влияние как на неселективные, так и дифференцированные реакции нейронов кВЛРО на разные болевые стимулы, вызывая ослабление возбуждающих и усиление тормозных нейрональных ответов на КРР при подавлении обоих типов реакций на сдавливание хвоста. Действие БЯШ на ноцицептивное возбуждение бульбарных нейронов усиливается после активации супраспинальных 5-НТ1А рецепторов буспироном. Установлено, что в постколитный период тормозные влияния БЯШ на разные популяции бульбарных нейронов существенно ослабевают, свидетельствуя о нарушении антиноцицептивной функции ядра. При этом нивелируется 5-НТ1А рецептор-зависимая компонента его нисходящих влияний. Выявленные изменения могут вносить вклад в супраспинальные механизмы патогенеза поствоспалительной абдоминальной боли и коморбидных ей соматических гипералгезий.

Ключевые слова: большое ядро шва, каудальная вентролатеральная ретикулярная область, нейрональная активность, 5-НТ1А рецепторы, абдоминальная ноцицепция, соматическая ноцицепция, постколитный период.

DOI: 10.31857/S0044452924050052, EDN: XPFAOK

ВВЕДЕНИЕ

Большое ядро шва (БЯШ), расположенное в ростральной вентромедиальной области продолговатого мозга, является одной из ключевых серотонинергических структур эндогенной антиноцицептивной системы и основной релейной станцией для модулирующих влияний на ноцицепцию вышележащих стволовых и переднемозговых структур [1–4]. Это ядро получает болевую информацию от разных областей тела по спиноталамическому и

спиноретикулярному трактам, либо через парабрахиальный комплекс моста [5–7] и, в свою очередь, формирует прямые и опосредованные нижележащими структурами проекции на дорсальный рог спинного мозга [3, 8]. В экспериментальных исследованиях продемонстрированы антиноцицептивные эффекты электрической, фармакологической и оптогенетической стимуляции БЯШ, проявляющиеся в моделях как соматической [9–11], так и висцеральной боли [12, 13]. Их реализацию пре-

имущественно связывают с непосредственным влиянием ядра на спинальную ноцицептивную трансмиссию [2, 4], подтверждением чему служит наблюдающееся при стимуляции БЯШ подавление реакций ноцицептивных нейронов спинного мозга на соматические и висцеральные болевые стимулы [14–16].

В то же время, одним из важных реципиентов нисходящих проекций БЯШ является каудальная вентролатеральная ретикулярная область продолговатого мозга (кВЛРО) [17, 18], которая представляет собой первый церебральный центр обработки разного рода болевых сигналов, поступающих по нескольким параллельным спинальным путям, а также центр формирования адекватных им кардиоваскулярных и моторных реакций [2, 19, 20]. Установлено, что кВЛРО содержит специфические популяции ноцицептивных нейронов, которые дифференцированным образом реагируют на висцеральные и соматические болевые воздействия [21, 22]. Эту структуру рассматривают в качестве важного звена супраспинального контроля болевой чувствительности, модуляция активности которого ростральной вентромедиальной областью продолговатого мозга и, в частности, БЯШ может вносить существенный вклад в адекватное функционирование эндогенной антиноцицептивной системы и нарушаться при развитии хронических болевых синдромов [2, 23]. Однако эффекты активации БЯШ на ноцицептивную активность нейронов кВЛРО, а также изменения в них, которые могут быть вызваны той или иной патологией, остаются неисследованными.

В экспериментах на разных видах животных было показано, что патология органов пищеварительного тракта сопровождается функциональными перестройками в БЯШ. В частности, у коз и грызунов с воспалительным или инфекционным повреждением толстой кишки в этой структуре были отмечены повышенные уровни продукции *c-fos* белков и провоспалительных цитокинов [24, 25], а также изменения возбуждающих и тормозных реакций её нейронов на висцеральное и соматическое болевое раздражение [26]. Эти изменения в БЯШ были ассоциированы с повышенной висцеральной болевой чувствительностью (гипералгией) на поведенческом уровне [25, 26]. Согласно данным наших предыдущих исследований на крысах, вызванные кишечным воспалением перестройки в активности нейронов БЯШ с разными ноцицептивными входами наблюдаются, как минимум, на протяжении месяца после разрешения органической патологии, свидетельствуя о развитии устойчивых изменений в возбудимости его различных клеточных популяций [27]. Представляется разумным предположить, что одним из следствий таких перестроек, способствующим продемонстрированной ранее поствос-

палительный гипералгии [28], могут являться изменения в модулирующих влияниях БЯШ на нисходящие ноцицептивные структуры, в частности, на кВЛРО, которая в условиях текущей кишечной патологии и после нее проявляет повышенную реактивность к висцеральным и соматическим болевым стимулам [21, 28, 29]. Между тем, конкретные экспериментальные факты, подтверждающие или опровергающие это предположение, на данный момент времени отсутствуют.

Хорошо известно, что важную роль в регуляции функциональной активности БЯШ и его антиноцицептивных влияний играют серотониновые 5-НТ1А рецепторы. Эти метаболитные рецепторы, связанные с ингибиторным Gi/Go белком, в значительном количестве экспрессируются в БЯШ [30, 31], обеспечивая тормозное действие своего лиганда на локальные серотонин-синтезирующие нейроны и взаимодействующие с ними несеротониновые, в частности, глутамат- и ГАМКергические клетки [31–33]. Установлено, что 5-НТ1А-зависимые механизмы вовлечены в реализацию нисходящих влияний БЯШ на соматическую болевую чувствительность [34, 35] и, в частности, в эффекты его стимуляции на спинальные ноцицептивные нейроны [36, 37]. При этом обнаружено, что экспрессия 5-НТ1А рецепторов в БЯШ и на спинальном уровне [31, 38], а также их вклад в указанные выше процессы [34–36] могут изменяться при соматической патологии. В свою очередь, как показали наши недавние исследования, висцеральная ноцицептивная нейротрансмиссия в кВЛРО также находится под 5-НТ1А рецептор-зависимым контролем, который претерпевает изменения после перенесенного кишечного воспаления [28, 39]. Предположительно, определенную роль в контроле ноцицептивной активности кВЛРО могут играть нисходящие проекции со стороны БЯШ, регулируемые 5-НТ1А рецепторами этого ядра и/или таковыми, экспрессируемыми в кВЛРО [40, 41]. Однако участие 5-НТ1А-зависимых механизмов в модулирующих влияниях БЯШ на висцеральную и соматическую болевую трансмиссию на уровне кВЛРО и их возможные изменения после перенесенной висцеральной патологии еще никем не было исследовано.

На основании изложенного выше, целью проведенных нами нейрофизиологических экспериментов на анестезированных крысах являлось сравнительное изучение эффектов стимуляции БЯШ на активность нейронов кВЛРО, вызываемую висцеральными и соматическими болевыми стимулами, в отсутствие патологии и после перенесенного кишечного воспаления (колита) с оценкой вклада в эти процессы супраспинальных 5-НТ1А рецепторов при их активации интрацеребровентрикулярным введением 5-НТ1А агониста буспирона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 92 взрослых самцах крыс Вистар с исходной массой тела 270–350 г (возраст 2–3 месяца). Животные получены из Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, были выращены и содержались в стандартных условиях вивария (12 ч день/12 ч ночь, свободный доступ к пище и воде). После доставки в лабораторию крыс содержали в сходных условиях, позволив им адаптироваться в течение как минимум 3 дней до начала исследования.

Животные были случайным образом разделены на две группы: здоровый контроль (47 крыс) и подвергнутые кишечному воспалению (45 особей). Крысам второй группы после 16-часовой пищевой депривации с неограниченным доступом к воде инициировали колит по методу Дж. Морриса с соавторами [42]. Для этого с помощью приемов, подробно описанных ранее [21, 28, 43], через инсулиновый шприц с 7-сантиметровым полиэтиленовым катетером в ободочную кишку трансректально вводили 20 мг пикрилсульфониевой кислоты (TNBS, Sigma-Aldrich, США), растворенных в 0.25 мл 50% раствора этанола. После процедуры крыс содержали по 3–5 особей в клетке в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Животных забирали в эксперимент через 30–49 дней после инъекции, когда они переставали демонстрировать внешние признаки колита (размягченный или жидкий стул, плохой аппетит, потеря веса).

В день проведения нейрофизиологического эксперимента животное из контрольной или экспериментальной группы после 16-часового голодания внутрибрюшинно анестезировали смесью уретана (800 мг/кг; Sigma-Aldrich, США) и альфа-хлоралозы (60 мг/кг; Sigma-Aldrich, США). Дальнейшие хирургические процедуры были аналогичны описанным ранее [27, 43, 44]. Вкратце, после достижения хирургического уровня анестезии устанавливали катетеры в бедренные артерию и вену (для мониторинга артериального давления и внутривенных инъекций), затем производили трахеостомию (для облегчения дыхания). Голову животного, закрепленную в стереотаксическом приборе RWD 68026 (RWD Life Science Co., Китай), наклоняли под углом 30° к горизонтальной плоскости. Рассекали мягкие ткани дорсальной поверхности шеи и удаляли нижнюю часть затылочной кости с подлежащей твердой мозговой оболочкой, чем обеспечивали доступ к каудальной части продолговатого мозга, содержащей кВЛРО. Ткань мозга смачивали теплым физиологическим раствором. Для электростимуляции БЯШ просверливали отверстие в зоне его проекции на межтеменную кость черепа согласно стандартному атласу мозга крысы [45]. Через от-

верстие в пределах стереотаксических координат левой части ядра (9.7–11.5 мм каудальнее брегмы, 0.0–0.5 мм латеральнее средней линии, 9.9–10.4 мм от поверхности мозга) погружали монополярный вольфрамовый стимулирующий электрод в лаковой изоляции (диаметр кончика 2 мкм, сопротивление 80 кОм). Стальной индифферентный электрод закрепляли в правой височной мышце. Для экспериментов с интрацеребровентрикулярным введением буспирона или физраствора в черепе дополнительно в соответствии с данными атласа мозга крысы [45] просверливали небольшое отверстие над левым боковым желудочком мозга, через которое стереотаксически погружали иглу шприца Гамильтона (1.2 мм каудальнее брегмы, 2.0 мм латеральнее средней линии, глубина 4.0 мм от поверхности коры).

Внеклеточную регистрацию активности нейронов кВЛРО осуществляли с использованием вольфрамовых микроэлектродов в лаковой изоляции (диаметр кончика 1 мкм, сопротивление 0.98–1.1 МОм; World Precision Instruments, США). Электроды погружали в левую кВЛРО с помощью электронного микроманипулятора (MD842, Siskiyou Corporation, США) в пределах области, локализованной 0.8–1.5 мм роstralнее задвижки и 1.8–2.1 мм латеральнее средней линии на глубине 2.6–3.6 мм от дорсальной поверхности продолговатого мозга. Стальной игольчатый индифферентный электрод помещали в контралатеральную затылочную мышцу. Отводимые регистрирующим микроэлектродом сигналы усиливали и фильтровали в диапазоне частот 400–5000 Гц с помощью DAM 80 (World Precision Instruments, США). После преобразования аналого-цифровым интерфейсом CED Power1401-3 (Cambridge Electronic Design, Великобритания) на частоте 20 кГц, сигналы передавали в персональный компьютер с программным обеспечением Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Великобритания) для отображения, предварительной обработки в режиме реального времени и последующего сохранения.

Помимо нейрональной активности, в программе Spike 2 в режиме реального времени отображался уровень системного артериального давления (АД), которое регистрировалось через канюлю в бедренной артерии с помощью датчика давления (MLT844, ADInstruments Inc., США) и мостового усилителя (FE221, ADInstruments, США), передающего сигналы аналого-цифровому интерфейсу CED Power1401-3. Стабильный уровень АД при отсутствии экспериментальных воздействий служил показателем адекватности анестезии. При существенных колебаниях или повышении этого показателя внутривенно вводили дополнительное количество анестезирующей смеси. Температуру тела животного во время эксперимента контролировали

ректально и поддерживали на уровне 37.4–38.0°C с использованием использованием подогревающей пластины и водяного термостата (U-10, Германия).

Электростимуляцию БЯШ осуществляли прямоугольными импульсами тока отрицательной полярности амплитудой 0.5–2.0 В и длительностью 0.2 мс, которые предъявляли с частотой 50 Гц в течение 3 с при помощи стимулятора Isostim A320 (World Precision Instruments, США), управляемого компьютером посредством программы Spike 2. Параметры стимуляции были выбраны исходя из данных исследований, свидетельствующих о способности электрораздражения БЯШ со сходными характеристиками оказывать антиноцицептивный эффект на анестезированных и бодрствующих животных [12, 13–15, 37, 46, 47].

Висцеральная болевая стимуляция представляла собой колоректальное растяжение, которое производили посредством раздувания воздухом (до давления 80 мм рт. ст.) резинового баллона длиной 7 см. Последний вводили трансректально и присоединяли через Y-образный разъем к электрическому воздушному насосу (ДС-09, Висма-Планар, Беларусь) и к сфингоманометру. В качестве соматического болевого раздражения применяли контролируемое алгезиметром ВЮ-РР-Р (Bioseb SAS, Франция) сдавливание основания хвоста животного сенсорным пинцетом с нагрузкой 650–900 г. Отчетливо видимые изменения уровня системного артериального давления, вызываемые применяемыми стимулами, служили индикатором их ноцицептивного действия.

В первой серии экспериментов на 26 здоровых крысах и 24 животных, перенесших колит, были изучены ноцицептивные реакции нейронов кВЛРО до и после электростимуляции БЯШ. Для каждого регистрируемого нейрона оценивали его исходные ответы на висцеральное и затем (с интервалом не менее 3 мин) — на соматическое болевое раздражение. В каждом случае запись осуществляли на 3-минутном интервале: 60 с до стимуляции (фоновый показатель), 60 с во время болевого воздействия и 60 с после него. Далее эти же реакции нейрона поочередно (с интервалом не менее 3 мин) оценивали в условиях электростимуляции БЯШ. При этом в каждом случае текущую фоновую активность регистрировали в течение 57 с, затем применяли 3-секундную стимуляцию БЯШ и сразу после её окончания проводили 60-секундное висцеральное или соматическое воздействие с последующим 60-секундным постстимульным периодом. У одного животного нейрональную активность кВЛРО подобным образом регистрировали в 3–5 разных точках локализации регистрирующего электрода, отстоящих друг от друга не менее, чем на 150 мкм.

Во второй серии экспериментов, выполненных на 21 здоровой крысе и 21 животном, перенесшем колит, были изучены эффекты электростимуляции БЯШ на реакции нейронов кВЛРО, вызываемые висцеральными и соматическими болевыми стимулами после введения 5-НТ1А агониста буспилона или физиологического раствора (в качестве контроля) в левый латеральный желудочек мозга. Как здоровые, так и перенесшие воспаление крысы были случайным образом разделены на три равные подгруппы (по 7 особей в каждой), которые в интрацеребровентрикулярной инъекции объемом 0.3 мкл получили 0.3 мкг буспилона, 1 мкг последнего или только его растворитель физраствор, соответственно. Количества буспилона были выбраны на основании анальгетического действия его эквивалентных количеств при интрацеребровентрикулярном введении у бодрствующих грызунов в моделях соматической боли [48]. У всех животных нейрональные эффекты электростимуляции БЯШ оценивали до инъекции, а также через 5, 15, 30, 45 и 60 мин после введения буспилона или физиологического раствора. В каждый момент времени поочередно (с интервалом не менее 3 мин) производили 3-минутные записи с реакциями нейронов кВЛРО на висцеральное или соматическое болевое воздействия после 3-секундной активации БЯШ, которые осуществлялись аналогично описанным в первой серии экспериментов.

В обеих экспериментальных сериях после завершения процедуры регистрации животное подвергали эвтаназии внутривенным введением трехкратной дозы анестезирующей смеси, после чего выполняли электролитическое разрушение ткани мозга пропусканием через регистрирующий и стимулирующий электрод постоянного тока отрицательной полярности (0.5–1.2 мА; 40 секунд). Мозг извлекали и фиксировали в 10% растворе параформальдегида. Локализацию мест регистрации производили на срезах мозга толщиной 40 мкм, обработанных по методу Ниссля, с помощью атласа мозга крысы [45]. По завершении каждого опыта у здоровых крыс и животных, перенесших колит, был осуществлен забор фрагмента толстой кишки длиной 8 см от ануса для визуального анализа и последующего гистологического окрашивания эозином и гематоксилином с целью исключения активного кишечного воспаления.

В процессе последующего оффлайн анализа в программе Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Великобритания) из полученных в разных экспериментах записей выделяли импульсные последовательности для отдельных нейронов кВЛРО. Как правило, удавалось выделить активность 3–5 нейронов. Исходно для каждой изолированной по амплитуде и форме последовательности спайков рас-

считывали среднюю частоту разрядов в периоды до (фоновый уровень), во время болевого воздействия и после стимуляции. Нейрон считали реагирующим на применяемые болевые стимулы, если частота его разрядов во время раздражения изменялась от фонового значения не менее чем на 15%. Для оценки модулирующего влияния БЯШ, реакцию нейрона на то или иное болевое раздражение, зарегистрированную после электростимуляции БЯШ, выражали в процентах от исходного ответа. Для оценки влияния на нейрональные эффекты БЯШ интрацеребровентрикулярного введения разных количеств буспирона или физиологического раствора, амплитуду ноцицептивного ответа, продемонстрированного нейроном после стимуляции БЯШ, оценивали до и в разные моменты времени после конкретной инъекции.

Статистическую обработку, сравнение и графическое представление результатов, полученных в разных условиях и на разных группах животных, производили в программах Origin 2017 (OriginLab, США) и IBM SPSS Statistics v. 21.0 (IBM Corp., США). В связи с выявленным тестом Шапиро–Вилка отклонением анализируемых выборок от нормального распределения, их статистические сравнения выполняли с использованием непараметрических методов. Для внутригрупповых сравнений применяли тест Фридмана и парный тест Вилкоксона, для сравнений между группами использовали тесты Крускала–Уоллиса и Манна–Уитни–Вилкоксона. Эффекты влияния и взаимодействия разных экспериментальных факторов оценивали с помощью смешанной модели дисперсионного анализа (ANOVA) на рангах с апостериорным анализом, применяющим поправку Бонферрони для множественных сравнений. Данные выражены в виде медианы с межквартильным размахом (Me [Q1; Q3]). Для оценки различий между группами по частотам проявления тех или иных нейрональных реакций применяли тест хи-квадрат. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех экспериментах на здоровых крысах и животных, перенесших колит, зарегистрированные ноцицептивные нейроны кВЛРО были локализованы между двойным и латеральным ретикулярными ядрами в области, расположенной на 0.8–1.3 мм роstralнее задвижки (рис. 1a). Кончик стимулирующего электрода во всех экспериментах был локализован в левой части БЯШ на уровне 10.5–11.2 мм каудальнее брегмы (рис. 1b).

При висцеральном и соматическом болевых раздражениях изученные нейроны продолговатого мозга могли демонстрировать избирательное

возбуждение в ответ на один из стимулов и торможение или отсутствие реакции на другой, либо реагировать усилением активности на оба болевых воздействия (рис. 2). По особенностям ноцицептивных ответов они были разделены на нейроны висцерального, соматического и общего типа.

Эффекты стимуляции большого ядра шва на бульбарные ноцицептивные нейроны в отсутствие патологии и после перенесенного кишечного воспаления

В группе здорового контроля было изучено 139 ноцицептивных нейронов кВЛРО, из которых 44 клетки (31.7%) были отнесены к висцеральному, 39 (28.0%) нейронов — к соматическому и 56 (40.3%) клеток — к общему типам. Тест Краскела–Уоллиса выявил различия между частотами фоновой активности этих нейронов ($p = 0.03$, $KW = 7.3$). Нейроны висцерального типа обладали наибольшей частотой фоновых разрядов, которая существенно превышала таковую у соматических ноцицептивных клеток ($p = 0.03$, $U = 248$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона), но была сопоставима с фоновой активностью нейронов общего типа ($p = 0.27$, $U = 185$; табл. 1). При этом реакция возбуждения висцеральных ноцицептивных клеток в ответ на болевое растяжение кишки была менее выражена, чем сходная реакция нейронов соматической группы на сдавливание хвоста ($p < 0.001$, $U = 388$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона). Нейроны общего типа также характеризовались более сильной реакцией на соматические болевые стимулы, чем на висцеральные ($p < 0.001$, парный тест Вилкоксона; табл. 1).

Предварительная электростимуляция БЯШ могла вызывать ослабление возбуждающих реакций нейронов кВЛРО на болевые стимулы, усиление их тормозных ноцицептивных ответов, либо подавление последних (рис. 3). Эти эффекты зависели от принадлежности нейронов к тому или иному типу (эффект типа нейронов, $p < 0.001$, $F_{2,690} = 8.16$, смешанная модель ANOVA), а также от вида болевого раздражения (эффект стимула, $p < 0.001$, $F_{1,690} = 18.24$). У висцеральных ноцицептивных нейронов стимуляция БЯШ приводила к уменьшению их возбуждающих реакций на кишечное растяжение ($p < 0.001$, парный тест Вилкоксона), но вызывала инверсию их тормозного ответа на соматический стимул в возбуждающий ($p < 0.001$; рис. 4a, b). У нейронов соматического типа влияния БЯШ проявлялись в усилении тормозных нейрональных ответов на КРР ($p < 0.001$) и подавлении возбуждающих реакций на сдавливание хвоста ($p < 0.001$; рис. 4c, d). В свою очередь, общие ноцицептивные нейроны после активации БЯШ демонстрировали сниженный уровень возбуждения при обоих видах болевых раздражений (в обоих случаях, $p < 0.001$; рис. 4e, f).

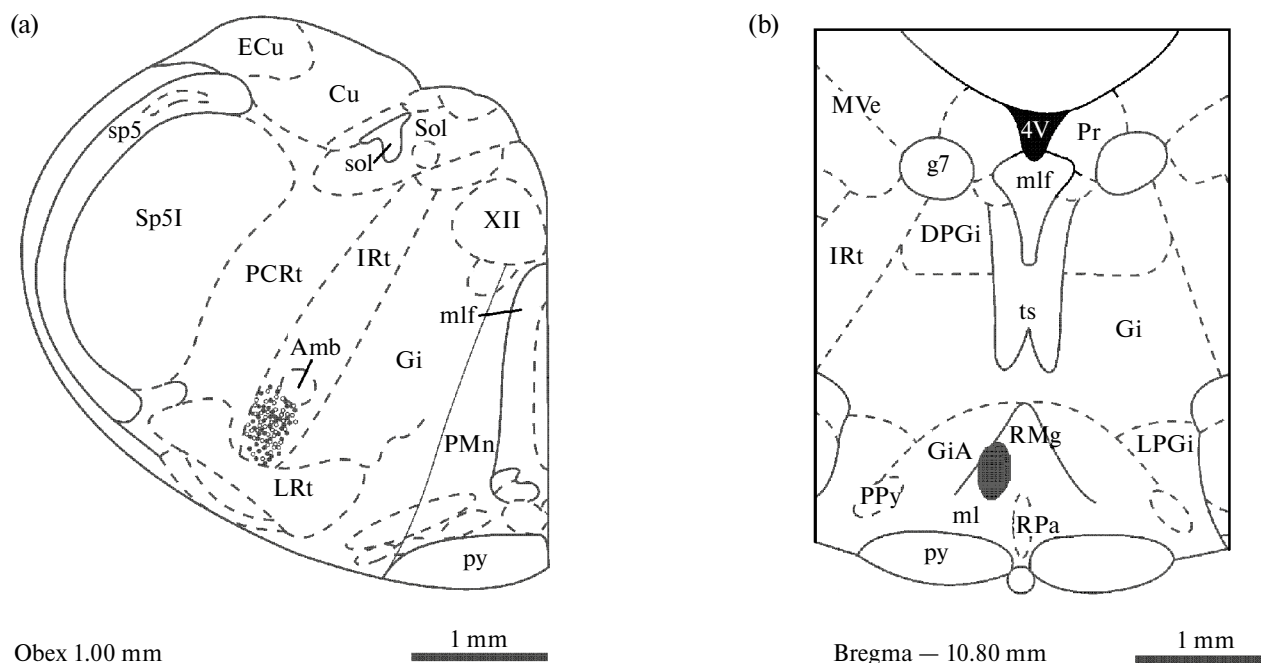


Рис. 1. Локализация мест регистрации нейронов в каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга у здоровых (темные символы) и перенесших колит (светлые символы) крыс (а) и зона электрической стимуляции большого ядра шва у всех животных (б). На (а), каждый символ соответствует локализации нескольких изученных нейронов. Схемы срезов адаптированы из стандартного атласа мозга крысы [45].

Обозначения на (а): Amb — двойное ядро, Cu — клиновидное ядро, Gi — гигантоклеточное ретикулярное ядро, IRt — промежуточное ретикулярное ядро, Lrt — латеральное ретикулярное ядро, ml — медиальный лемниск, mlf — медиальный продольный пучок, PCRt — мелкоклеточное ретикулярное ядро, PMn — парамедианное ретикулярное ядро, py — пирамидный тракт, sol — одиночный тракт, Sol — ядро одиночного тракта, sp5 — спинальный тройничный тракт, Sp5I — интерполярная часть спинального ядра тройничного нерва, XII — ядро подъязычного нерва. Обозначения на (б): 4V — IV желудочек мозга, DPGi — дорсальное парагигантоклеточное ядро, g7 — колено лицевого нерва, Gi — гигантоклеточное ретикулярное ядро, GiA — часть альфа гигантоклеточного ретикулярного ядра, IRt — промежуточное ретикулярное ядро, LPGi — латеральное парагигантоклеточное ядро, ml — медиальный лемниск, mlf — медиальный продольный пучок, MVe — медиальное вестибулярное ядро, PPy — парапирамидное ядро, Pr — препозитное ядро, py — пирамидный тракт, RMg — большое ядро шва, RPa — бледное ядро шва, ts — покрышечно-спинномозговой путь.

У крыс, перенесших колит, в кВЛРО был зарегистрирован 171 ноцицептивный нейрон. Соотношение нейронов, отнесенных к разным типам, было сопоставимо с таковым у здоровых животных ($p = 0.15$, $Chi-square = 3.8$, тест хи-квадрат), составляя 60 (35.1%) висцеральных, 32 (18.7%) соматических и 79 (46.2%) общих ноцицептивных клеток. Частота фоновой активности нейронов разного типа по сравнению с таковой в группе здорового контроля также существенно не отличалась (для всех сравнений, $p = 0.45-0.92$, $U = 157.0-499.5$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона; табл. 1). Однако были отмечены изменения в их ноцицептивной активности и эффектах на последнюю БЯШ. Анализ ноцицептивной активности нейронов кВЛРО с помощью смешанной модели ANOVA выявил эффекты на неё группы животных ($p = 0.04$, $F_{1,345} = 4.12$) и взаимодействия факторов группа \times тип нейронов ($p = 0.02$, $F_{5,211} = 5.82$). При анализе влияний БЯШ были выявлены эффекты взаимодействия факторов группа живот-

ных \times тип нейронов ($p < 0.01$, $F_{5,690} = 6.17$), группа \times стимул ($p = 0.012$, $F_{3,690} = 6.35$) и группа \times тип нейронов \times стимул ($p < 0.001$, $F_{11,690} = 7.47$).

В постколитный период возбуждающие реакции нейронов висцерального типа на КРР были сопоставимы с такими же реакциями при отсутствии патологии ($p = 0.10$, $U = 1067$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона), но уменьшились тормозные ответы на сдавливание хвоста ($p < 0.01$, $U = 920$; табл. 1). В этих условиях было отмечено ослабление тормозного эффекта электростимуляции БЯШ на нейрональное возбуждение при растяжении кишки ($p < 0.001$, $U = 769.5$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона; рис. 4а) и менее выраженный, чем в нормальных условиях, инверсивный эффект активации ядра на вызываемое соматической стимуляцией нейрональное торможение ($p < 0.01$, $U = 847$; рис. 4б).

У соматических ноцицептивных нейронов после колита усугублялись тормозные ответы на КРР (по сравнению с таковыми в группе здорового кон-

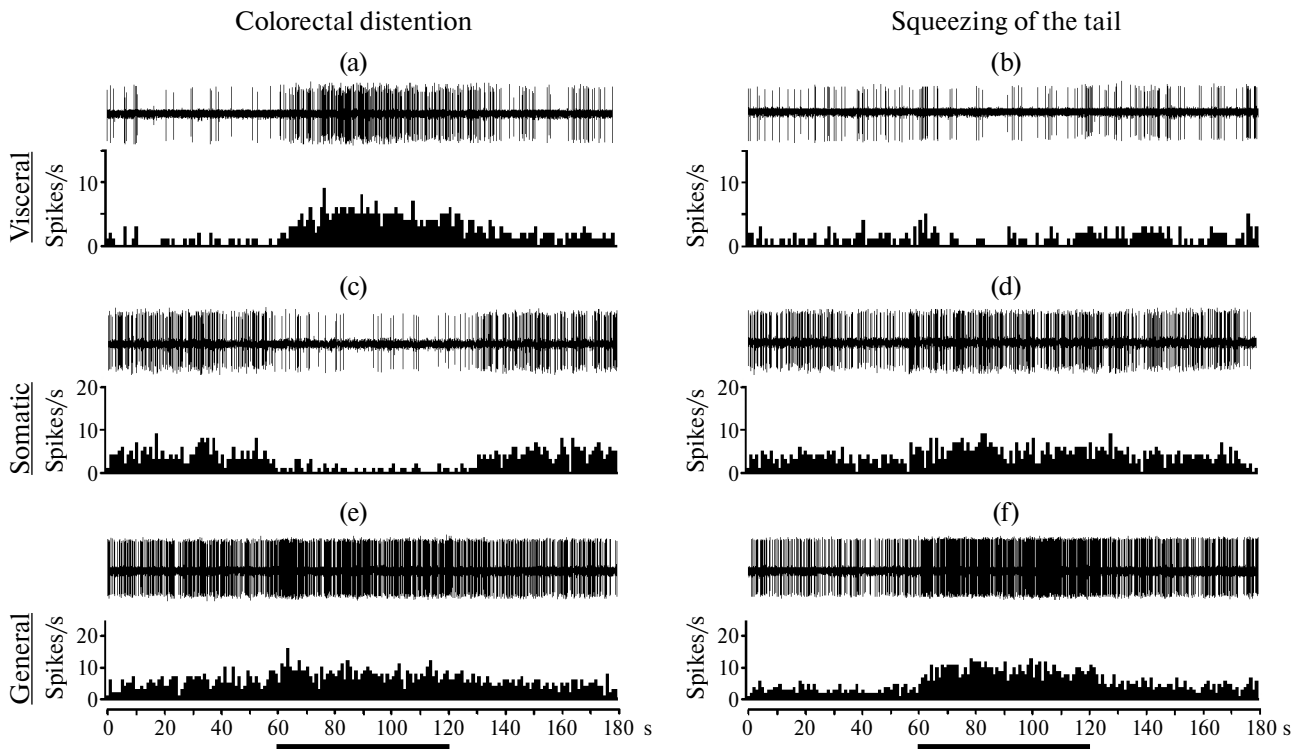


Рис. 2. Примеры реакций нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга, относящихся к висцеральному (a, b), соматическому (c, d) и общему (e, f) ноцицептивному типам, на болевые колоректальное растяжение (colorectal distention) и сдавливание хвоста (squeezing of the tail). На (a — f), в верхней части — нативные записи импульсной активности, в нижней части — соответствующие частотные гистограммы с бином в 1 с. По оси абсцисс — время в секундах, по оси ординат — частота разрядов (spikes/s). Горизонтальные отрезки — время действия раздражений.

Таблица 1. Фоновая активность и реакции на болевые колоректальное растяжение (КРР) и сдавливание хвоста (Хвост), демонстрируемые нейронами каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга у крыс из группы здорового контроля и у животных, перенесших колит

Тип нейронов	Кол-во	Фоновая активность (имп/с)	Ноцицептивный ответ (% от уровня фоновой активности)	
			КРР	Хвост
Здоровый контроль				
Висцеральн.	44	2.4 [1.4; 5.9]	28.7 [18.8; 56.4]	− 4.9 [− 15.8; 3.1]
Соматич.	39	1.5 [0.7; 3.2] ^Δ	6.5 [− 2.9; 9.9]	74.9 [35.6; 110.2]
Общий	56	1.9 [0.6; 3.7]	32.7 [22.2; 56.5]	55.9 [37.0; 119.1] ^{***}
После колита				
Висцеральн.	60	2.7 [1.4; 6.1]	33.5 [24.3; 60.9]	4.3 [− 10.6; 9.5] ^{**}
Соматич.	32	1.4 [0.8; 3.8] ^Δ	0.7 [− 6.0; 5.6] [*]	65.3 [29.6; 109.9]
Общий	79	2.6 [0.9; 5.6]	59.5 [27.6; 103.1] ^{**}	71.7 [32.1; 150.2] ^{***}

Примечание: Данные представлены как медиана с межквартильными интервалами (Ме [Q1; Q3]). Значимые различия: ^Δ — $p < 0.05$, по сравнению с соответствующим показателем у нейронов висцерального типа (тест Манна–Уитни–Вилкоксона); ^{***} — $p < 0.001$, по сравнению с ответом на КРР у нейронов общего типа (парный тест Вилкоксона); ^{*} — $p < 0.05$, ^{**} — $p < 0.01$, по сравнению с соответствующим показателем в группе контроля (тест Манна–Уитни–Вилкоксона).

троля, $p = 0.02$, $U = 417.5$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона), но оставались неизменными возбуждающие ответы на сдавливание хвоста ($p = 0.47$, $U = 561.5$; табл. 1). Это сопровождалось ослаблением потенцирующего эффекта БЯШ на вызываемый

висцеральной стимуляцией тормозный ответ ($p < 0.01$, $U = 395$; рис. 4с) и уменьшением подавляющего влияния ядра на нейрональное возбуждение при соматическом болевом раздражении ($p = 0.046$, $U = 450.5$; рис. 4д).

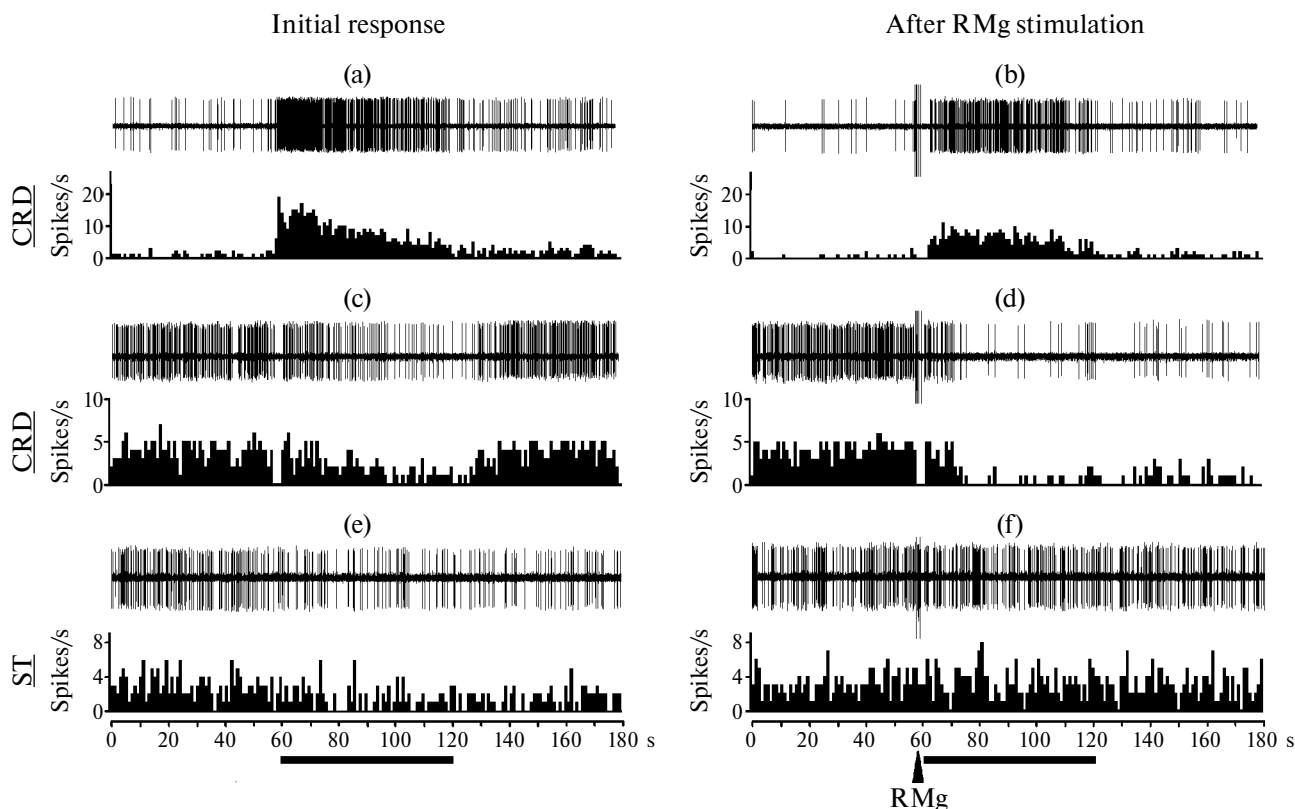


Рис. 3. Примеры возбуждающей (a, b) и тормозных (c — f) реакций ноцицептивных нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга на болевые колоректальное растяжение (CRD) и сдавливание хвоста (ST) исходно (a, c, e) и после электростимуляции большого ядра шва (b, d, f). На (a — f), в верхней части — нативные записи, ниже — соответствующие частотные гистограммы с бином в 1 с. По оси абсцисс — время в секундах, по оси ординат — частота разрядов (spikes/s). Горизонтальные отрезки — время действия болевых раздражений. Стрелка — электрическая стимуляция большого ядра шва (RMg).

Общие ноцицептивные нейроны кВЛРО в постколлитный период демонстрировали усиленные по сравнению с таковыми в группе здорового контроля возбуждающие реакции на КРР ($p < 0.01$, $U = 1574.5$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона) при статистически сопоставимых ответах на сдавливание хвоста ($p = 0.29$, $U = 2120.5$; табл. 1). При этом наблюдалось существенное ослабление тормозных эффектов стимуляции БЯШ как на висцеральную ($p < 0.01$, $U = 1543$; рис. 4е), так и соматическую ноцицептивную активность этих нейронов ($p = 0.03$, $U = 1765$; рис. 4ф).

Эффекты фармакологической активации супраспинальных 5-НТ1А серотониновых рецепторов на модулирующие влияния большого ядра шва при отсутствии патологии и в постколлитный период

В этих экспериментах внимание было сосредоточено на эффектах стимуляции БЯШ, адресованным нейронам кВЛРО, относящимся к общей ноцицептивной группе, т.е. демонстрирующим

возбуждение как в ответ на раздражение кишки, так и на сдавливание хвоста. У здоровых крыс в общей сложности было зарегистрировано 69 таких нейронов, у перенесших колит животных — 67 клеток. В каждом случае распределение нейронов по группам, подвергнутым интрацеребровентрикулярному введению физиологического раствора (в качестве контроля) или разных количеств агониста 5-НТ1А буспирона, отражено на рисунке 5.

В группе здорового контроля инъекции буспирона не оказывали существенного влияния на фоновую активность изученных нейронов кВЛРО ни в дозе 0.3 мкг ($p = 0.14$, $Fr = 8.30$, тест Фридмана), ни в количестве 1 мкг ($p = 0.43$, $Fr = 4.89$). Меньшая доза 5-НТ1А агониста также не вызвала значимых изменений в реакциях нейронов на КРР ($p = 0.94$, $Fr = 1.26$) и сдавливание хвоста ($p = 0.87$, $Fr = 1.87$). После введения 1 мкг буспирона наблюдалось выявленное тестом Фридмана уменьшение реакций бульбарных нейронов на висцеральное ($p < 0.01$, $Fr = 18.59$) и соматическое ($p = 0.03$, $Fr = 12.46$) болевые воздействия, которое, однако, не подтвердилось парным тестом Вилкоксона, а также крите-

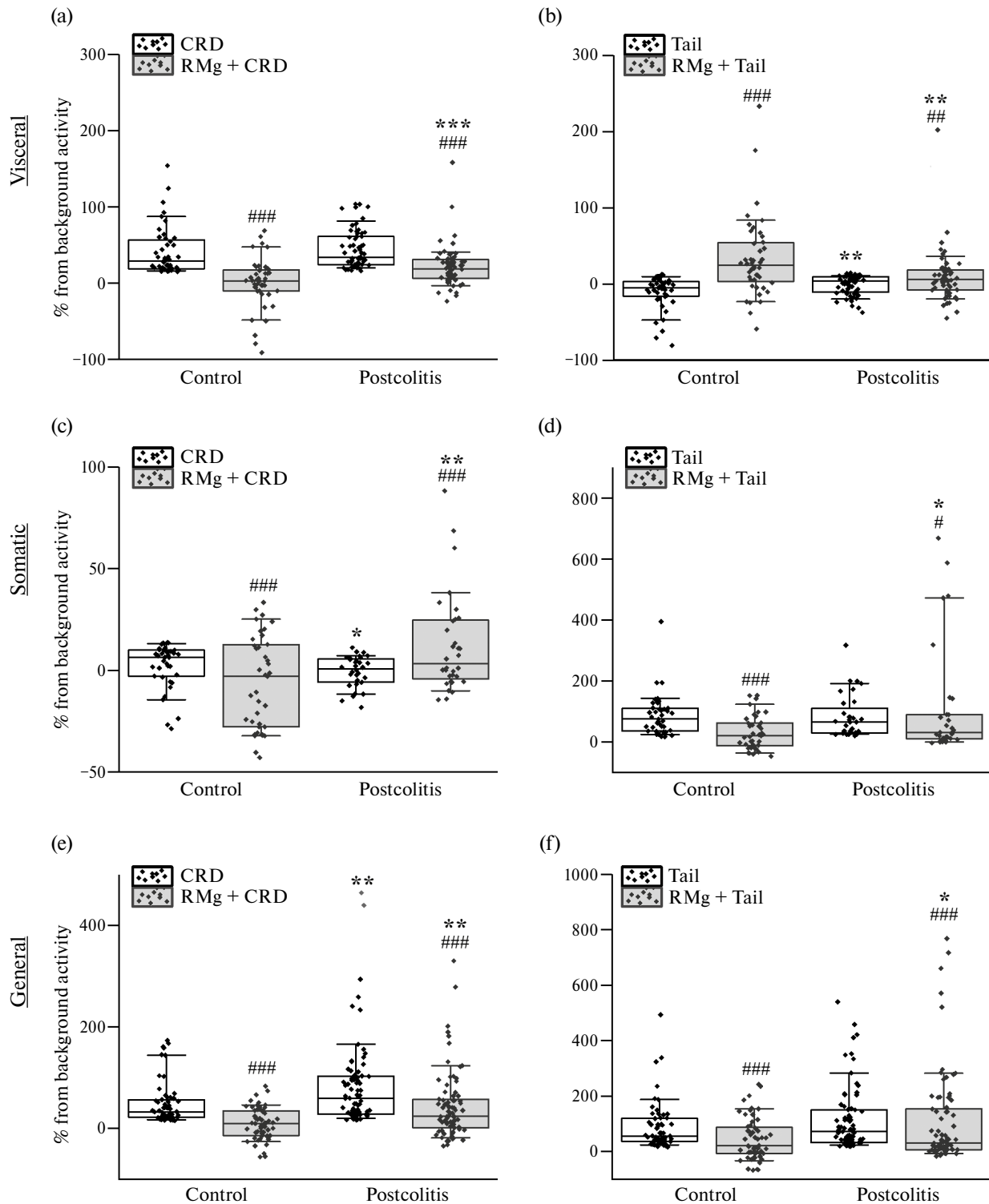


Рис. 4. Амплитуда реакций нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга, относящихся к висцеральному (a, b), соматическому (c, d) и общему (e, f) ноцицептивному типу, на болевые колоректальное растяжение (CRD) и сдавливание хвоста (Tail) исходно (CRD или Tail) и после предварительной электрической стимуляции большого ядра шва (RMg+CRD или RMg+Tail) у здоровых (Control) и перенесших колит (Postcolitis) крыс. По оси ординат — реакция в % от уровня фоновой активности. На (a — f), верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника — первый и третий квартили (25-й и 75-й проценти соответственно), горизонтальная линия внутри — медиана (50-й процентиль), концы отрезков — 10-й и 90-й проценти, ромбы — индивидуальные значения в выборке. Значимые различия по сравнению с соответствующим значением до электростимуляции: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, парный тест Вилкоксона. Значимые различия по сравнению с соответствующим значением в группе контроля: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$, тест Манна-Уитни-Вилкоксона.

рием Манна–Уитни–Вилкоксона при сравнении с группой контроля.

Между тем, анализ с помощью смешанной модели ANOVA выявил существенный эффект внутримозговых инъекций на модуляцию ноцицептивных нейронов продолговатого мозга, вызываемую стимуляцией БЯШ ($p < 0.001$, $F_{2,211} = 8.32$). Действительно, введение разного количества буспилона усиливало тормозные влияния БЯШ на ноцицептивные реакции нейронов кВЛРО. В отношении влияния БЯШ на нейрональные ответы, вызываемые висцеральной стимуляцией, этот эффект проявлялся при действии как 0.3 мкг ($p = 0.03$, $Fr = 11.77$), так и 1 мкг 5-НТ1А агониста ($p < 0.001$, $Fr = 24.07$). Однако только эффект второй дозы был значимым по отношению к контрольной инъекции физраствора с 15-ой минуты и до конца эксперимента (для всех сравнений: $p = 0.014$ – 0.035 , $U = 84$ – 96 , тест Манна–Уитни–Вилкоксона; рис. 5а). Также только в количестве 1 мкг буспирон существенно усиливал тормозный эффект БЯШ на возбуждение нейронов кВЛРО в ответ на сдавливание хвоста ($p < 0.01$, $Fr = 19.94$, тест Фридмана). Это проявлялось с 5-ой по 30-ю минуты эксперимента и в этот период было значимым по отношению к действию физраствора (для всех сравнений: $p = 0.01$ – 0.04 , $U = 19$ – 44 , тест Манна–Уитни–Вилкоксона; рис. 5с).

В постколитный период интрацеребровентрикулярно введенный буспирон по данным теста Фридмана не оказывал влияния на фоновую активность ноцицептивных нейронов кВЛРО в количестве 1 мкг ($p = 0.94$, $Fr = 1.24$), но вызывал её усиление в дозе 0.3 мкг ($p < 0.01$, $Fr = 15.7$). Однако этот эффект был значим по отношению к таковому физраствору лишь на 5-й ($p = 0.02$, $U = 20$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона) и 15-ой ($p = 0.03$, $U = 23$) минутах после введения. При этом не было выявлено существенных влияний препарата в обеих дозах на ответы нейронов на висцеральную (для 0.3 мкг: $p = 0.09$, $Fr = 9.37$; для 1 мкг: $p = 0.73$, $Fr = 2.82$) и соматическую ($p = 0.08$, $Fr = 9.90$ и $p = 0.40$, $Fr = 5.09$) болевые стимуляции.

Между тем, анализ с помощью смешанной модели ANOVA выявил существенный эффект группы животных ($p < 0.001$, $F_{1,211} = 11.83$), а также эффект взаимодействия факторов группа \times инъекция ($p < 0.001$, $F_{5,211} = 6.73$) на бульбарные влияния БЯШ. В отличие от действия в группе здорового контроля, после колита обе дозы внутримозгового буспилона не были способны существенно изменить влияние БЯШ на ноцицептивную активность нейронов кВЛРО как во время КРР (для 0.3 мкг: $p = 0.13$, $Fr = 8.62$; для 1 мкг: $p = 0.23$, $Fr = 6.85$, тест Фридамана; рис. 5б), так и при сдавливании хвоста ($p = 0.14$, $Fr = 8.33$ и $p = 0.48$, $Fr = 4.48$; рис. 5д), свидетельствуя об ослаблении вклада 5-НТ1А рецептор-зависимых механизмов в исследуемые процессы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе данные свидетельствуют, что БЯШ оказывает модулирующие влияния на разные популяции ноцицептивных нейронов кВЛРО, демонстрирующих неселективные или дифференцированные реакции на висцеральное (колоректальное растяжение) и соматическое (сдавливание хвоста) болевые воздействия. При этом в разных типах ноцицептивных нейронов эффектами активации БЯШ являются ослабление возбуждения и усиление торможения в ответ на висцеральное болевое воздействие при параллельном подавлении обоих типов нейрональных реакций на соматический болевой стимул, что в целом может лежать в основе нисходящих антиноцицептивных влияний данного ядра шва. Как установлено, тормозные влияния БЯШ на вызываемое висцеральными и соматическими болевыми воздействиями возбуждение нейронов кВЛРО усиливается после интрацеребровентрикулярного введения буспилона, указывая на вовлечение 5-НТ1А рецептор-зависимых механизмов. Впервые показано, что после перенесенного кишечного воспаления (колита) наблюдается уменьшение эффектов БЯШ как на возбуждающую, так и тормозную висцеральную и соматическую болевые нейротрансмиссии в каудальном продолговатом мозге, что может свидетельствовать об общем ослаблении антиноцицептивной функции этой структуры в поствоспалительный период. В этих условиях попытка модулировать нисходящие тормозные влияния БЯШ на ноцицептивные нейроны кВЛРО посредством фармакологической активации супраспинальных 5-НТ1А рецепторов является неэффективной, предполагая уменьшение вклада последних в исследуемые процессы.

Представленные сведения о существовании популяций нейронов кВЛРО с неселективными и дифференцированными реакциями на висцеральное и соматическое болевые воздействия согласуются с результатами нашего предыдущего исследования [21], а также данными других авторов, обнаруживших в этой области сходные по свойствам группы ноцицептивных клеток [22, 49]. В отличие от одинаково реагирующих на разные виды боли нейронов, клетки кВЛРО с дифференцированными ответами могут обеспечивать селективный контроль висцеральных и соматических ноцицептивных потоков на первом уровне их супраспинальной обработки и быть вовлечены в инициацию характерных для разных видов боли кардиоваскулярных и респираторных реакций, специфика которых была показана нами ранее [21]. По избирательным реакциям возбуждения мы обозначили эти нейроны как висцеральные и соматические ноцицептивные. Выявленные в представленном исследовании различия фоновой импульсации таких нейронов под-

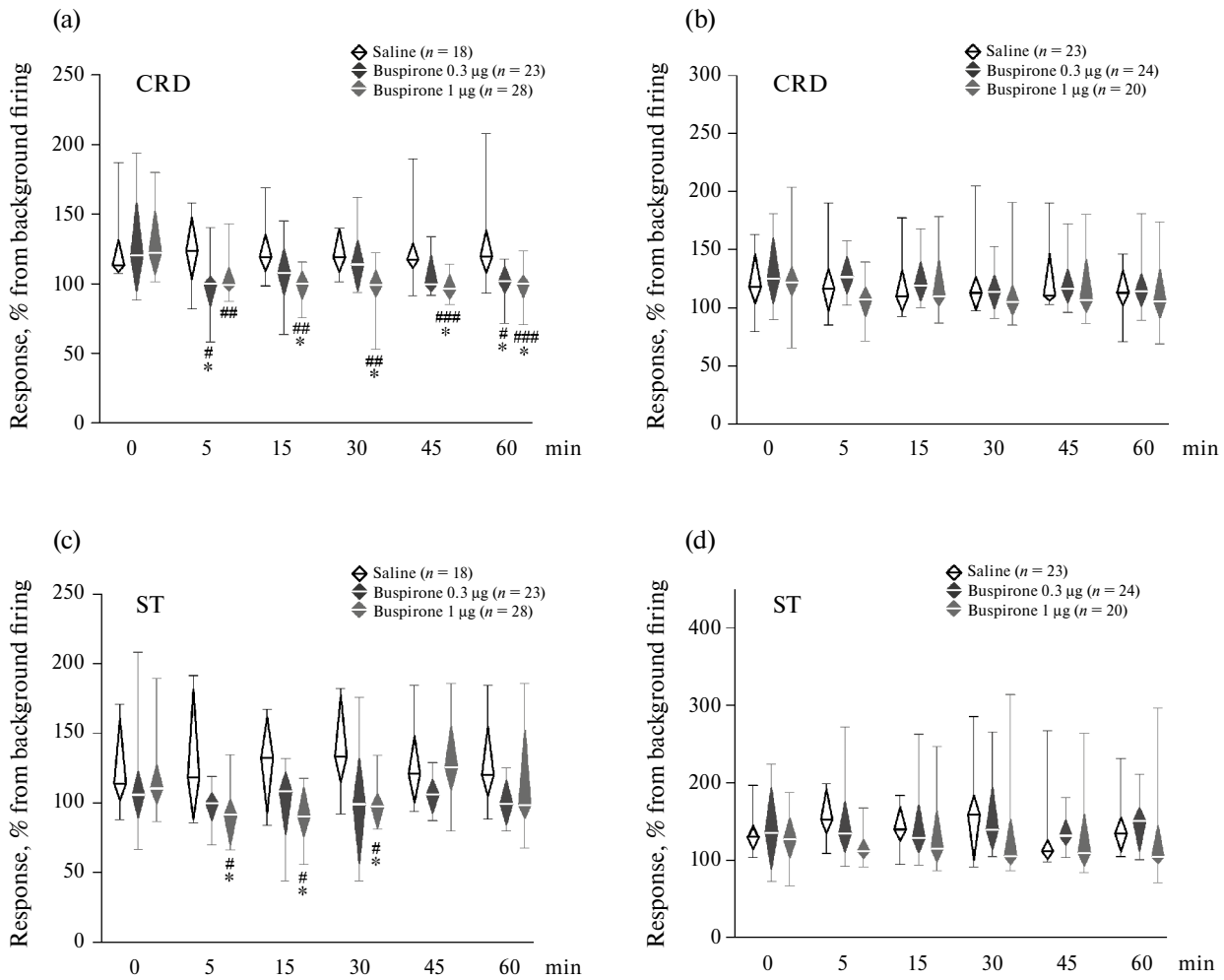


Рис. 5. Эффекты электрической стимуляции большого ядра шва на возбуждение нейронов каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга, вызванное болевыми колоректальным растяжением (CRD) и сдавливанием хвоста (ST), после интрацеребровентрикулярного введения агониста 5-HT_{1A} рецепторов буспилона в количествах 0.3 и 1 мкг у здоровых (а, с) и перенесших колит (b, d) крыс. По оси абсцисс — время до (0) и после инъекции в мин. По оси ординат — реакция в % от уровня фоновой активности. На (а — d), верхний и нижний углы каждого ромба — первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля соответственно), горизонтальная линия внутри — медиана (50-й процентиль), концы отрезков — 10-й и 90-й процентиля. Значимые изменения по сравнению с соответствующим исходным уровнем: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ и ### $p < 0.001$, парный тест Вилкоксона. Значимые различия по сравнению с инъекцией физиологического раствора: * $p < 0.05$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона. Значимость изменений дана с учетом поправки Бонферрони.

тверждают их принадлежность к функционально различным популяциям.

Нами были выявлены некоторые особенности влияний БЯШ на разные типы ноцицептивных нейронов кВЛРО, которые могут указывать на возможные различия в обеспечивающих такие влияния механизмах. Так электростимуляция БЯШ подавляла возбуждение неселективных (общих) нейронов, вызываемое как висцеральным, так и соматическим болевыми раздражениями, что может свидетельствовать в пользу непосредственного тормозного действия исследуемого ядра шва на данную популяцию ноцицептивных клеток и/или вход к ним от конвергентных (общих для разных видов боли) спинальных ноцицептивных нейронов. В

то же время следствием вызываемой тормозными проекциями БЯШ гиперполяризации мембраны селективных соматических ноцицептивных нейронов может быть отмеченное нами уменьшение их возбуждающих реакций на сдавливание хвоста и усиление торможения при КРР. В свою очередь, наблюдавшееся после активации БЯШ ослабление не только возбуждающего висцерального, но и тормозного соматического входов к висцеральным ноцицептивным нейронам может быть объяснено пресинаптическим подавлением обоих видов афферентов. При этом мы не можем исключить, что частично этот эффект БЯШ может быть следствием его непосредственного тормозного влияния на спинальные ноцицептивные нейроны [14–16], сре-

ди которых обнаружены клетки, которые противоположным образом реагируют на висцеральные и соматические болевые стимулы [50, 51].

Продемонстрированные эффекты стимуляции БЯШ на нейроны кВЛРО могут реализоваться через его прямые проекции на данную область [17, 18]. Конкретные нейрохимические характеристики этих проекций в настоящее время остаются неясными. Между тем, показано, что основными нейромедиаторами в нисходящих тормозных (антиноцицептивных) путях БЯШ являются серотонин и ГАМК [52–54]. Предполагается также вовлечение энкефалин-, глицин- и норадренергических механизмов [46, 53–55]. При этом установлено, что как фоновая, так и ноцицептивная активность нейронов кВЛРО уменьшается при активации 5-НТ1А, 5-НТ4 серотониновых рецепторов [39, 56] и α 2-адренорецепторов [2]. Также известно, что реактивные к боли нейроны кВЛРО экспрессируют ГАМК_v и μ -опиоидные рецепторы [57]. Эти данные позволяют предполагать, что продемонстрированное нами тормозное действие БЯШ на ноцицептивные нейроны кВЛРО может реализоваться с участием его серотонин-, ГАМК-, норадреналин- и/или опиоидергических проекций. Вполне возможно, что могут быть различия в нейрохимической организации проекций БЯШ к разным типам ноцицептивных нейронов, которые нуждаются в специальном исследовании.

Как показали наши эксперименты, антиноцицептивные влияния БЯШ на нейроны каудального продолговатого мозга, по крайней мере частично, опосредуются 5-НТ1А рецептор-зависимыми механизмами. Известно, что этот подтип серотониновых рецепторов в значительном количестве экспрессируется как самими серотонин-синтезирующими, так и несеротониновыми, в частности, ГАМКергическими клетками БЯШ [31, 33]. На этом основании выделяют 5-НТ1А ауто- и гетерорецепторы, первые из которых, как установлено, активируются малыми, а вторые — более высокими количествами их агониста буспирона [58]. Поэтому выявленное в наших экспериментах облегчающее действие более высокой дозы этого интрацеребровентрикулярно введенного препарата на антиноцицептивные влияния БЯШ может быть связано с преимущественной активацией тормозных 5-НТ1А гетерорецепторов на ГАМКергических интернейронах этого ядра, и, как следствие, ослабления ингибирующего влияния последних на соседние серотонин- и ГАМК-синтезирующие клетки, в том числе, формирующие нисходящие антиноцицептивные пути к кВЛРО [33, 59, 60]. В определенной мере продемонстрированный нами эффект буспирона также может быть объяснен его стимулирующим действием на 5-НТ1А-рецепторы, которые экспрессируются непосредственно в кВЛРО [40, 41] и, как мы установили ранее,

способствуют угнетению фоновой и ноцицептивной активности нейронов этой области [28, 39]. Однако тот факт, что в нынешнем исследовании после интрацеребровентрикулярной инъекции 5-НТ1А-агониста мы не наблюдали значительных изменений в показателях фоновой и вызванной нейрональной активности в кВЛРО как таковых, позволяет предполагать преимущественное действие препарата на уровне БЯШ.

Мы не можем исключить, что в наших экспериментах интрацеребровентрикулярно введенный буспирон, помимо действия на супраспинальные 5-НТ1А, мог проявлять свои свойства связываться с 5-НТ2 рецепторами и выступать в качестве антагониста дофаминовых D2 ауторецепторов [61]. При этом активация 5-НТ2 рецепторов, действительно, могла способствовать наблюдавшемуся после введения препарата усилению антиноцицептивного эффекта стимуляции БЯШ, поскольку ранее был установлен существенный вклад рецепторов данного подтипа в реализацию нисходящих тормозных влияний этой структуры [62]. Однако значительно более низкая аффинность буспирона к 5-НТ2 рецепторам по сравнению с таковой к рецепторам 5-НТ1А [61] позволяет полагать, что выявленный нами эффект препарата является преимущественно 5-НТ1А рецептор-зависимым. В свою очередь, антагонистическое влияние буспирона на D2 рецепторы вряд ли может быть вовлечено в этот процесс, поскольку продемонстрировано, что непосредственное действие D2 антагонистов на область БЯШ не оказывает влияния на процессы модуляции им болевой чувствительности, что в значительной мере объясняется отсутствием дофаминергических проекций к данной области [63, 64]. Кроме того, известно, что снижение функциональной активности D2 рецепторов в дофаминергических структурах мозга способствует не усилению, а ослаблению антиноцицептивных механизмов [65].

Мы впервые продемонстрировали, что следствием перенесенного кишечного воспаления (колита) является ослабление влияний БЯШ на ноцицептивные нейроны кВЛРО разного типа, что может свидетельствовать об общем нарушении его функций в нисходящем антиноцицептивном контроле. Одной из причин может являться ранее обнаруженное нами в постколитный период нарастание тормозных ноцицептивных нейрональных процессов в БЯШ [27]. Усиленное торможение нейронов БЯШ при болевых кишечном и кожном воздействиях также показаны другими авторами при остром воспалительном повреждении толстой кишки [26]. Возникшее при развитии органической патологии и сохранившееся после её разрешения локальное нейрональное торможение могло препятствовать активации БЯШ и его нисходящих антиноцицептивных проекций на кВЛРО в наших экспериментах.

В основе постколитного нарастания тормозных процессов в БЯШ предположительно может лежать усиление в нем серотонинергической нейротрансмиссии. Последнее было показано при воспалении соматических тканей и периферической нейропатии [66, 67]. Если кишечное воспаление также способно вызвать в БЯШ повышение уровня локального синтеза серотонина, то мы можем ожидать усиления 5-НТ1А рецептор-опосредуемого тормозного действия этого нейромедиатора как на сами серотонинергические, так и несеротониновые клетки этого ядра [33, 59], приводящего к общему снижению его нейрональной возбудимости и нисходящих тормозных влияний. Мы также не можем исключать вовлечение в этот процесс внутриядерных ГАМКергических механизмов [59, 60], повышенную активность которых связывают с подавлением антиноцицептивной функции БЯШ [68]. Помимо перестроек в самом ядре, определенный вклад в ослабление его влияний на кВЛРО могут вносить показанные нами постколитные изменения в ноцицептивной активности нейронов этой области [28], потенциально способные изменить их реактивность к нисходящему торможению.

В свою очередь, показанная нами в постколитный период неэффективность интрацеребровентрикулярного введения 5-НТ1А-агониста буспирона, свидетельствует об утрате супраспинальными 5-НТ1А рецепторами их позитивного вклада в антиноцицептивные эффекты стимуляции БЯШ в этих условиях. Возможной причиной могут являться вызванные перенесенной органической патологией изменения в соотношении 5-НТ1А ауто- и гетерорецепторов в исследуемом ядре шва. Косвенным подтверждением могут служить имеющиеся данные об увеличении в БЯШ количества локализованных на серотониновых клетках 5-НТ1А ауторецепторов после воспаления соматических тканей [31]. В случае аналогичного превалирования 5-НТ1А ауторецепторов в постколитный период, стимуляция буспироном меньших по числу 5-НТ1А гетерорецепторов на локальных ГАМКергических интернейронах будет недостаточной для растворивания клеток БЯШ, формирующих нисходящие тормозные пути к кВЛРО, и не сможет преодолеть ауторецептор-опосредованное подавление его серотонинергических проекционных нейронов. Следствием этого может быть наблюдавшаяся нами у постколитных животных потеря 5-НТ1А-агонистом исходно присущей ему способности усиливать антиноцицептивные влияния БЯШ. Насколько эти предположения справедливы, должны показать дальнейшие исследования.

Таким образом, проведенные нами эксперименты продемонстрировали, что большое ядро шва способно оказывать тормозное действие на ноцицептивную активность как селективных, так и неизбирательных к разным видам боли нейронов кау-

дальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга, что в целом может приводит к уменьшению уровня активации этой области при поступлении висцеральных и соматических болевых сигналов, т. е. способствовать нисходящему антиноцицептивному контролю. Показан позитивный вклад в эти процессы супраспинальных 5-НТ1А рецептор-зависимых механизмов. Установлено, что антиноцицептивные влияния большого ядра шва на разные популяции бульбарных ноцицептивных нейронов существенно ослабевают после перенесенного кишечного воспаления (колита), свидетельствуя о нарушении антиноцицептивных функций этой структуры. При этом нивелируется 5-НТ1А рецептор-опосредуемая компонента таких влияний. Выявленные перестройки могут вносить вклад в супраспинальные механизмы патогенеза поствоспалительной абдоминальной боли и ассоциированных с ней соматических гипералгезий. Дальнейшие исследования нейрохимических и молекулярных основ таких перестроек будут способствовать разработке более эффективных методов лечения указанных состояний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 09/03/2020).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00151, <https://rscf.ru/project/23-25-00151/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen Q, Heinricher MM* (2022) Shifting the Balance: How Top-Down and Bottom-Up Input Modulate Pain via the Rostral Ventromedial Medulla. *Front Pain Res (Lausanne)* 3:932476. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.932476>

2. *Martins J, Tavares I* (2017) Reticular Formation and Pain: The Past and the Future. *Front Neuroanat* 11:51. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00051>
3. *Millan MJ* (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355–474. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6)
4. *Ossipov MH* (2012) The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica (Cairo)* 2012:561761. <https://doi.org/10.6064/2012/561761>
5. *Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S* (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000(1–2):40–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073>
6. *Chaouch A, Menetrey D, Binder D, Besson JM* (1983) Neurons at the origin of the medial component of the bulbopontine spinoreticular tract in the rat: an anatomical study using horseradish peroxidase retrograde transport. *J Comp Neurol* 214:309–320. <https://doi.org/10.1002/cne.902140308>
7. *Chen Q, Roeder Z, Li MH, Zhang Y, Ingram SL, Heinricher MM* (2017) Optogenetic evidence for a direct circuit linking nociceptive transmission through the parabrachial complex with pain-modulating neurons of the rostral ventromedial medulla (RVM). *eNeuro* 4:1–16. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0202-17.2017>
8. *Liang H, Wang S, Francis R, Whan R, Watson C, Paxinos G* (2015) Distribution of raphespinal fibers in the mouse spinal cord. *Mol Pain* 11:42. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0046-x>
9. *Aby F, Lorenzo LE, Grivet Z, Bouali-Benazzouz R, Martin H, Valerio S, Whitestone S, Isabel D, Idi W, Bouchatta O, De Deurwaerdere P, Godin AG, Herry C, Fioramonti X, Landry M, De Koninck Y, Fossat P* (2022) Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. *Sci Adv* 8(30):eabo0689. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo0689>
10. *Yang J, Pan YJ, Zhao Y, Qiu PY, Lu L, Li P, Chen F, Yan XQ, Wang DX* (2011) Oxytocin in the rat caudate nucleus influences pain modulation. *Peptides* 32(10):2104–2107. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.021>
11. *Phillips S, Cantrill R, Ford D, Mitchell D* (1986) Microinjection of dopamine agonists into nucleus raphe magnus affects nociception in rats. *Pain* 26(2):259–266. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(86\)90080-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(86)90080-1)
12. *Randich A, Mebane H, DeBerry JJ, Ness TJ* (2008) Rostral ventral medulla modulation of the visceromotor reflex evoked by urinary bladder distension in female rats. *J Pain* 9(10):920–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.05.011>
13. *Zhuo M, Gebhart GF* (2002) Facilitation and attenuation of a visceral nociceptive reflex from the rostroventral medulla in the rat. *Gastroenterology* 122(4):1007–1019. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32389>
14. *Baik EJ, Jeong Y, Nam TS, Kim WK, Paik KS* (1995) Mechanism of transmission and modulation of renal pain in cats; effect of nucleus raphe magnus stimulation on renal pain. *Yonsei Med J* 36(4):348–360. <https://doi.org/10.3349/ymj.1995.36.4.348>
15. *Jones SL, Light AR* (1990) Electrical stimulation in the medullary nucleus raphe magnus inhibits noxious heat-evoked fos protein-like immunoreactivity in the rat lumbar spinal cord. *Brain Res* 530(2):335–338. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91306-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91306-2)
16. *Zhuo M, Sengupta JN, Gebhart GF* (2002) Biphasic modulation of spinal visceral nociceptive transmission from the rostroventral medial medulla in the rat. *J Neurophysiol* 87(5):2225–2236. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2225>
17. *Cobos A, Lima D, Almeida A, Tavares I* (2003) Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience* 120(2):485–498. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00209-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00209-4)
18. *Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM* (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 407(4):555–582.
19. *Almeida A, Leite-Almeida H, Tavares I* (2006) Medullary control of nociceptive transmission: Reciprocal dual communication with the spinal cord. *Drug Discov Today Dis Mech* 3 (3): 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2006.09.001>
20. *Tavares I, Lima D* (2007) From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. *J Anat* 211(2): 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00759.x>
21. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Sokolov AY* (2019) Differential responses of neurons in the rat caudal ventrolateral medulla to visceral and somatic noxious stimuli and their alterations in colitis. *Brain Res Bull* 152:299–310. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.030>
22. *Pinto-Ribeiro F, Ansah OS, Almeida A, Pertovaara A* (2011) Response properties of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) in monoarthritic and healthy control rats: Modulation of responses by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull* 86 (1–2):82–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.06.014>
23. *Heinricher MM* (2016) Pain Modulation and the Transition from Acute to Chronic Pain. *Adv Exp Med Biol* 904:105–115. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7537-3_8
24. *Goehler LE, Gaykema RP, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M* (2005) Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun* 19(4):334–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002>
25. *Wan J, Ding Y, Tahir AH, Shah MK, Janyaro H, Li X, Zhong J, Vodyanoy V, Ding M* (2017) Electroacupuncture attenuates visceral hypersensitivity by inhibiting JAK2/

- STAT3 signaling pathway in the descending pain modulation system. *Front Neurosci* 11:644.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00644>
26. *Sanoja R, Tortorici V, Fernandez C, Price TJ, Cervero F* (2010) Role of RVM neurons in capsaicin-evoked visceral nociception and referred hyperalgesia. *Eur J Pain* 14(2):120.e1–e9.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.04.006>
 27. *Sushkevich BM, Sivachenko IB, Lyubashina OA* (2023) Postcolitis alterations in nociceptive properties of neurons in the rat nucleus raphe magnus and dorsal raphe nucleus. *J Evol Biochem Phys* 59(4):1057–1076.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023040051>
 28. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Sushkevich BM, Busygina II* (2023) Opposing effects of 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone on supraspinal abdominal pain transmission in normal and visceral hypersensitive rats. *J Neurosci Res* 101(10):1555–1571.
<https://doi.org/10.1002/jnr.25222>
 29. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Busygina II, Pantelev SS* (2018) Colitis-induced alterations in response properties of visceral nociceptive neurons in the rat caudal medulla oblongata and their modulation by 5-HT₃ receptor blockade. *Brain Res Bull* 142:183–196.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.07.013>
 30. *Munawar N, Bitar MS, Masocha W* (2023) Activation of 5-HT_{1A} Receptors Normalizes the Overexpression of Presynaptic 5-HT_{1A} Receptors and Alleviates Diabetic Neuropathic Pain *Int J Mol Sci* 24(18):14334.
<https://doi.org/10.3390/ijms241814334>
 31. *Zhang Y, Gao X, Yang ZL, Huang YL, Wu GC* (2000) Expression of 5-HT(1A) receptor mRNA in rat nucleus raphe magnus neurons after peripheral inflammation. *Brain Res* 887(2):465–468.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03037-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03037-7)
 32. *Blier P, Piñeyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C* (1998) Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 861:204–216.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10192.x>
 33. *Lemos JC, Pan YZ, Ma X, Lamy C, Akanwa AC, Beck SG* (2006) Selective 5-HT receptor inhibition of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the rat dorsal and median raphe. *Eur J Neurosci* 24(12):3415–3430.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05222.x>
 34. *Bardin L* (2011) The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behav Pharmacol* 22(5–6):390–404.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328349aae4>
 35. *Wei H, Pertovaara A* (2006) 5-HT(1A) receptors in endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity in the rat. *Eur J Pharmacol* 535(1–3):157–165.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.02.019>
 36. *Haleem DJ* (2018) Serotonin-1A receptor dependent modulation of pain and reward for improving therapy of chronic pain. *Pharmacol Res* 134:212–219.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.030>
 37. *Zemlan FP, Murphy AZ, Behbehani MM* (1994) 5-HT_{1A} receptors mediate the effect of the bulbospinal serotonin system on spinal dorsal horn nociceptive neurons. *Pharmacology* 48(1):1–10.
<https://doi.org/10.1159/000139156>
 38. *Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Huang YL, Wu GC, Zhao ZQ* (2002) Expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. *Pain* 98(3):287–295.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(02\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00026-X)
 39. *Pantelev SS, Sivachenko IB, Lyubashina OA* (2018) The central effects of buspirone on abdominal pain in rats. *Neurogastroenterol Motil* 30(11): e13431.
<https://doi.org/10.1111/nmo.13431>
 40. *Helke CJ, Capuano S, Tran N, Zhuo H* (1997) Immunocytochemical studies of the 5-HT(1A) receptor in ventral medullary neurons that project to the intermediolateral cell column and contain serotonin or tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J Comp Neurol* 379(2):261–270.
 41. *Liu Q, Wong-Riley MT* (2010) Postnatal changes in the expressions of serotonin 1A, 1B, and 2A receptors in ten brain stem nuclei of the rat: implication for a sensitive period. *Neuroscience* 165(1):61–78.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.078>
 42. *Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL* (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96(3):795–803.
 43. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Mikhalkin AA* (2022) Impaired visceral pain-related functions of the midbrain periaqueductal gray in rats with colitis. *Brain Res Bull* 182:12–25.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.02.002>
 44. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Busygina II* (2021) Amygdalofugal Modulation of Visceral Nociceptive Transmission in the Rat Caudal Ventrolateral Medulla under Normal Conditions and Intestinal Inflammation. *J Evol Biochem Phys* 57: 1150–1162.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021050161>
 45. *Paxinos G, Watson C* (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed London Academic Press.
 46. *Aimone LD, Jones SL, Gebhart GF* (1987) Stimulation-produced descending inhibition from the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus in the rat: mediation by spinal monoamines but not opioids. *Pain* 31(1):123–136.
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90012-1)
 47. *Paul D, Phillips AG* (1986) Selective effects of pirenperone on analgesia produced by morphine or electrical stimulation at sites in the nucleus raphe magnus and periaqueductal gray. *Psychopharmacology* 88(2):172–176.
<https://doi.org/10.1007/BF00652235>
 48. *Sun JH, Ruan XJ, Wang LN, Liang S, Li XP* (2015) Study on the Antinociceptive Effects of Herba Epimedii in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:483942.
<https://doi.org/10.1155/2015/483942>

49. *Ness TJ, Follett KA, Piper J, Dirks BA* (1998) Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. *Brain Res* 802(1–2):163–174. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00608-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00608-8)
50. *Luz LL, Fernandes EC, Sivado M, Kokai E, Szucs P, Safronov BV* (2015) Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I: a substrate for referred pain. *Pain* 156(10):2042–2051. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000267>
51. *Qin C, Farber JP, Linderoth B, Shahid A, Foreman RD* (2008) Neuromodulation of thoracic intraspinal visceroreceptive transmission by electrical stimulation of spinal dorsal column and somatic afferents in rats. *J Pain* 9(1):71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.08.007>
52. *Nguyen E, Grajales-Reyes JG, Gereau RW 4th, Ross SE* (2023) Cell type-specific dissection of sensory pathways involved in descending modulation. *Trends Neurosci* 46(7):539–550. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.04.002>
53. *Peng B, Jiao Y, Zhang Y, Li S, Chen S, Xu S, Gao P, Fan Y, Yu W* (2023) Bulbosplinal nociceptive ON and OFF cells related neural circuits and transmitters. *Front Pharmacol* 14:1159753. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1159753>
54. *Zhang Y, Zhao S, Rodriguez E, Takatoh J, Han BX, Zhou X, Wang F* (2015) Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J Clin Invest* 125(10):3782–3794. <https://doi.org/10.1172/JCI81156>
55. *Otsu Y, Aubrey KR* (2022) Kappa opioids inhibit the GABA/glycine terminals of rostral ventromedial medulla projections in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Physiol* 600(18):4187–4205. <https://doi.org/10.1113/JP283021>
56. *Lyubashina OA, Sivachenko IB* (2017) The 5-HT₄ receptor-mediated inhibition of visceral nociceptive neurons in the rat caudal ventrolateral medulla. *Neuroscience* 359:277–288. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.039>
57. *Pinto M, Sousa M, Lima D, Tavares I* (2008) Participation of mu-opioid, GABA(B), and NK1 receptors of major pain control medullary areas in pathways targeting the rat spinal cord: implications for descending modulation of nociceptive transmission. *J Comp Neurol* 510(2):175–187. <https://doi.org/10.1002/cne.21793>
58. *Haleem DJ* (2019) Targeting Serotonin_{1A} Receptors for Treating Chronic Pain and Depression. *Curr Neuropharmacol* 17(12):1098–1108. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190811161807>
59. *Bagdy E, Kiraly I, Harsing LG Jr* (2000) Reciprocal innervation between serotonergic and GABAergic neurons in raphe nuclei of the rat. *Neurochem Res* 25(11):1465–1473. <https://doi.org/10.1023/a:1007672008297>
60. *Inyushkin AN, Merkulova NA, Orlova AO, Inyushkina EM* (2010) Local GABAergic modulation of the activity of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus. *NeurosciBehav Physiol* 40(8):885–893. <https://doi.org/10.1007/s11055-010-9337-x>
61. *Loane C, Politis M* (2012) Buspirone: what is it all about? *Brain Res* 1461:111–118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.04.032>
62. *de Oliveira R, de Oliveira RC, Falconi-Sobrinho LL, da Silva Soares R Jr, Coimbra NC* (2017) 5-Hydroxytryptamine_{2A/2C} receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars α reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter. *Behav Brain Res* 316:294–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.016>
63. *Ferrari LF, Pei J, Zickella M, Rey C, Zickella J, Ramirez A, Taylor NE* (2021) D₂ Receptors in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe Modulate Peripheral Inflammatory Hyperalgesia via the Rostral Ventral Medulla. *Neuroscience* 463:159–173. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.03.035>
64. *Li C, Sugam JA, Lowery-Gionta EG, McElligott ZA, McCall NM, Lopez AJ, McKlveen JM, Pleil KE, Kash TL* (2016) Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. *Neuropsychopharmacology* 41(8):2122–2132. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.12>
65. *Wang XQ, Mokhtari T, Zeng YX, Yue LP, Hu L* (2021) The Distinct Functions of Dopaminergic Receptors on Pain Modulation: A Narrative Review. *Neural Plast* 2021:6682275. <https://doi.org/10.1155/2021/6682275>
66. *Costa-Pereira JT, Serrão P, Martins I, Tavares I* (2020) Serotonergic pain modulation from the rostral ventromedial medulla (RVM) in chemotherapy-induced neuropathy: The role of spinal 5-HT₃ receptors. *Eur J Neurosci* 51(8):1756–1769. <https://doi.org/10.1111/ejn.14614>
67. *Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W* (2010) Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *J Neurosci* 30(25):8624–8636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5389-09.2010>
68. *Li MH, Suchland KL, Ingram SL* (2015) GABAergic transmission and enhanced modulation by opioids and endocannabinoids in adult rat rostral ventromedial medulla. *J Physiol* 593(1):217–230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275701>

EFFECTS OF THE NUCLEUS RAPHE MAGNUS STIMULATION ON NOCICEPTIVE NEURONS OF THE RAT CAUDAL VENTROLATERAL MEDULLA IN NORMAL CONDITIONS AND AFTER INTESTINAL INFLAMMATION

B. M. Sushkevich^a, I. B. Sivachenko^a and O. A. Lyubashina^{a, #}

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

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

The nucleus raphe magnus (RMg) is a key structure of the endogenous antinociceptive system, the activity of which is regulated by serotonin 5-HT_{1A} receptors. A recipient of the RMg descending projections is the caudal ventrolateral medulla (cVLM) - the first supraspinal center for processing visceral and somatic pain signals. Intestinal pathology is known to cause persistent functional alterations in the RMg, which are associated with the development of visceral and somatic hyperalgesia. Presumably, a consequence of the alterations may be changes in the RMg modulating effects on cVLM nociceptive activity. However, the specific neuronal and molecular mechanisms underlying such influence in normal conditions, as well as their changes in pathology remain unexplored. The aim of our neurophysiological experiments performed in anesthetized adult male Wistar rats was to compare the effects of RMg electrical stimulation on the activity of cVLM neurons evoked by visceral (colorectal distension, CRD) and somatic (tail squeezing) pain stimulations that occur in normal conditions and after intestinal inflammation (colitis), with an assessment of the contribution to these processes of the supraspinal 5-HT_{1A} receptor activation with intracerebroventricular buspirone. It has been shown that RMg can exert an inhibitory effect on both non-selective and differential responses of the cVLM neurons to diverse pain stimuli, causing a weakening of excitatory neuronal reactions and an increase in inhibitory responses to CRD while inhibiting both types of reactions to tail squeezing. The RMg-evoked suppression of nociceptive excitation in the caudal medullary neurons is enhanced under activation of supraspinal 5-HT_{1A} receptors by buspirone. It has been established that in postcolitis period the RMg inhibitory action on different populations of cVLM neurons are significantly diminished, indicating an impairment of the nucleus' antinociceptive function. In these conditions, the RMg descending influence loses its 5-HT_{1A} receptor-dependent component. The changes described may contribute to the supraspinal mechanisms underlying pathogenesis of post-inflammatory abdominal pain and comorbid somatic hyperalgesia.

Keywords: nucleus raphe magnus, caudal ventrolateral medulla, neuronal activity, 5-HT_{1A} receptors, visceral nociception, somatic nociception, postcolitis period

МЕХАНИЗМЫ ВОВЛЕЧЕНИЯ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В РАЗВИТИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКИХ КИСЛОРОДНЫХ СУДОРОГ

© 2024 г. С. Ю. Жилев¹, И. Н. Басова¹, Т. Ф. Платонова¹, О. С. Алексеева¹*,
Н. А. Гавришева², И. Т. Демченко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² ФБГОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: osa72@inbox.ru

Поступила в редакцию 25.04.2024 г.

После доработки 25.07.2024 г.

Принята к публикации 31.07.2024 г.

Дыхание гипербарическим кислородом (ГБО₂) вызывает генерализованные тонические и клонические судороги, механизмы возникновения которых недостаточно изучены. Целью настоящей работы являлось исследование механизмов вовлечения моноаминоксидазы (МАО) в развитие гипербарических кислородных судорог. У крыс, находящихся в барокамере под давлением кислорода 5 АТА, анализировали судорожные реакции после введения пиразидола — ингибитора МАО-А и паргилина — ингибитора МАО-Б. Исследования показали снижение активности МАО-изоформ в ГБО₂, а также задержку развития судорог у животных при ингибировании МАО-А и МАО-Б. Уровень ГАМК в мозге понижался при ГБО₂, а ингибирование МАО-Б с помощью паргилина предотвращало снижение содержания тормозного медиатора. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МАО-изоформы играют важную роль в регулировании эпилептогенеза при экстремальной гипероксии. Гипербарический кислород, ингибируя каталитическую активность МАО путем трансформации ее молекулярной структуры, приводит к нарушению регуляции обмена моноаминовых нейротрансмиттеров и понижению уровня ГАМК в мозге, что в совокупности ведет к дисбалансу процессов возбуждения/торможения в ЦНС, лежащему в основе патогенеза кислородной эпилепсии.

Ключевые слова: гипербарический кислород, судороги, адренергическая система мозга, моноаминоксидаза, пиразидол, паргилин

DOI: 10.31857/S0044452924050069, EDN: XPERWU

ВВЕДЕНИЕ

Дыхание кислородом под давлением (гипербарический кислород, ГБО₂) используется в оксигенотерапии для лечения многих заболеваний, а также акванавтами и водолазами для выполнения различных экономических и военных задач. Несмотря на относительную безопасность, использование сжатого кислорода сопряжено с риском его токсического действия на ЦНС, которое проявляется в виде эпилептиформных паттернов на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) и тонико-клонических моторных судорог, напоминающих генерализованный эпилептический припадок. Многолетние исследования судорожной активности мозга в ГБО₂, получившей название «кислородная эпилепсия» [1], до сих пор не привели к пониманию ее патогенеза. Одним из признаков развития гипероксических судорог является высокая активность перифе-

рического отдела симпатической нервной системы, которая сопровождается острой гипертензией с нарушением сердечной и легочной функций [2–4]. Гиперактивность симпатической нервной системы в ГБО₂ предшествует появлению судорог, что допускает их причинно-следственную связь. Адренорецепторы головного мозга, как часть центральной адренергической системы, причастны в гиперактивации симпатической нервной системы и влияют на развитие гипербарических кислородных судорог. Доказательством этому служит тот факт, что введение в мозговую желудочек крысы неселективных и селективных антагонистов α- и β-норадренорецепторов (пропранолол, атенолол, фентоламин и празозин), модифицирует сердечно-сосудистые реакции, а пропранолол, кроме того, эффективно предотвращает развитие судорожного синдрома, увеличивая более чем в 2 раза латентный период появления гипероксических судорог [4–5]. Сово-

купность представленных данных позволяет высказать предположение об участии норадренергической системы в развитии судорожной активности мозга при дыхании гипербарическим кислородом.

Ключевая роль в функционировании норадренергической передачи в мозге принадлежит моноаминоксидазе (МАО), которая осуществляет катаболизм моноаминовых нейромедиаторов посредством их окислительного дезаминирования. МАО поддерживает постоянство концентраций эндогенных моноаминов синаптической передачи в головном мозге. Локализованная в митохондриях, МАО существует в двух функциональных формах: МАО-А и МАО-Б. По своему строению обе изоформы белка сходны между собой, их аминокислотные последовательности совпадают примерно на 70%. Оба типа МАО в большом количестве найдены в нейронах и глиальных клетках головного мозга. Изоформы МАО различаются по своим функциям, каждая из них проявляет преимущественное сродство к субстратам и специфичность к ингибиторам [6–7]. По отношению к биогенным аминам, МАО-А предпочтительно метаболизирует серотонин, норадреналин и адреналин, тогда как МАО-Б преимущественно дезаминирует фенилэтиламин. Дофамин рассматривается как смешанный субстрат, который окисляется с помощью МАО-А в мозге крыс, но с участием МАО-Б в мозге человека [8].

Предположение о причастности МАО к ГБО₂-опосредованным судорогам высказывалась ранее и при этом рассматривались три потенциальных механизма вовлечения фермента в развитие судорожного процесса. Согласно этим гипотетическим механизмам, МАО вовлекается в развитие гипероксических судорог за счет: (а) повышения содержания в мозге перекиси водорода, являющейся конечным продуктом дезаминирования моноаминовых нейромедиаторов и обладающей просудорожным действием [9]; (б) МАО-опосредованных изменений уровня катехоламинов в мозге, приводящих к нарушениями нервной передачи, проявляющейся в активации периферического и центрального отделов адренергической системы в ГБО₂ [4, 10]; (в) влияния МАО на метаболизм ГАМК [11–12]. Все названные механизмы вовлечения МАО в развитие ГБО₂-опосредованных судорог обосновывались косвенными данными и их валидность до сих пор остается недоказанной.

Целью настоящей работы являлся экспериментальный анализ трех вышеизложенных потенциальных механизмов вовлечения МАО в развитие гипероксических судорог. В рамках поставленной цели оценивали каталитическую активность двух изоформ МАО при введении пирозидола и паргилина, а также динамику мозговой ГАМК у животных в барокамере под давлением 5 АТА. Пирази-

дол (пирлиндол) является селективным обратимым ингибитором МАО-А. Активность этой изоформы фермента восстанавливается в течение нескольких часов после использования ингибитора. Пиразидол ингибирует активность МАО-А и блокирует пути метаболического разрушения нейромедиаторов норадренергической системы мозга, что препятствует нормальной терминации их медиаторного действия и ведет к возрастанию функциональной активности симпатoadреналовой системы [13]. Паргилин является необратимым селективным ингибитором МАО-Б (IC₅₀ для МАО-А составляет 0.01152 мкмоль/л, а для МАО-Б — 0.00820 мкмоль/л). МАО-Б преимущественно дезаминирует фенилэтиламин, но принимает также участие в окислительном дезаминировании катехоламинов, таких, как норадреналин и дофамин, в пресинаптических нервных окончаниях. Ингибируя катаболизм этих биогенных аминов в головном мозге, паргилин увеличивает их синаптическую концентрацию и связывание с постсинаптическими рецепторами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали крыс линии Wistar массой 265–295 г, закупленных в питомнике лабораторных животных «Рапполово» (Всеволожский район, Ленинградская область).

Эксперименты выполнены на бодрствующих и наркотизированных животных в барокамере, заполненной кислородом под давлением 5 АТА (атмосфер абсолютных). В первой серии опытов использовали интактных (не оперированных) крыс, которым за 30 мин до компрессии кислородом вводили внутрибрюшинно физиологический раствор (контрольная группа), пирозидол (Фармстандарт-Лексредства, Москва, Россия) в дозе 10, 25, 100 мг/кг или паргилин (Pargyline hydrochloride, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) в дозе 25 мг/кг. Препараты растворяли в физиологическом растворе и вводили в объеме 1.0 мл на животное. Через 30 мин после инъекции крыс помещали в кислородную барокамеру объемом 100 литров по четыре животных в каждом опыте. Повышение давления кислорода в камере до 5 АТА в опытах осуществляли со скоростью 1 АТА/мин. Температуру в камере поддерживали в пределах 23–25°C, влажность около 60%, содержание CO₂ не превышало 0.05%. Экспозиция крыс в ГБО₂ продолжалась до появления выраженных тонических или клонических судорог, а при их отсутствии — максимально до 90 мин.

У интактных животных после 4-минутной декомпрессии извлекали головной мозг, согласно утвержденному протоколу, выделяли теменную кору, стриатум и гипоталамус, в которых измеряли активность моноаминоксидазы. Для этого ис-

пользовали фрагменты митохондриальных мембран каждого из трех отделов головного мозга крыс, частично очищенных от балластного белка посредством их экстракции в 0.0075 М калий-фосфатном буфере, pH = 7.4. Содержание белка в ферментных препаратах определяли по методу Лоури [14]. Активность MAO определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 440 нм по количеству аммиака, образующегося в результате ферментативной реакции окислительного дезаминирования субстрата (норадrenalина), по модифицированному методу Конвея с последующей несселеризацией [15–16]. Анализируемые пробы (конечный объем 2.5 мл) содержали 1 мг/мл митохондриального белка, 0.01 М фосфатного буфера, pH = 7.4 и норадrenalина гидротарtrate в форме моногидрата (концентрации 4.010^{-4} М). В опытах с введением паргилина (25 мг/кг) активность MAO определяли в теменной коре крыс аналогичным предыдущему методом, используя спектрофотометрическое измерение активности фермента по количеству аммиака, образующегося в результате дезаминирования субстрата (норадrenalин) и подробно изложенного в работе [17].

Во второй серии опытов использовали крыс, которым под наркозом (в расчете на 100 гр. массы животного): золетил 0.3 мг в/м, ксилазин 0.8 мг в/м, атропина сульфат 0.1 % раствор — 0.01 мл п/к, в стриатум мозга имплантировали платиновые электроды диаметров 150 мкм согласно стереотаксическим координатам (AP = + 1.0 мм, L = 2.5 мм, D = 6.7 мм) по атласу [18]. Платиновые электроды использовались для измерений кровотока методом водородного клиренса [19]. Через 7 дней после операции, животным за 30 мин до кислородной экспозиции внутрибрюшинно вводили физраствор (контрольная группа), пиразидол (25 мг/кг) или паргилин (25 мг/кг). Через 30 мин после инъекции крыс помещали в кислородную барокамеру объемом 100 литров по одному оперированному животному в каждом опыте. Параметры ГБО₂-экспозиции были такими же, как и в первой серии опытов. Экспозиция крыс в ГБО₂ продолжалась до появления выраженных тонико-клонических судорог, а при их отсутствии — максимально до 90 мин.

В третьей серии опытов измеряли содержание внеклеточной ГАМК в стриатуме крыс, находящихся в барокамере под давлением кислорода 5 АТА. Для этого наркотизированным животным (уретан 750 мг/кг + хлоралоза 250 мг/кг, внутрибрюшинно) в стриатум (координаты такие же, как для измерения кровотока) вводили микродиализные канюли (СМА/11, СМА/Microdialysis АВ, Швеция). Во время ГБО₂-экспозиции канюли перфузировали искусственным ликвором со скоростью 1.0 мкл/мин, а пробы диализата объемом 15 мкл автоматически отбирали каждые 15 мин (СМА 142 Microfraction Col-

lector, АВ, Швеция). Биоэлектрическую активность коры мозга (ЭКоГ) у наркотизированных животных в ГБО₂ регистрировали с помощью винтов из нержавеющей стали диаметром 2.4 мм. Один винт вводили через отверстие в теменной кости черепа до соприкосновения с твердой мозговой оболочкой, а другой, индифферентный, — в лобную пазуху. Для регистрации ЭКоГ использовали измерительный комплекс с вычислением спектральных характеристик биоэлектрического процесса (LabView 2, iWORK, СА, США). Появление судорожной активности мозга оценивали по наличию повторяющихся комплексных спайков.

Измерения ГАМК в пробах диализата проводили с помощью высокопроизводительной жидкостной хроматографии (HPLC) с электрохимической детекцией ГАМК в диализате (ESA model 5100A). Содержание ГАМК в пробах диализата определяли в мкмоль/л по калибровочным стандартам. Параметры ГБО₂-экспозиции были такими же, как и в двух первых сериях опытов.

Всего в исследованиях было использовано 75 животных, разделенных на 12 групп. В первой серии опытов использовано 42 крыс, разделенных на 6 групп. Животных первой группы ($n = 7$) с интактной MAO подвергали действию гипербарического кислорода 5 АТА после внутрибрюшинного введения физраствора (контрольная группа). За 30 мин до ГБО₂-экспозиции крысам второй ($n = 7$), третьей ($n = 7$) и четвертой групп ($n = 7$) внутрибрюшинно вводили пиразидол в дозах 10, 25 и 100 мг/кг соответственно, а животным пятой группы ($n = 7$) вводили паргилин в дозе 25 мг/кг. Крысам шестой группы ($n = 7$) вводили пропранолол (5 мг/кг) с последующей экспозицией под давлением кислорода 5 АТА.

Во второй серии опытов с вживленными электродами использовали 21 животное, разделенные на 3 группы. Кровоток в стриатуме под давлением кислорода 5 АТА измеряли без введения препаратов (группа 7, $n = 7$), а в группах 8 ($n = 7$) и 9 ($n = 7$) после введения пиразидола в дозе 25 мг/кг и паргилина в дозе 25 мг/кг, соответственно, с последующей экспозицией в ГБО₂.

В третьей серии опытов использовано 12 животных, у которых ГАМК в стриатуме измеряли при дыхании воздухом в течении 75 мин (группа 10, $n = 3$), в барокамере под давлением кислорода 5 АТА (группа 11, $n = 4$) и в группе крыс (группа 12, $n = 5$), которым за 30 мин до ГБО₂-экспозиции внутрибрюшинно вводили паргилин (25 мг/кг).

Для статистического анализа с применением программы SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, США) использовали значения латентного периода появления гипероксических судорог, а также величины каталитической активности MAO и мозгового кровотока. Однофакторный дисперсион-

ный анализ применяли для сравнения латентных периодов судорожных реакций у животных первой серии опытов. Двухфакторный дисперсионный анализ использовали для определения эффектов ГБО₂ и MAO-ингибиторов на мозговой кровоток. Для выявления достоверности отличий использовали парный *t*-критерий с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Все данные представлены как $M \pm SEM$, статистически значимые изменения принимались при уровне $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моторные проявления гипероксических судорог

У животных, которым не вводили препараты, в период ГБО₂ появлялись характерные двигательные нарушения, разделенные нами на 4 стадии в соответствии с известной шкалой интенсивности судорожной активности [20]. В первые 10–15 мин гипероксической экспозиции животные оставались неподвижными, затем у них появлялся интенсивный груминг, единичные встряхивания головы и передних лап (стадия 1). Стадия 2 характеризовалась усиливающимися сокращениями мышц головы и передних конечностей продолжительностью 3–15 сек с последующим повторением. На стадии 3 у животных появлялись сокращения мышц всего тела продолжительностью до 20 сек, при этом животные вставали на задние лапы и пятились назад. На стадии 4 у крыс развивались генерализованные клонические или тонические судороги, которые сопровождались острыми нарушениями сердечной деятельности и внешнего дыхания.

Стадийное развитие судорожного синдрома в ГБО₂ сохранялось у животных, которым предварительно вводили пиразидол или паргилин. При введении пиразидола в дозе 10, 25 и 100 мг/кг латентный период развития 4-й стадии судорожного синдрома максимально удлинялся по сравнению с таковым для контрольных животных при дозе 25 мг/кг (рис. 1а). Паргилин в дозе 25 мг/кг также статистически значимо увеличивал время появления судорог по сравнению с контрольной группой животных. Противосудорожная активность обоих ингибиторов, введенных в равных дозах, была одинаковой. Введение пропранолола максимально предотвращало развитие гипербарических кислородных судорог (рис. 1б).

Влияние пиразидола и паргилина на активность MAO

У контрольной группы крыс кислород под давлением 5 АТА достоверно понижал активность MAO (субстрат норадреналин) в коре и гипоталамусе, но повышал в стриатуме. У животных с предваритель-

ным введением пиразидола в дозе 10 или 25 мг/кг и последующей экспозицией в ГБО₂ было выявлено дальнейшее снижение активности MAO во всех трёх структурах ($p < 0.05$). При увеличении дозы препарата до 100 мг/кг отмечали снижение активности MAO в коре, тогда как в стриатуме и гипоталамусе активность фермента уменьшалась недостоверно по отношению к значениям, измеренным при дыхании воздухом (рис. 2). Активность MAO в теменной коре крыс при введении паргилина и экспозиции животных в кислороде под давлением 5 АТА понижалась примерно на 30% и составляла в среднем $69 \pm 4.8\%$ по отношению к контролю.

Мозговой кровоток при ингибировании MAO

Абсолютная величина кровотока в стриатуме головного мозга крыс при дыхании воздухом составляла 81 ± 6.3 мл/мин/100 г мозга. Введение пиразидола этим животным вызывало понижение кровотока в

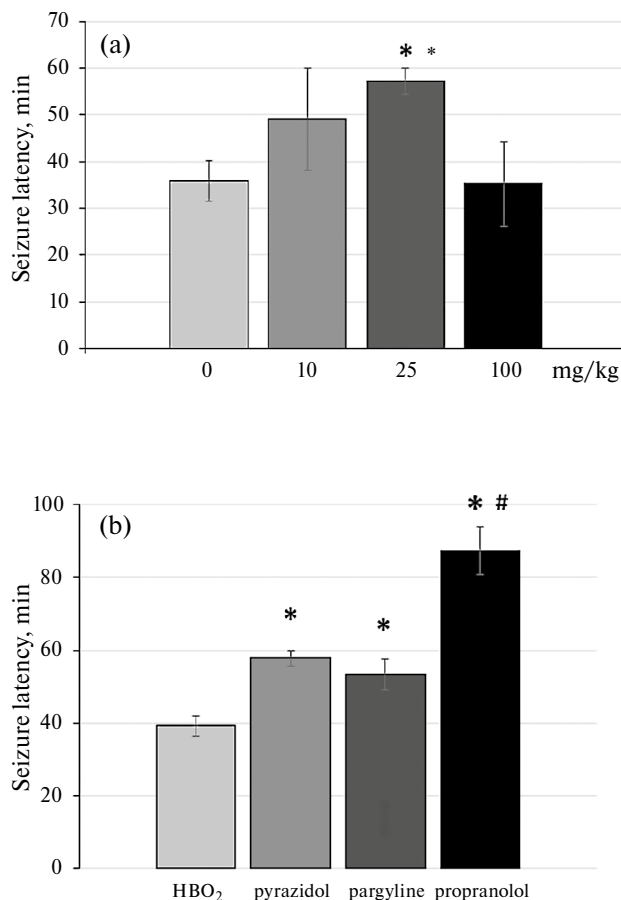


Рис. 1. Латентный период развития 4-й стадии судорог у крыс при дыхании кислородом под давлением 5 АТА после введения ингибиторов MAO: (а) — после введения различных доз пиразидола (мг/кг), * $p < 0.05$ по отношению к контролю (введение физраствора); (б) — при введении пиразидола (25 мг/кг), паргилина (25 мг/кг), пропранолола (5 мг/кг). * $p < 0.05$ по отношению к ГБО₂, # $p < 0.05$ по отношению к пиразидолу и паргилину.

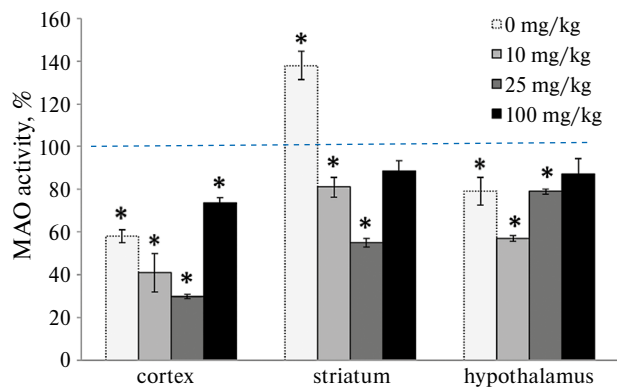


Рис. 2. Изменение активности MAO в структурах мозга крыс после их экспозиции в гипербарическом кислороде под давлением 5 АТА с предварительным введением различных доз пиразидола. * $p < 0.05$ по отношению к активности MAO при дыхании воздухом (пунктирная линия).

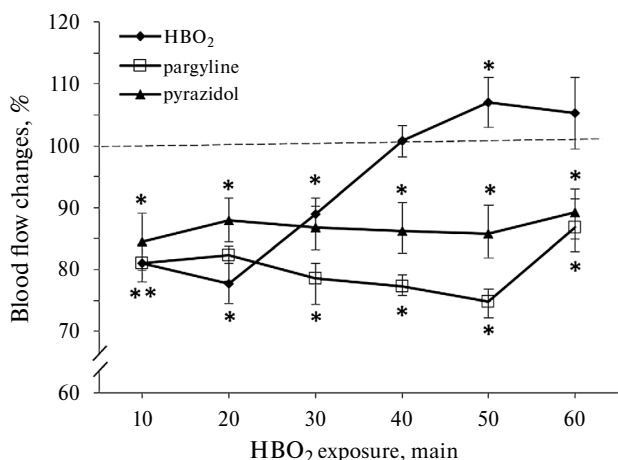


Рис. 3. Изменение кровотока в стриатуме крыс при дыхании кислородом под давлением 5 АТА после введения паргилина (25 мг/кг) и пиразидола (25 мг/кг). * $p < 0.05$ по отношению к кровотоку при дыхании воздухом (пунктирная линия).

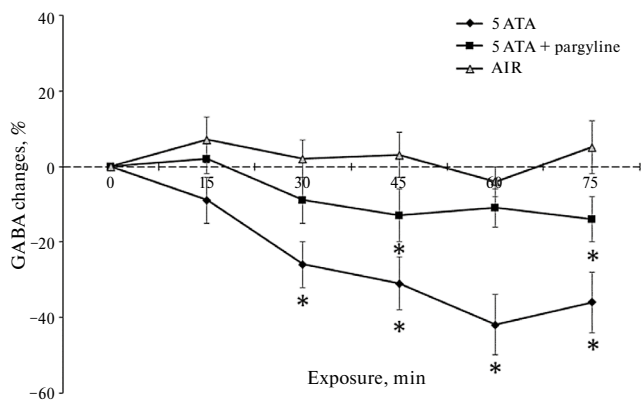


Рис. 4. Влияние ингибирования MAO-B с помощью паргилина (25 мг/кг) на содержание ГАМК в стриатуме крыс при дыхании гипербарическим кислородом. * $p < 0.05$ по отношению к значениям ГАМК при дыхании воздухом (пунктирная линия).

стриатуме на 5–13 % в ходе 60-минутных измерений. Во время ГБО₂-экспозиции наблюдались фазные изменения кровотока в стриатуме: понижение в первые 30 мин с последующим повышением перед появлением генерализованных судорог (рис. 3). В группе животных, которым вводили пиразидол в дозе 25 мг/кг с последующей экспозицией в барокамере под повышенным давлением кислорода, наблюдалась только первая фаза снижения кровотока, а церебральная гиперемия не проявлялась. Предварительное введение паргилина в дозе 25 мг/кг также предотвращало развитие гиперемии в мозге животных во время ГБО₂-экспозиции (рис. 3).

У наркотизированных животных моторных судорожных проявлений в ГБО₂ не наблюдалось, но на ЭКОГ появлялись повторяющиеся эпилептиформные спайки через 67 ± 7.7 мин после начала кислородной экспозиции при давлении 5 АТА. Относительные значения мощностей для дельта- и тета-частотных диапазонов ЭКОГ возрастали на 35 и 78 % соответственно по отношению к контрольным величинам.

Концентрация ГАМК в стриатуме наркотизированных крыс при дыхании атмосферным воздухом составляла 0.073 ± 0.068 мкмоль/л. Контрольный уровень ГАМК сохранялся на протяжении 75 мин измерений. У животных в ГБО₂ с интактной MAO уровень ГАМК постепенно снижался, достигая величины $42 \pm 8.3\%$ от контрольного значения при дыхании воздухом. После внутрибрюшинного введения крысам паргилина в дозе 25 мг/кг с последующей их экспозицией в ГБО₂ уровень внеклеточной ГАМК в стриатуме приближался к значениям, полученным при дыхании воздухом (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе получены новые данные, указывающие на причастность MAO к развитию судорожной активности головного мозга в условиях гипербарической гипероксии. В частности, установлено, что дыхание кислородом под давлением 5 АТА приводило к развитию судорог и разнонаправленным изменениям активности MAO в мозге крыс: достоверному снижению в коре и гипоталамусе, и повышению в стриатуме. Далее, при ингибировании MAO-A с помощью пиразидола или MAO-B с помощью паргилина активность фермента снижалась во всех исследуемых мозговых структурах, а развитие судорог заметно ослаблялось. И еще, у животных в ГБО₂ мозговая ГАМК снижалась, а при ингибировании MAO с помощью паргилина внеклеточная ГАМК в стриатуме оставалась на уровне контрольных значений.

Полученные результаты позволяют провести валидацию обсуждаемых в литературе механизмов вовлечения MAO в развитие ГБО₂-опосредо-

ванной судорожной активности головного мозга. Один из таких механизмов связывается с изменениями активности MAO в гипероксической среде. Выявленное в настоящей работе понижение активности фермента в коре и гипоталамусе после пребывания животных в ГБО₂ согласуется с результатами другого исследования, показавшего понижение активности MAO в митохондриальной фракции целого мозга крыс после их экспозиции в гипербарическом кислороде [11]. Вместе с тем, в настоящей работе одновременно со снижением активности MAO выявлено повышение каталитических свойств фермента в стриатуме мозга крыс после их пребывания в гипероксической среде под давлением 5 АТА. Основываясь на этих данных логично допустить, что появление гипероксических судорог зависит от направленности изменений активности MAO в определенных мозговых структурах. Системное ингибирование фермента с помощью пиразидола или паргилина перед ГБО₂-экспозицией приводило к понижению активности MAO во всех исследуемых структурах мозга и замедляло появление судорог. Это означает, что умеренное снижение активности MAO в ГБО₂ напрямую не является причиной развития гипероксических судорог или, по меньшей мере, пониженного уровня активности фермента недостаточно для их развития. При этом следует отметить, что противосудорожные эффекты пиразидола и паргилина одинаковы, когда ингибиторы сравнивались в равных дозах, а для оценки активности фермента в обоих случаях использовали норадреналин. Это указывает на то, что в норадренергической системе мозга существуют разные мишени для подавления или предупреждения гипербарических кислородных судорог. Доказательством этому служит тот факт, что противосудорожное действие пропранолола в наших опытах оказалось значительно сильнее, чем у двух ингибиторов MAO (рис. 1).

Другим, обсуждаемым в литературе, механизмом вовлечения MAO в развитие гипероксических судорог является возможное участие в их патогенезе перекиси водорода и аммиака — конечных продуктов окислительного дезаминирования моноаминов [21]. Действительно, уровень H₂O₂ в головном мозге повышается в условиях гипербарической гипероксии [9, 22]. Однако причастность MAO к увеличению внеклеточного уровня H₂O₂ неочевидна, так как по нашим данным и результатам других исследований [11] каталитическая активность фермента подавляется в гипербарической гипероксии, а значит и уровень конечных продуктов дезаминирования нейромедиаторов должен понижаться. Выявленное повышение уровня экстраклеточной H₂O₂ в мозге [9, 22], вероятнее всего, связано с биотрансформацией супероксидных анионов, генерация ко-

торых в условиях гипероксии значительно усиливается [23–25].

Следующим потенциальным механизмом участия MAO в развитии гипероксических судорог может быть усиление функции адренергической системы в мозге за счет повышения уровня катехоламинов [26]. В настоящей работе мы не измеряли уровень мозгового норадреналина, но, используя его в качестве субстрата для определения активности MAO в мозге, получили результаты, предполагающие повышение уровня катехоламинов, по меньшей мере в коре и гипоталамусе. Если ингибирование MAO ведет к повышению уровня норадреналина, то это может приводить к возрастанию функциональной активности адренергической системы в мозге и, в целом, к гиперактивации всей симпатoadреналовой системы [27, 28]. Подтверждением этому является усиление симпатической активности и повышение содержания норадреналина в плазме крови крыс, у которых наблюдались судороги в гипероксии под давлением 5 АТА [29]. Просудорожное действие норадреналина показано и на других экспериментальных моделях эпилепсии [27].

Косвенным доказательством причастности норадреналина к развитию судорог является противосудорожное действие блокаторов норадренергических рецепторов в мозге [4]. Так как норадренергическая система оказывает тормозящее действие на функцию ГАМК-ергических нейронов мозга, повышение ее активности может приводить к релаксированию и усилению процессов возбуждения в центральной нервной системе и, как следствие, к возникновению у животных судорожной активности. Однако следует отметить, что блокада не всех типов адренорецепторов приводит к противосудорожному эффекту. В частности, малоэффективным противосудорожным эффектом обладал фентоламин — неселективный блокатор α1- и α2- рецепторов, а прозапин — селективный блокатор α1 вообще не оказывал действия на развитие судорог у крыс в гипербарическом кислороде [5]. Важно также отметить, что ингибирование обеих изоформ моноаминоксидазы приводило к увеличению внеклеточной концентрации дофамина и 3-метокситирамина при нормобарической гипероксии [30]. В больших концентрациях дофамин стимулирует α- и β-адренорецепторы и это действие связано с его способностью высвобождать норадреналин из гранулярных пресинаптических депо, то есть оказывать не прямое адреномиметическое действие [31].

При существовании множества доказательств активации норадренергической системы в генезе гипербарических кислородных судорог, имеются данные о дефиците норадреналина, приводящем к развитию эпилептических судорог. Так, из клиники известно о снижении уровня норадреналина у па-

циентов с височной эпилепсией [32]. В настоящей работе выявлено повышение активности MAO в стриатуме крыс при их экспозиции в ГБО₂. Можно предположить, что следствием активации фермента в стриатуме может быть снижение уровня норадреналина в этой структуре. Однако из-за отсутствия прямых его измерений, как в настоящей работе, так в других исследованиях, не представляется возможным однозначно считать причиной развития кислородных судорог понижение уровня этого нейромедиатора в стриатуме. Следует лишь упомянуть, что снижение уровня другого катехоламина — дофамина в стриатуме наблюдалось у крыс во время их экспозиции в гипербарическом кислороде [33]. При всей привлекательности гипотезы о вовлечении катехоламинов в развитие гипероксических судорог, результаты настоящей работы являются косвенным доказательством участия MAO в нарушении норадренергической передачи, приводящем к судорожному синдрому. До сих пор неизвестны ни уровень катехоламинов, ни их динамика в разных структурах мозга при развитии патологической реакции на экстремальную гипероксию.

Еще один потенциальный механизм вовлечения MAO в развитие кислородных судорог может базироваться на том, что подавление каталитической активности MAO в ГБО₂ сопровождается появлением качественно новых реакций дезаминирования азотистых соединений, не относящихся к моноаминам. Некоторые аминокислоты, такие, как лизин и ГАМК, являются субстратами для химически модифицированной MAO [34]. Качественная модификация мембраносвязанного MAO обычно наблюдается в экспериментальных условиях, вызывающих стимуляцию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биомембранах и окисление SH-групп в составе фермента-белка [12]. Условия экстремальной гипероксии являются идеальными для биотрансформации MAO, так как характеризуются выраженными реакциями ПОЛ, окислением или S-нитрозилированием различных белков, в том числе и ферментов [35]. Результаты исследований подтверждают ранее полученные данные [11] и гипотезу о том, что трансформированная в гипероксии MAO дезаминирует ГАМК, что приводит к снижению ее внеклеточного содержания и развитию судорог. В наших опытах паргилин, ингибируя MAO, ослабляет скорость дезаминирования ГАМК и поддерживает ее на уровне, достаточном для противодействия развитию гипероксических судорог.

Таким образом, валидация предполагаемых механизмов вовлечения MAO в развитие гипербарических кислородных судорог свидетельствует о том, что MAO играет важную роль в регулировании эпилептогенеза в экстремальной гипероксии. Гипербарический кислород, ингибируя каталитическую

активность MAO путем трансформации ее молекулярной структуры, приводит к нарушению регуляции обмена моноаминовых нейротрансмиттеров и понижению уровня ГАМК в мозге, что в совокупности ведет к дисбалансу процессов возбуждения/торможения в ЦНС, приводящему к развитию кислородной эпилепсии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и дизайн эксперимента (И.Т.Д.), постановка экспериментов (С.Ю.Ж., Т.Ф.П., И.Н.Б.), сбор данных (С.Ю.Ж., Т.Ф.П., Н.А.Г., И.Н.Б., О.С.А.), обработка данных (И.Т.Д., С.Ю.Ж., Н.А.Г., И.Н.Б., О.С.А.), написание и редактирование текста (И.Т.Д., О.С.А., С.Ю.Ж., Н.А.Г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН (рег. № 075-00264-24-00).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 1-12/2022 от 27.01.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zal'tsman GL* (1968) Стадии развития кислородной эпилепсии и функциональное состояние нервной системы. В кн. Гипербарические эпилепсия и наркоз. Л. Наука. С. 129–136. [*Zal'tsman GL* (1968) Stages of formation of oxygen-induced epilepsy and the functional state of the nervous system. In: *Hyperbaric Epilepsy and Narcosis: Neurophysiological Studies* (in Russian with English abstracts). *Zal'tsman GL* (ed.). Nauka. Leningrad, pp. 129–136.]
2. *Bean JW, Zee D, Thom B* (1966) Pulmonary changes with convulsions induced by drugs and oxygen at high pressure. *J Appl Physiol* 21(3): 865–872. <https://doi.org/10.1152/jappl.1966.21.3.865>
3. *Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA 3rd, Potter SJ, Putnam RW* (2004) Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *J Appl Physiol* (1985) 96(2): 784–791. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00892.2003>
4. *Gasier HG, Demchenko IT, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Krivchenko AI, Piantadosi CA* (2018) Adrenoceptor blockade modifies regional cerebral blood flow responses to hy-

- perbaric hyperoxia: protection against CNS oxygen toxicity. *J Appl Physiol* (1985) 125(4): 1296–1304. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00540.2018>
5. *Platonova TF, Alekseeva OS, Nikitina ER, Demchenko IT* (2020) Blockade of Brain Adrenoreceptors Delays Seizure Development during Hyperbaric Oxygen Breathing. *J Evol Biochem Phys* 56(5): 425–433. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050051>
 6. *Glover V, Gibb C, Sandler M* (1986) The role of MAO in MPTP toxicity. *J Neural Transm Suppl* 20: 65–76.
 7. *Knoll J* (1978) On the dual nature of monoamine oxidase. *Horiz Biochem Biophys* 5: 37–64.
 8. *Magyar K* (1993) Pharmacology of monoamine oxidase type B inhibitors. In: *Inhibitors of Monoamine Oxidase B. Pharmacology and Clinical Use in Neurodegenerative Disorders* (ed. Szelenyi I) Birkhauser, Basel 125–143.
 9. *Yusa T, Beckman JS, Crapo JD, Freeman BA* (1987) Hyperoxia increases H₂O₂ production by brain in vivo. *J Appl Physiol* (1985) 63(1): 353–358. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.1987.63.1.353>. PMID: 362413
 10. *Demchenko IT, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Piantadosi CA, Allen BW* (2010) Autonomic activation links CNS oxygen toxicity to acute cardiogenic pulmonary injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300(1): L102–111. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00178.2010>
 11. *Горошинская ИА, Кричевская АА, Шугалей ВС, Шерстнев КБ, Баламирзоева РМ* (1986) Активность моноаминоксидазы и уровень гамма-аминомасляной кислоты при гипероксии, влияние хлоргидрата. *Вопросы медицинской химии* 32(2): 76–79. [*Goroshinskaya IA, Krichevskaya AA, Shugalei VS, Sherstnev KB, Balamirzoeva RM* (1986) Monoamine oxidase activity and gamma-aminobutyric acid levels in hyperoxia. The effect of clorgyline. *Vopr Med Khim* 32(2): 76–79.]
 12. *Medvedev AE, Rajgorodskaya DI, Gorkin VZ, Fedotova IB, Semiokhina AF* (1992) The role of lipid peroxidation in the possible involvement of membrane-bound monoamine oxidases in gamma-aminobutyric acid and glucosamine deamination in rat brain. Focus on chemical pathogenesis of experimental audiogenic epilepsy. *Mol Chem Neuro-pathol* 16(1–2): 187–201. <https://doi.org/10.1007/BF03159969>
 13. *Bruhwyler J, Liégeois JF* (1997) Pirlindole: a selective reversible inhibitor of monoamine oxidase A. A review of its preclinical properties. *Géchy J Pharmacol Res* 36(1): 23–33. <https://doi.org/10.1006/phrs.1997.0196>
 14. *Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265–275.
 15. *Северина ИС* (1979) О возможном механизме избирательного торможения хлоргидрином и депренилом активности митохондриальной моноаминоксидазы печени крыс. *Биохимия* 44(2): 195–207. [*Severina IS* (1979) Possible mechanism of selective inhibition of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by chlorgiline and deprenyl. *Biokhimiia*. 44(2): 195–207. (In Russ)].
 16. *Стрелков РБ* (1967) К модификации методики изотермической перегонки аммиака. Лабораторное дело. 1: 17–19. [*Strelkov RB* (1967) On the modification of the method of isothermic sublimation of ammonia. *Lab Delo*. 1: 17–19. (In Russ)].
 17. *Zhang J, Piantadosi CA* (1991) Prevention of H₂O₂ generation by monoamine oxidase protects against CNS O₂ toxicity. *J Appl Physiol* (1985) 71(3): 1057–1061. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.1991.71.3.1057>
 18. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Boston, MA: Elsevier.
 19. *Demchenko IT, Luchakov YuI, Moskvina AN, Gutsaeva DR, Allen BW, Thalmann ED, Piantadosi CA* (2005) Cerebral blood flow and brainoxygenation in rats breathing oxygen under pressure. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(10): 1288–1300. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600110>
 20. *Racine RJ* (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32(3): 281–294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
 21. *Faiman MD, Nolan RJ, Baxter CF, Dodd DE* (1977) Brain gamma-aminobutyric acid, glutamic acid decarboxylase, glutamate, and ammonia in mice during hyperbaric oxygenation. *J Neurochem* 28(4): 861–865. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10640.x>
 22. *Piantadosi CA, Tatro LG* (1990) Regional H₂O₂ concentration in rat brain after hyperoxic convulsions. *J Appl Physiol* (1985) 69(5): 1761–1766. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.1990.69.5.1761>
 23. *D'Agostino DP, Putnam RW, Dean JB* (2007) Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol* 98(2): 1030–1041. <https://doi.org/10.1152/jn.01003.2006>
 24. *Ciarlone GE, Dean JB* (2016) Normobaric hyperoxia stimulates superoxide and nitric oxide production in the caudal solitary complex of rat brain slices. *Am J Physiol Cell Physiol* 311(6): C1014–C1026. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00160.2016>
 25. *Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD* (1992) Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9715–9719. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9715>
 26. *Arai M, Takata K, Takeda Y, Mizobuchi S, Morita K* (2011) The excitement of multiple noradrenergic cell groups in the rat brain related to hyperbaric oxygen seizure. *Acta Med Okayama* 65(3): 163–168. <https://doi.org/10.18926/AMO/46627> PMID: 21709713
 27. *Fitzgerald PJ* (2010) Is elevated norepinephrine an etiological factor in some cases of epilepsy? *Seizure* 19(6): 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.04.011>
 28. *Finberg JP* (2014) Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol Ther* 143(2): 133–152. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.02.010>
 29. *Demchenko IT, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Piantadosi CA, Allen BW* (2011) Autonomic activation links CNS oxygen

- toxicity to acute cardiogenic pulmonary injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300(1): L102–111. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00178.2010>
30. Adachi YU, Watanabe K, Hideyuki Higuchi H, Tetsuo Satoh T, Vizi ES (2001) Oxygen inhalation enhances striatal dopamine metabolism and monoamineoxidase enzyme inhibition prevents it: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 422(1-3): 61–68. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01074-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01074-3)
31. Cho HU, Kim S, Sim J, Yang S, An H, Nam MH, Jang DP, Lee CJ (2021) Redefining differential roles of MAO-A in dopamine degradation and MAO-B in tonic GABA synthesis. *Exp Mol Med* 53(7): 1148–1158. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00646-3>
32. Pacia SV, Doyle WK, Broderick PA (2001) Biogenic amines in the human neocortex in patients with neocortical and mesial temporal lobe epilepsy: identification with in situ microvoltammetry. *Brain Res* 899(1-2): 106–111. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02214-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02214-4)
33. Lavoute C, Weiss M, Risso JJ, Rostain JC (2014) Alteration of striatal dopamine levels under various partial pressure of oxygen in pre-convulsive and convulsive phases in freely-moving rats. *Neurochem Res* 39(2): 287–294. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1220-z>
34. Gorkin VZ (1985) Studies on the nature and specific inhibition of monoamine oxidases. In *Neuropharmacology 85* (eds. Kelemen K, Magyar K, Vizi ES). Akademiai Kiado, Budapest 9–14.
35. Hess DT, Stamler JS (2012) Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* 287(7): 4411–4418. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.285742>

MECHANISMS OF MONOAMINE OXIDASE INVOLVEMENT IN THE DEVELOPMENT OF HYPERBARIC OXYGEN SEIZURES

S. Yu. Zhilyaev^a, I. N. Basova^a, T. F. Platonova^a, O. S. Alekseeva^{a, #},
N. A. Gavrishva^b and I. T. Demchenko^a

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

^b *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: osa72@inbox.ru*

Hyperbaric oxygen (HBO₂) breathing induces generalized tonic and clonic seizures through poorly understood mechanisms. The purpose of the research was to evaluate the mechanisms of involvement of monoamine oxidase (MAO) in the development of hyperbaric oxygen convulsions. In rats placed in a pressure chamber under an oxygen pressure of 5 ATA, convulsive reactions were analyzed after the administration of pyrazidol, an MAO-A inhibitor, and pargyline, an MAO-B inhibitor. Studies have shown a decrease in the activity of MAO isoforms in HBO₂ as well as a delay in the development of seizures in animals with inhibition of MAO-A and MAO-B. The level of GABA in the brain decreased with HBO₂, and inhibition of MAO-B with pargyline prevented the decrease in the inhibitory transmitter. The results indicate that MAO isoforms play an important role in regulating epileptogenesis in extreme hyperoxia. Hyperbaric oxygen, inhibiting the catalytic activity of MAO by transforming its molecular structure, leads to disruption of the regulation of the exchange of monoamine neurotransmitters and a decrease in the level of GABA in the brain, which together leads to an imbalance of excitation/inhibition processes in the central nervous system, which is the basis for the development of oxygen epilepsy.

Keywords: hyperbaric oxygen, convulsions, adrenergic system, monoamine oxidase, pyrazidol, pargyline

НЕОНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ДЕФИЦИТ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С НАРУШЕНИЯМИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

© 2024 г. Е. И. Тюлькова*, В. А. Стратилов, О. В. Ветровой

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

* e-mail: etyulkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.07.2024 г.

После доработки 06.08.2024 г.

Принята к публикации 06.08.2024 г.

Было проведено исследование концентрации адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортикостерона и серотонина в плазме крови ювенильных и взрослых крыс, а также поведения в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” и уровня серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс, подвергавшихся трем сеансам гипобарической гипоксии (360 мм.рт.ст. 2 ч) на 8–10-е сутки после рождения. Эта неинвазивная модель неонатальной гипоксии (НГ) на крысах моделирует перинатальную гипоксическую травму средней тяжести у плодов и недоношенных детей. В тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” 3-месячные НГ крысы показали снижение исследовательской активности и повышение тревожности, что сопровождалось снижением уровня серотонина в Ядрах Шва этих животных. В плазме крови взрослых крыс, подвергавшихся НГ, не было выявлено изменений уровня кортикостерона и серотонина, однако содержание АКТГ было достоверно ниже по отношению к контролю. Таким образом, показано, что гипоксический стресс в раннем постнатальном онтогенезе крыс приводит к перестройкам серотониновой системы мозга, модификации гипоталамо-гипофизарно адренокортикальной системы (ГГАС) и, как следствие, к длительным изменениям поведения.

Ключевые слова: крысы, неонатальная гипоксия, глюкокортикоидная система, серотонинергическая система, поведение

DOI: 10.31857/S0044452924050079, EDN: XPCSUR

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных проблем современной перинатологии является гипоксически-ишемическая энцефалопатия. Чаще всего это заболевание встречается у новорожденных детей с перинатальной асфиксией. За последние 30 лет количество преждевременных родов увеличилось на 20%. Недоношенный ребенок прежде всего подвергается гипоксическим воздействиям вследствие недоразвития легких [1]. В процессе родов обвитие пуповиной или аномальная амниотическая жидкость могут вызвать дистресс плода, асфиксию и гипоксию. Гипоксия-ишемия нарушает формирование центральных двигательных путей новорожденного и может повлиять на нормальное развитие пластичности мозга [2]. Повышенная восприимчивость перивентрикулярного белого вещества к гипоксии-ишемии у недоношенных детей также предрасполагает к двигательному, когнитивному и сенсорному дефициту. Считается, что когнитивные

нарушения и атипичное развитие мозга являются последствиями преждевременных и/или отягощенных родов.

7–10-й послеродовые дни у грызунов (крысы, мыши) с точки зрения этапа развития мозга совпадают с наиболее распространенными сроками недоношенной беременности человека. Аналогично человеческому плоду на 34 неделе беременности у грызунов в семидневном возрасте рост мозга достигает пика и начинается кортикальная миелинизация [3]. В это время завершаются запрограммированные гистогенетические процессы пролиферации, миграции и дифференцировки всех структурных элементов нервной ткани. Происходит становление и упорядочение слоев неокортекса, активно протекают синаптогенез и ангиогенез. Наиболее часто используемой на сегодняшний день моделью гипоксически-ишемической энцефалопатии является модель Райса-Вануцци [4, 5], которая включает два этапа: перевязку правой общей сонной артерии и последующее воздействие гипоксической

смесью газов. Эта модель, имитирующая неонатальную гипоксию-ишемию, приводит к неврологическим расстройствам, которые подтверждаются серией поведенческих оценок, таких как оценка Zea-Longa, оценка неврологической тяжести, тест водного лабиринта Морриса, тест Y-лабиринта, тест ротарода и тест отрицательного геотаксиса [6]. Не всегда недоношенная беременность сочетается с травматическими повреждениями мозга, однако практически все недоношенные дети испытывают гипоксию различной степени тяжести, что также может повлечь “перепрограммирование” развития мозга. Поэтому кроме модели Райса-Вануцци используются и чисто гипоксические воздействия в ранний неонатальный период. Применение гипоксии в период от 6 до 12 дней после рождения, являющийся критическим периодом для развития мозга (период созревания синапсов) и уязвимости к гипоксическим воздействиям, может приводить к различным расстройствам [7, 8]. Эта модель может воспроизводить последствия хронической или повторяющейся гипоксии, которая может возникать при определенных клинических состояниях, таких как хронические заболевания легких у недоношенных детей или апноэ во сне. Физиологические и патологические процессы, которые призваны воспроизвести эта модель, могут включать в себя воздействие повторяющейся гипоксии на развитие мозга, повреждение нейронов и потенциальный долгосрочный неврологический дефицит. Модель может быть применима для изучения таких состояний, как перинатальная асфиксия и другие неонатальные травмы головного мозга, связанные с гипоксией [7, 8].

Переменяющаяся гипоксия в первые дни после рождения является распространенным стрессором у недоношенных новорожденных [9]. Неонатальные стрессоры могут оказывать долгосрочное программирующее/перепрограммирующее воздействие на развивающийся мозг, и последствия таких перестроек могут сохраниться у взрослых. Было показано, что воздействие гипобарической гипоксии в раннем неонатальном периоде (первые сутки после рождения) приводит к более выраженным нарушениям исследовательского поведения и когнитивному дефициту и модификации дофаминергической системы, чем нормобарической гипоксии [10, 11]. Мы предположили, что интервальная гипобарическая гипоксия на 8–10-е сутки постнатального онтогенеза может вызывать стрессовую реакцию и изменять активность глюкокортикоидной системы ювенильных и взрослых крыс. Целью данного исследования было изучение последствий предъявления крысам неонатального гипоксического (НГ) воздействия на 8–10-е сутки после рождения (сеансы гипобарической гипоксии

360 мм рт ст на 2 ч трехкратно через 24 ч) на концентрации АКТГ, кортикостерона и серотонина в плазме крови ювенильных и взрослых крыс, а также поведение и уровень серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на животных из ЦКП “Биоколлекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. Павлова РАН. В работе были использованы взрослые беременные самки крыс линии Вистар в возрасте 12–13 недель и массой 220–250 г и их потомство.

Перед рождением потомства беременных крыс рассаживали по отдельным клеткам, и в дальнейшем каждый помет содержался отдельно. После отъема крыс-самцов помещали в клетки размером 60 × 30 × 20 см, по 6 животных в каждой. Каждая группа крыс состояла из случайно отобранных крысят, родившихся от разных матерей, чтобы свети к минимуму неравномерность помета. Крысы получали пищу (сухой корм производства завода комбикормов в г. Тосно Ленинградской области) и воду в неограниченном количестве и содержались по циклу темнота–свет 12:12 ч при комнатной температуре с постоянной влажностью около 60%.

Последующая работа производилась на детенышах самцах. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Половину крысят подвергали трем сеансам гипобарической гипоксии (неонатальная гипок-

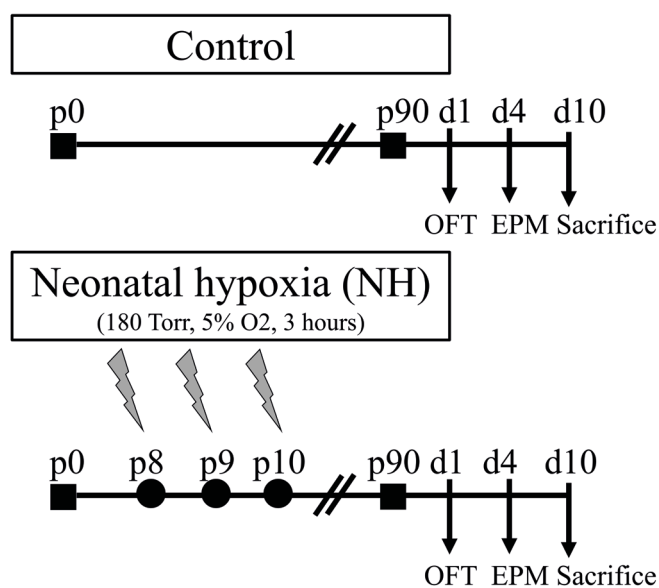


Рис. 1. Дизайн исследования. NH, неонатальная гипоксия; p0, день рождения; p8, p9, p10, постнатальные дни; d1, d4, d10, дни эксперимента; OFT, тест “открытое поле”, EPM, “приподнятый крестообразный лабиринт”.

сия, НГ). Для создания НГ на 8, 9 и 10-е сутки постнатального периода крысят помещали в барокамеру проточного типа и снижали давление до 360 мм.рт.ст., что соответствует 10% нормобарического кислорода. Длительность каждого воздействия 2 ч, интервал между воздействиями 24 ч. После каждого воздействия крысят возвращали в материнскую клетку. С целью стандартизации условий контрольных животных также помещали в барокамеру по аналогичному протоколу, но не снижали давление. Ранее эта модель была использована нами для проверки гипотезы возможного “перепрограммирования” последствий пренатальной гипоксии на 14–16-е сутки беременности [12].

С помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа определяли концентрацию адренкортикотропного гормона (АКТГ) (ab263880, Abscam, Великобритания), кортикостерона (АС-14F1, Хема, Россия) и серотонина (ab133053, Abscam, Великобритания) в сыворотке артериальной крови 2-недельных и 3-месячных контрольных и НГ крыс. Для определения концентрации серотонина в Ядрах Шва 3-месячных контрольных и НГ крыс декапитуировали и извлекали Ядра Шва. Далее осуществляли выделение цитозольной фракции при помощи набора Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit (78833, NEPERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Scientific, США). Концентрацию серотонина в цитозольной фракции Ядер Шва измеряли при помощи коммерческого набора для иммуноферментного анализа (ab133053, Abscam, Великобритания), нормируя данные на концентрацию общего белка, измеренную при помощи набора Pierce™ Rapid Gold BCA (Thermo Scientific, США). Все работы проводили в соответствии с инструкциями производителей, а колориметрические измерения осуществляли при помощи планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, BMG Labtech, Германия).

Поведение взрослых 3-месячных контрольных и НГ крыс оценивали в тестах “открытое поле” (исследовательская активность) и “приподнятый крестообразный лабиринт” (тревожность). Тестирование животных проводилось в первой половине дня (с 10 ч. утра) в месте, изолированном от шума.

Тест “открытое поле” (“Open Science”, Россия) проводился на круглой арене (диаметр 97 см, высота стенок 42 см). Поверхность арены в периферийной зоне была разделена на двенадцать секций, а в центральной зоне – на семь секций. Центральная зона находилась при ярком освещении (100–120 люкс). Каждую крысу помещали в центр арены. Установленная на потолке камера фиксировала движения крыс. Общее количество поперечных сечений в периферической (периферическая активность) и центральной зоне (центральная активность), ко-

личество стоек (вертикальная активность), а также количество актов исследования отверстий (норы) и время, затраченное на груминг, измеряли в течение 5 мин.

“Приподнятый крестообразный лабиринт” (“Open Science”, Россия) (120 × 120 × 40 см, высота над полом 1 м) состоял из четырех приподнятых рукавов. Рукава были расположены крестообразно: два противоположных рукава были окружены стенками высотой 50 см (закрытые рукава), а два других рукава были без стенок (открытые рукава). Четыре плеча соединялись центральной платформой прямоугольной формы (10 × 10 см). И центральная платформа, и открытые рукава находились при ярком освещении (100–120 люкс), а закрытые рукава – при слабом освещении (30 люкс). Каждую крысу помещали на центральную платформу мордой к открытому рукаву. Установленная на потолке камера фиксировала движения крыс. Время, проведенное в закрытых и открытых рукавах, время, проведенное на центральной платформе (центральная активность), количество свешиваний с открытых рукавов, количество переходов между закрытыми рукавами и время, затрачиваемое на груминг, измеряли в течение 5 мин.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы GraphPad Prism 10. Для оценки нормальности распределений использовался тест Шапиро–Уилка ($p > 0.05$) и диаграмма QQ-plot. Гомоскедастичность оценивалась критерием Фишера. В качестве параметрического теста использовался t тест Стьюдента ($p < 0.05$), а в случае гетерогенности выборок использовался тест Уелша ($p < 0.05$). Данные для нормальных распределений представлены как средние \pm SEM. В качестве непараметрического теста использовался U критерий Манна–Уитни ($p < 0.05$), а данные представлены диаграммами box plot.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние неонатальной гипоксии на гормональные показатели крови ювенильных и взрослых крыс

НГ привела к достоверному снижению концентрации АКТГ в сыворотке крови как ювенильных 2-недельных (рис. 2а, $p = 0.018$, Welch’s t -test), так и взрослых 3-месячных крыс (рис. 2д, $p = 0.05$, Welch’s t -test). При этом, ни у 2-недельных, ни у 3-месячных НГ крыс снижение концентрации АКТГ не оказывало влияние на концентрацию кортикостерона (рис. 2б, е). Кроме того, при исследовании концентрации серотонина в сыворотке крови нами также не обнаружено различий между контрольными и НГ ювенильными и взрослыми животными (рис. 2с, ф).

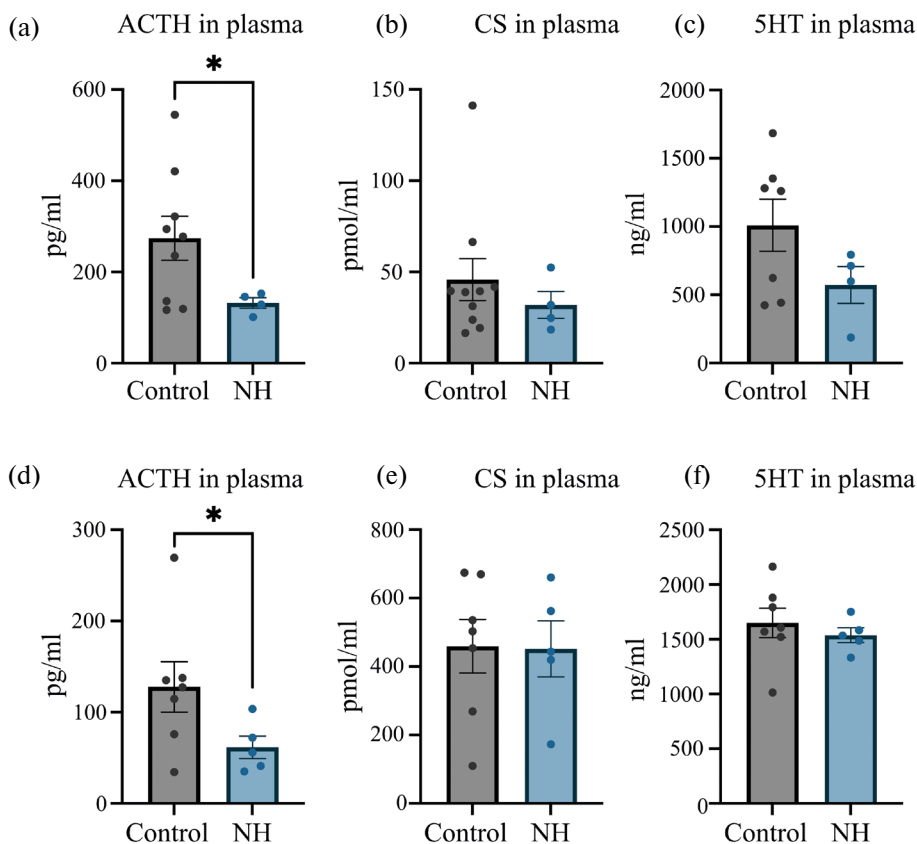


Рис. 2. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на концентрацию АКТГ (ACTH) (a, d), кортикостерона (CS) (b, e) и серотонина (5HT) (c, f) в сыворотке крови 2-недельных (a–c) и 3-месячных (d–f) крыс.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Welch's t-test), $n = 5-7$.

*Влияние неонатальной гипоксии
на концентрацию серотонина
в Ядрах Шва взрослых крыс*

При исследовании концентрации серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс нами показано достоверное снижение концентрации этого нейромедиатора (рис. 3, $p = 0.03$, Mann-Whitney test).

*Влияние неонатальной гипоксии на поведение
взрослых крыс в тестах “открытое поле”
и “приподнятый крестообразный лабиринт”*

Сравнительный анализ поведения в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” выявил существенные различия между контрольными и НГ крысами (рис. 4, рис. 5).

Так в тесте “открытое поле” НГ крысы демонстрировали достоверно сниженную периферическую (рис. 4a, $p = 0.008$, Student's t-test), центральную (рис. 4b, $p = 0.006$, Mann-Whitney test) и вертикальную активность (рис. 4c, $p = 0.05$, Student's t-test) по сравнению с контрольными животными. Различий в количестве исследуемых ножек или времени, потраченном на груминг между

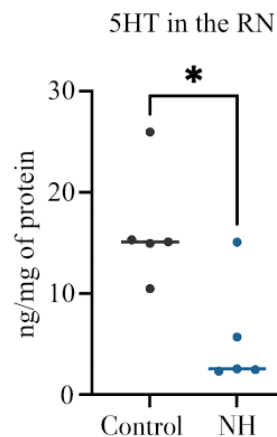


Рис. 3. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на концентрацию серотонина (5HT) в Ядрах Шва (RN) 3-месячных крыс.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test), $n = 5$.

контрольными и НГ животными не выявлено (рис. 4d, рис. 4e).

В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” НГ крысы отличались достоверным снижением времени, проведенным в открытых рукавах

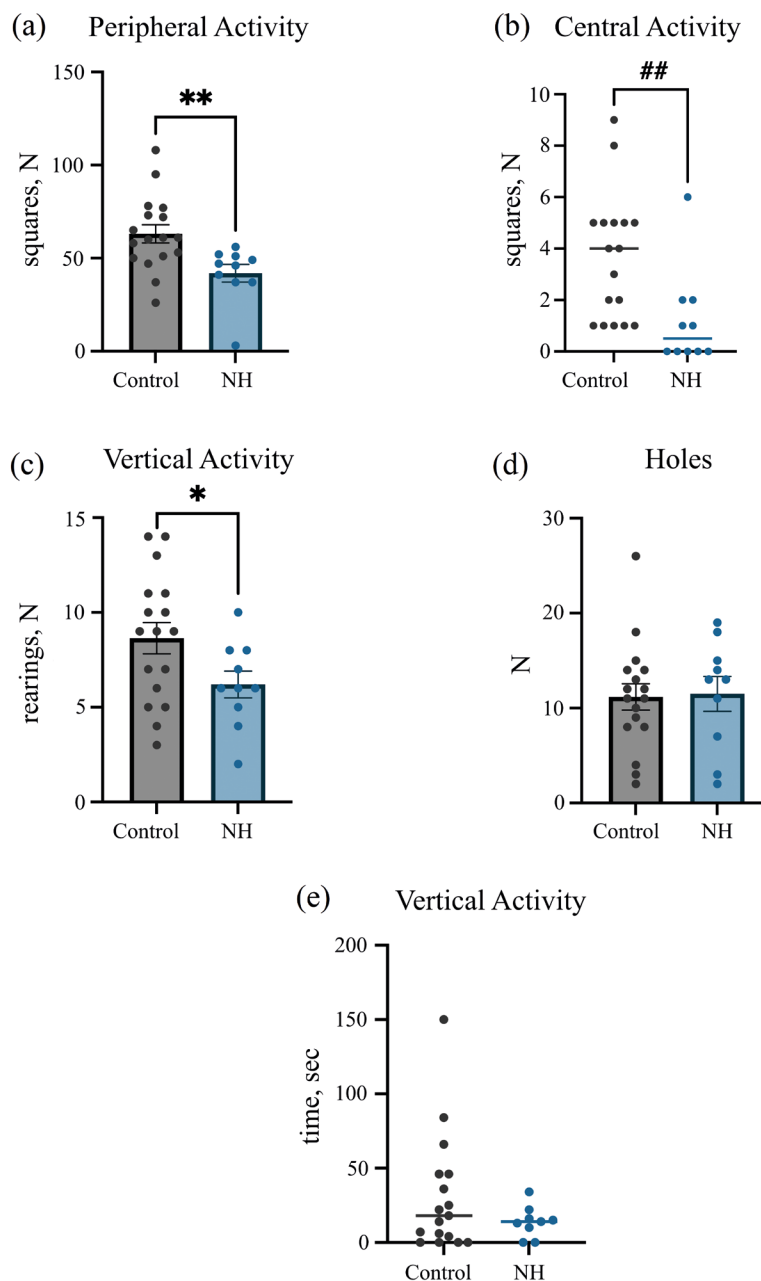


Рис. 4. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на количество поперечных сечений в периферической зоне (периферическая активность) (a), центральной зоне (центральная активность) (b), количество стоек (вертикальная активность) (c), количество актов исследования отверстий (норы) (d) и время груминга (e) у взрослых крыс в тесте “открытое поле”.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Student’s t-test); ** $p < 0.01$ (Student’s t-test); ## $p < 0.01$ (Mann-Whitney test), $n = 10-17$.

(рис. 5a, $p = 0.005$, Mann-Whitney test) и увеличением времени, проведенного в закрытых рукавах (рис. 5b, $p = 0.04$, Student t-test). Кроме того, НГ крысы демонстрировали меньшее количество свешиваний с открытых рукавов по сравнению с контролем (рис. 5e, $p = 0.02$, Mann-Whitney test), но не отличались по времени нахождения на центральной платформе (рис. 5c), количеству переходов

между рукавами (рис. 5d) и времени, затраченном на груминг (рис. 5f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипоксия в пре- и неонатальном периодах может приводить к нарушениям развития центральной нервной системы, что влечет за собой и изменения поведения, которые зависят не только от типа и ин-

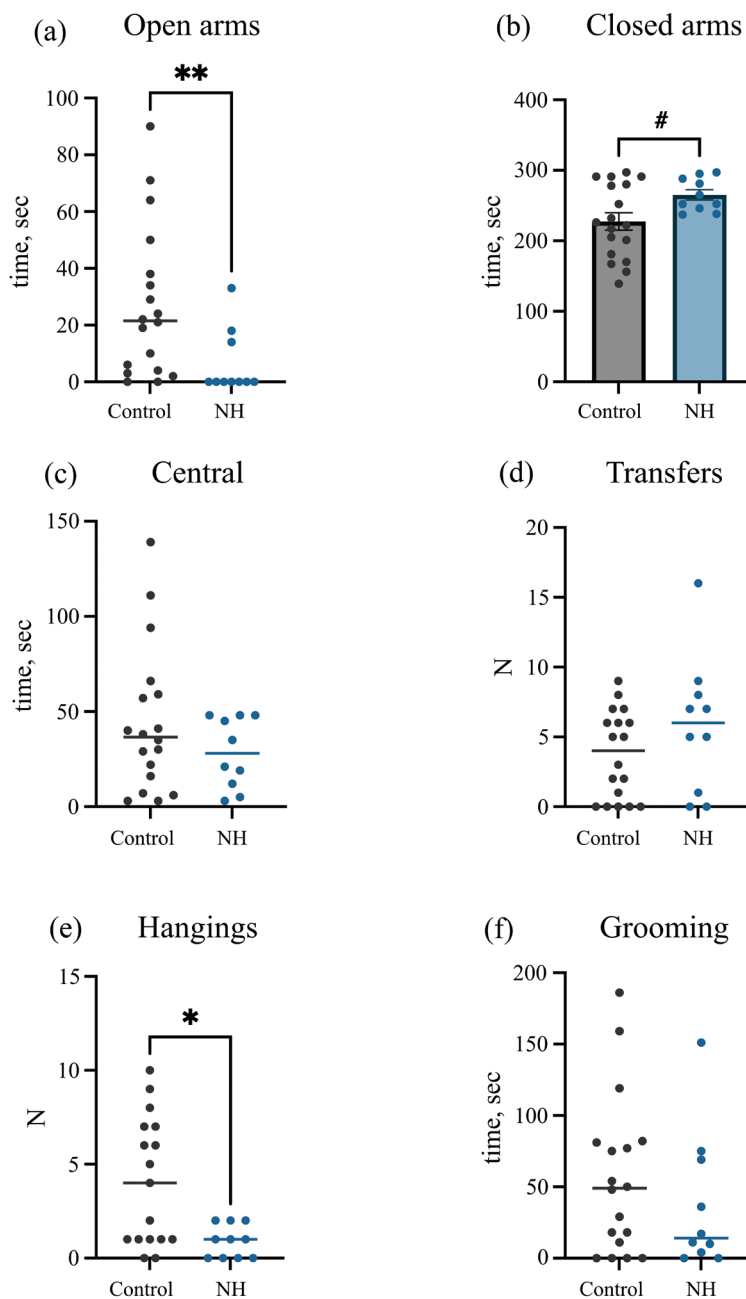


Рис. 5. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на время, проведенное в и открытых рукавах (а), закрытых рукавах (б), центральной платформе (с), количество переходов между закрытыми рукавами (д), свешиваний с открытых рукавов (е) и время груминга (ф) взрослых крыс в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test); ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney test), # $p < 0.05$ (Student’s t-test), $n = 10-17$.

тенсивности гипоксии /стресса, но и от периода развития, в котором они происходят.

В этой работе мы провели исследование поведения взрослых крыс после воздействия гипобарической гипоксии на 8–10-е сутки постнатального онтогенеза и попытались оценить вклад серотониновой системы и нарушений/модификации работы гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной

системы (ГГАС). Тесты “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” активно применяются для оценки уровня тревожности и исследовательской активности животных в незнакомой обстановке. Поэтому в настоящей работе было сочтено целесообразным использовать эти тесты для исследования особенностей поведения взрослых крыс, переживших гипоксию на 8-10-е

сутки постнатального онтогенеза. Как оказалось, даже умеренное гипоксическое воздействие на 8–10-е сутки постнатального онтогенеза приводит к изменению поведения взрослых крыс, а именно повышению уровня тревожности и снижению ориентировочно-исследовательского поведения. Экспериментальные животные выглядели более пассивными по сравнению с контрольными – сниженная двигательная активность на периферии в “открытом поле”, уменьшение по сравнению с контролем выходов в центр поля и количества стоек. Похожий тип поведения был показан в работе, в которой авторы предъявляли крысам с 7-го по 14-й постнатальные дни нормобарическую гипоксию (7% кислорода и 93 % азота), что привело во взрослом возрасте также к снижению двигательной активности и уменьшению количества стоек [8]. В нашем исследовании аналогичные особенности поведения прослеживаются и в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” – уменьшение времени пребывания в открытых рукавах и увеличение в закрытых, снижение числа свешиваний. Похожие результаты были получены нами ранее при исследовании поведения взрослых крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии на 14–16-е сутки гестации [13, 14]. Нарушения ориентировочно-исследовательского и тревожного поведения могут быть обусловлены изменениями функциональной активности нейронов в результате воздействия гипоксии в перинатальном периоде развития, что подтверждается сниженным уровнем серотонина в Ядрах Шва у этих животных.

Гипоксия является распространенным неонатальным стрессом, приводящим к значительному краткосрочному дистрессу и долгосрочным осложнениям [15]. Успешная адаптация к неонатальной гипоксии требует скоординированной физиологической реакции, включая увеличение высвобождения глюкокортикоидов из коры надпочечников [16]. Мы предположили, что неонатальное воздействие умеренной гипоксии, так же, как и гипоксия/стресс в пренатальном периоде, приведет к изменениям активности ГГАС у взрослых крыс. Действительно, было показано, что и у ювенильных (2-недельных), и у взрослых (3-месячных) НГ крыс уровень АКТГ в плазме крови достоверно ниже, чем у контрольных животных, однако уровень кортикоостерона и серотонина не отличается от контрольного уровня. Влияние гипоксии в перинатальном периоде на развитие ГГАС хорошо известно. В ряде работ было показано, что реакция гипофиза и коры надпочечников на гипоксию существенно различается на разных этапах онтогенеза [17, 18]. Так концентрация АКТГ в плазме крови после неонатальной нормобарической гипоксии (8%) значительно выше у крысят в возрасте 8 суток, чем у 2-дневных,

а у детенышей в возрасте 5 суток уровень АКТГ не коррелирует с концентрацией кортикоостерона. Авторы предполагают, что 5 суток после рождения – это критический период, в течение которого формируется прямая зависимость продукции глюкокортикоидов надпочечниками от поступающего АКТГ [17, 18]. Ключевым компонентом реакции на гипоксию является адреномедулярная выработка катехоламинов, обусловленная системными (например, сердечно-сосудистыми) эффектами и местным стимулирующим воздействием на функцию коры надпочечников [19–22]. Развитие путей спинномозговой иннервации мозгового вещества и коры надпочечников завершается к возрасту 8 суток [23]. Адреномедулярные хромоаффинные клетки в неонатальном периоде обладают клеточным механизмом активации синтеза и высвобождения катехоламинов в ответ на снижение кислородного снабжения [24]. При этом после 8 суток постнатального онтогенеза у крыс этот механизм перестает проявляться [25]. Повышенный уровень АКТГ и АКТГ-зависимого уровня кортикоостерона на 8-е сутки после рождения в этой модели позволяет регулировать повышенный базальный уровень кортикоостерона и активность ГГАС.

В наших экспериментах применялась гипоксия (360 мм.рт.ст 10% кислорода 3 раза по 2 ч с 24 чперерывом). Мы определяли уровень АКТГ через 4 суток после последнего сеанса гипоксии/стресса, т.е. на 14-е сутки после рождения, и у взрослых самцов. Выявленное стабильное снижение уровня АКТГ в результате НГ, вероятно, представляет собой результат “перепрограммирования” ГГАС, направленного на дальнейшее поддержание нормального уровня кортикоостерона у этих животных в течение дальнейшей жизни. В свою очередь, в модели пренатальной гипоксии тревожное поведение крыс было обусловлено стрессом матери во время беременности, нарушающим эффективность глюкокортикоидной отрицательной обратной связи через снижение экспрессии экстрагипоталамических глюкокортикоидных рецепторов в мозге потомства на протяжении всей жизни [14, 26]. Таким образом, предъявление гипоксического воздействия в пре- и постнатальном онтогенезе приводят к изменению уровня тревожности, которые обусловлены различными модификациями глюкокортикоидной системы.

В наших предыдущих работах было показано, что в Ядрах Шва взрослых крыс, подвергавшихся тяжелому гипоксическому воздействию на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза уровень серотонина не отличался от контрольного [26]. Однако, в модели НГ установлено, что несмотря на то, что уровень серотонина в плазме крови экспериментальных животных не отличается от контрольного, содержание серотонина в Ядрах Шва взрослых

крыс, подвергавшихся НГ достоверно ниже, чем у контрольных. Существующее общее мнение о роли биогенных аминов в патофизиологии психологических расстройств, говорит о том, что депрессия, мания и тревожные расстройства связаны со снижением уровня серотонина в ЦНС [27, 28]. Сниженный уровень серотонина объясняет проявления угнетенного эмоционального состояния этих животных.

Таким образом, неонатальная гипоксия в возрасте 8–10 суток постнатального онтогенеза крыс вызывает существенные изменения активности ГГАС и серотониновой системы, что отражается в снижении исследовательского поведения и повышении тревожности во взрослом возрасте.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.И.Т.), сбор данных (В.А.С., О.В.В.), обработка данных (В.А.С., О.В.В.), написание и редактирование манускрипта (Е.И.Т., В.А.С., О.В.В.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протокол исследования рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом Института физиологии им. Павлова (протокол № 08/02 от 02.08.2022).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы исследования декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beverdorf DQ, Stevens HE, Jones KL* (2018) Prenatal Stress, Maternal Immune Dysregulation, and Their Association with Autism Spectrum Disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 20(9):76. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0945-4>
2. *Rocha-Ferreira E, Hristova M* (2016) Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. *Neural Plast* 72016:2016:4901014. <https://doi.org/10.1155/2016/4901014>
3. *Bennet L, Tan S, Van den Heuvel L, Derrick M, Groenendaal F, van Bel F, Juul S, Back SA, Northington F, Robertson NJ, Mallard C, Gunn AJ* (2012) Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Ann Neurol* 71: 589–600. <https://doi.org/10.1002/ana.22670>
4. *Rice JE3rd, Vannucci RC, Brierley JB* (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
5. *Yager JY, Ashwal S* (2009) Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 40: 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.10.025>
6. *Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Nett CA* (2003) Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973: 171–178. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02436-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02436-3)
7. *Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z* (2017) Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci* 11:78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
8. *Bakhtazad S, Ghotbeddin Z, Tabandeh MR, Rahimi K* (2024) Alpha-pinene ameliorate behavioral deficit induced by early postnatal hypoxia in the rat: study the inflammatory mechanism. *Sci Rep* 14(1):6416. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56756-1>
9. *Hermansen CL, Lorah KN* (2007) Respiratory distress in the newborn. *Am Fam Physician* 76: 987–994.
10. *Trnski S, Nikolić B, Ilic K, Drlje M, Bobic-Rasonja M, Darmopil S, Petanjek Z, Hranilovic D, Jovanov-Milosevic N* (2022). The signature of moderate perinatal hypoxia on cortical organization and behavior: altered PNN-Parvalbumin interneuron connectivity of the cingulate circuitries. *Front Cell Dev Biol* 10:810980. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.810980>
11. *Nikolic B, Trnski-Levak S, Kosic K, Drlje M, Banovac I, Hranilovic D, Jovanov-Milosevic N* (2024) Lasting mesothalamic dopamine imbalance and altered exploratory behavior in rats after a mild neonatal hypoxic event. *Front Integr Neurosci* 17:1304338. <https://doi.org/10.389/fnint.2023.1304338>
12. *Ветровой ОВ, Стратилов ВА, Ломерт ЕВ, Тюлькова ЕИ* (2022) Оценка возможности коррекции нарушений глюкокортикоидной системы гиппокампа крыс, вызванных пренатальной гипоксией. *Нейрохимия* 39(3): 205–209 [Vetrovoy OV, Stratilov VA, Lomert EV, Tyulkova EI (2022) Possible correction of impairments to the glucocorticoid system of the rat hippocampus induced by prenatal hypoxia. *Neurochem J* 16(3): 228–232. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S1819712422030126>
13. *Стратилов ВА, Ветровой ОВ, Ватаева ЛА, Тюлькова ЕИ* (2021) Ассоциированные с возрастом изменения исследовательской активности в тесте “открытое поле” у крыс, переживших пренатальную гипоксию. *Журн высш нервн деят* 71(3): 428–436. [Stratilov VA, Vetrovoy OV, Vataeva LA, EI Tyulkova (2022) Age-Associated Changes in Exploratory Activity in the Open Field Test in Rats Surviving Prenatal Hypoxia. *Neurosci Behav Physiol* 52(2): 271–276. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044467721030102>
14. *Stratilov V, Potapova S, Safarova D, Tyulkova E, Vetrovoy O* (2024) Prenatal Hypoxia Triggers a Glucocorticoid-Associated Depressive-like Phenotype in Adult Rats,

- Accompanied by Reduced Anxiety in Response to Stress
Int J Mol Sci 25: 5902.
<https://doi.org/10.3390/ijms25115902>
15. Raff H, Jacobson L (2007) Glucocorticoid feedback control of corticotropin in the hypoxic neonatal rat. *J Endocrinol* 192(2):453–458.
<https://doi.org/10.1677/JOE-06-0103>
 16. Hanukoglu A, Fried D, Nakash I, Hanukoglu I (1995) Selective increases in adrenal steroidogenic capacity during acute respiratory disease in infants. *Europ J Endocrinol* 133: 552–556.
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1330552>
 17. Bruder ED, Taylor JK, Kamer KJ, Raff H (2008) Development of the ACTH and corticosterone response to acute hypoxia in the neonatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1195 – R1203.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.90400.2008>
 18. Chintamaneni K, Bruder ED, Raff H (2013) Effects of age on ACTH, corticosterone, glucose, insulin, and mRNA levels during intermittent hypoxia in the neonatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304: R782–R789.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00073.2013>
 19. Bodnar M, Sarrieau A, Deschepper CF, Walker CD (1997) Adrenal vasoactive intestinal peptide participates in neonatal corticosteroid production in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R1163–R1172.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.3.R1163>
 20. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez J, Holst JJ, Waterman MR, Scherbaum WA (1995) Sympathoadrenal regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Res* 21: 13–24.
<https://doi.org/10.3109/07435809509030417>
 21. Schinner S, Bornstein SR (2005) Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol* 16: 91–98.
<https://doi.org/10.1385/ep:16:2:091>
 22. Seidler FJ, Slotkin TA (1985) Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* 358: 1–16.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015536>
 23. Engeland WC (1998) Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res* 30: 311–314.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-978890>
 24. Nurse CA, Buttigieg J, Thompson R, Zhang M, Cutz E (2006) Oxygen sensing in neuroepithelial and adrenal chromaffin cells. *Novartis Found Symp* 272: 106–114.
 25. Tin W (2004) Optimal oxygen saturation for preterm babies. Do we really know? *Biol Neonate* 85: 319–325.
<https://doi.org/10.1159/000078173>
 26. Vetrovoy O., Stratilov V., Lomert E., Tyulkova E (2023) Prenatal Hypoxia-Induced Adverse Reaction to Mild Stress is Associated with Depressive-Like Changes in the Glucocorticoid System of Rats. *Neurochem Res* 48: 1455–1467.
<https://doi.org/10.1007/s11064-022-03837-0>
 27. Kandel E (2001) Depression, mania and anxiety disorders. In *Principles of Neural Science*, 4th edn. Eds E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell, pp. 1209–1225. McGraw-Hill, New York.
 28. Mitroshina EV, Marasanova EA, Vedunova MV (2023) Functional Dimerization of Serotonin Receptors: Role in Health and Depressive Disorders. *Int J Mol Sci* 24(22): 16416.
<https://doi.org/10.3390/ijms2422>

NEONATAL HYPOXIA INDUCES BEHAVIORAL DEFICIT ASSOCIATED WITH IMPAIRMENT IN THE GLUCOCORTICOID AND SEROTONERGIC SYSTEMS IN ADULT RATS

E. I. Tyulkova[#], V. A. Stratilov and O. V. Vetrovoy

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

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

We investigated the behavioral responses, raphe serotonin levels, and serum concentrations of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone, and serotonin in adult rats subjected to three sessions of hypobaric hypoxia (360 mmHg, 2 hours each) within 8–10 days post-partum. This non-invasive rat model of neonatal hypoxia (NH) simulates mild perinatal hypoxic trauma in fetuses and premature infants. At 3 months of age, NH-exposed rats exhibited reduced exploratory behavior and increased anxiety in both the open field and plus maze tests. These behavioral changes were accompanied by decreased serotonin levels in the raphe nuclei. In the blood serum of adult NH-exposed rats, corticosterone and serotonin levels remained unaltered, while ACTH levels showed a significant decrease. Our findings suggest that early postnatal hypoxic stress disrupts the serotonin system and alters HPA axis function, leading to long-lasting behavioral changes.

Keywords: Rats, neonatal hypoxia, glucocorticoid system, serotonin system, behavior

ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АУДИОГЕННЫХ СУДОРОГ И ПОСТИКТАЛЬНОЙ КАТАЛЕПСИИ У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ: ВЛИЯНИЕ ДИЗОЦИЛПИНА И D-СЕРИНА

© 2024 г. Н. М. Сурина^{1,*}, И. Б. Федотова¹, И. И. Полетаева¹

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, Москва, Россия;

*e-mail: Opera_ghost@inbox.ru

Поступила в редакцию 14.07.2024 г.

После доработки 01.09.2024 г.

Принята к публикации 02.09.2024 г.

Анализировали участие глутаматергической нейротрансмиттерной системы (введение D-серина и дизоцилпина) в формировании аудиогенного судорожного припадка (АП) и после-судорожной катаlepsии (АПК) у крыс линии Крушинского-Молодкиной. У интактных крыс КМ интенсивность АП коррелирует с длительностью АПК. Введение D-серина (острое (однократное) введение, дозы 200, 400 и 600 мг/кг, хроническое введение – 5 дней по 300 мг/кг, $n = 34$) не оказало статистически значимого воздействия на АП и АПК. Дизоцилпин (МК-801, неконкурентный NMDA-антагонист) вводили однократно в дозах 0.1, 0.2 и 0.4 мг/кг ($n = 41$). МК-801 дозозависимо снизил интенсивность АП и вызвал у большинства животных “двухволновый паттерн” судорог, купировал АПК при меньшей дозе, чем судороги АП. АПК полностью отсутствовала уже при дозе 0.2 мг/кг, в то время как клонический компонент АП еще сохранялся. Таким образом, удалось показать “диссоциацию” АП и АПК. Предполагается, что хотя развитие АПК осуществляется под контролем дофаминергической нейромедиаторной системы, в ее экспрессии задействована также и глутаматергическая нейротрансмиссия.

Ключевые слова: аудиогенная эпилепсия, постиктальная катаlepsия, дизоцилпин, D-серин, глутаматергическая нейротрансмиссия, дофамин, крысы линии Крушинского-Молодкиной

DOI: 10.31857/S0044452924050081, EDN: XOUFEG

ВВЕДЕНИЕ

Клонико-тонический судорожный припадок при аудиогенной эпилепсии (АЭ) у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), начинается через 1–2 с после включения звука, с переходом в тоническую фазу припадка на 5–10 с. После выхода из аудиогенного припадка (АП) у крыс КМ развивается катаlepsическое состояние с характерным мышечным тонусом – “восковой гибкостью” – и арефлексией длительностью от 5 до 60 мин. Подобная аудиогенная постиктальная катаlepsия (АПК) наблюдается у крыс Вистар с АЭ, а также у черно-капюшонных крыс, селективированных на АЭ из популяции крыс Лонг-Эванс [1], однако у крыс этих групп АПК была выражена слабее.

Ранее было показано, что и выраженность, и длительность АПК у крыс разных генотипов зависели от интенсивности предшествующего припадка

АЭ [1]. Введение кофеина (антагониста аденозиновых рецепторов) крысам линии “0”, селективированной на отсутствие судорожного припадка в ответ на звук, приводило к проявлению у них аудиогенных припадков (и АПК). Снижение интенсивности припадка АЭ в ответ на введение антиэпилептического препарата леветирацетама крысам линии КМ, сопровождалось снижением интенсивности АПК [1].

У крыс КМ дофаминергическая система также отличается от животных без АЭ [2–4]. Вне приступа АЭ, уровни дофамина и ДОФУК у крыс линии КМ были достоверно выше, чем у контрольных крыс Вистар. Этот факт был также подтвержден в экспериментах с прижизненным микродиализом – реакции нейронной системы стриатума крыс КМ и Вистар на введение амфетамина и раклоприда обнаружили достоверно разную динамику [5]. Развитие “нейролептической” катаlepsии сопровождается повышением уровней ДА и ДОФУК [5, 6]. Кроме того, нейролептическая катаlepsия развивается у крыс линии КМ при значительно меньших

Сокращения: АП – аудиогенный судорожный припадок, АЭ – аудиогенная эпилепсия, АПК – аудиогенная постиктальная катаlepsия, КМ – линия крыс Крушинского-Молодкиной.

дозах галоперидола, чем у крыс Вистар и Лонг-Эванс-селекция. Косвенным подтверждением измененного дофаминергического статуса крыс линии КМ является фоновая каталепсия у 32% животных [7].

Нами было выдвинуто предположение о том, что глутаматергическая и дофаминергическая системы базальных ганглиев (стриатума) при развитии АПК действуют взаимосвязанно. В связи с этим были проведены эксперименты с введением D-серина и МК-801 крысам КМ. D-серин – агонист глицинового стрихнин-нечувствительного модуляторного сайта, который ассоциирован с NMDA-рецептором [8]. Данные о взаимодействии D-серина с эффектами введения МК-801 противоречивы. D-серин не усиливал противосудорожного действия МК-801 при судорогах, вызванных электростимуляцией [9], однако совместно с саркозином (ингибитором обратного захвата глицина) он противодействовал противосудорожному эффекту МК-801 [10]. Проконвульсивное действие D-серина показано и на других моделях эпилепсии [11]. МК-801 (дизоцилпин, неконкурентный NMDA-антагонист), обладает противосудорожным эффектом, что было показано на крысах GEPR и при АП, вызванных метафитом [12, 13]. Известно, что МК-801 при введении в стриатум, в субталамическое ядро, или в ретикулярную часть черной субстанции предотвращает галоперидоловую каталепсию и каталептогенный эффект от хронического введения раклоприда и SCH 23390 [14, 15]. Иными словами, МК-801 обладает и антиконвульсивным действием и подавляет нейролептическую каталепсию. Обнаруженные в настоящей работе эффекты МК-801 могут предоставить информацию о связи развития АПК и судорог при АЭ у крыс линии КМ.

Целью настоящей работы было изучить роль глутаматергической нейромедиаторной системы мозга в проявлении аудиогенного судорожного припадка и постиктальной каталепсии крыс линии КМ, проанализировав эффекты таких препаратов, как D-серин и дизоцилпин, что будет сделано впервые.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Работа проведена на крысах-самцах инбредной линии КМ в возрасте 4 мес (лаборатория физиологии и генетики поведения, кафедра высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова). Число животных в сериях указано в таблицах 1 и 3 ($n = 100$). Крысы содержались в пластиковых клетках (46 x 30 x 16 см) по 6–7 животных в каждой со свободным доступом к воде и корму (фирма Лабораторкорм) с 12-часовым

световым режимом. Предварительной процедуры хэндлинга экспериментатором не проводилось.

Введение МК-801 в дозе 0.1 мг/кг представлено тремя экспериментальными группами крыс, т.к. результаты в этих группах не представляется возможным объединить в одну статистически.

Экспериментальные процедуры

Аудиогенная эпилепсия. Тестирование животных осуществляли в частично звукоизолированной пластиковой камере размером 40 x 30 x 50 см, интенсивность звука – 120 ± 2 дБ, звук оставляли включенным до максимального развития АП или, в случае его отсутствия, до 90 с (данное время выбрано экспериментально на основании данных по большой выборке животных) [1]. При этом вручную фиксировался латентный период (ЛП) начала припадка, его интенсивность, время наступления различных стадий и время “выхода из припадка” – когда животное становится двумя парами конечностей на опору. Предрасположенность к аудиогенной эпилепсии оценивали в условных баллах, где 0 – было отсутствие реакции, 1 – двигательное возбуждение (клонический бег), 2 – клонические судороги, 3 – клонико-тонические судороги, 4 – тонические судороги с экстензией конечностей. Отмечали также наличие или отсутствие “тормозной паузы” в фазе “клонического бега” (т.е. наличие двух “волн” двигательного возбуждения).

Тестирование каталепсии. После прекращения судорожного припадка животное тестировали на наличие АПК – передние лапы крысы осторожно приподнимали с помощью тонкого стержня, придавая животному вертикальную позу на задних лапках и фиксируя время сохранения этой позы. Тест повторяли трижды: 1) в первые пять минут после выхода из припадка, 2) с шестой по десятую минуту; 3) по истечении десятой минуты.

Фармакологические препараты. D-Серин – агонист глицинового сайта NMDA рецепторов (Sigma-ALDCH, Германия), вводили крысам КМ в/бр в дозах 200 мг/кг, 400 мг/кг и 600 мг/кг ($n = 34$).

Дизоцилпин – (МК-801), неконкурентный антагонист NMDA рецепторов (Sigma-ALDCH, Германия), вводили крысам КМ в/бр в дозах 0.1 мг/кг, 0.2 мг/кг и 0.4 мг/кг ($n = 41$).

Действие препаратов оценивали через 1 ч после введения. Разведение до необходимой концентрации производили дистиллированной водой.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью стандартного пакета программ Statistica 6.0. Учитывая малый размер экспериментальных групп, а также ненормальное распределение данных (проверка на нормальность проводилась с использованием критерия Колмогорова–Смирнова), использовались непараметри-

ческие критерии. Изменение показателей исследуемых групп по отношению к группе контроля оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Для оценки доли крыс демонстрирующих катаlepsию использовали угловой тест Фишера “φ” для оценки долей альтернативного признака.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффекты D-серина представлены в табл. 1 и 2. Хроническое введение D-серина (5 дней, в дозе 300 мг/кг) вызвало статистически незначимое (парадоксальное) ослабление интенсивности АП и увеличение его ЛП, что требует специального анализа. В то же время хроническое и острое введение D-серина увеличило долю животных, обнаруживших АПК, в более поздние периоды наблюдения, усилив и ее длительность, и интенсивность (данные различия были, однако, статистически незначимыми, т.к. статистически значимое усиление АПК, близкой по проявлению к 100%, было бы невозможным). Кроме того, при дозе D-серина 600 мг/кг у одного животного проявились миоклонические тикообразные судороги головы и конечностей. Хроническое введение D-серина (5 дней, доза 300 мг/кг) также вызвало у двух крыс тикообразные подергивания всего тела, а у одного животного обнаружилось затяжное двигательное возбуждение при выходе из припадка, что у крыс КМ в настоящий период селекции обнаруживается редко.

Эффекты дизоциллина (МК-801). В 1-й серии экспериментов ($n = 9$) введение 0.1 мг/кг МК-801

практически полностью устранило АПК, но мало изменило собственно АП, (см. табл. 3 и 4). Во 2-й и 3-й сериях ($n = 8$ и $n = 5$) введение МК-801 вызывало увеличение ЛП припадка и снижение его интенсивности, с появлением “двухволновых” реакций на звук. При этом ослабленная АПК наблюдалась у 22.2 % в первой серии и у 40% крыс в 3-й серии опытов, при полном отсутствии во второй. Эти различия в результатах можно объяснить различной чувствительностью животных к препарату в его “пороговой” дозе [16]. При более высокой дозе МК-801 (0.2 мг/кг) катаlepsия после АП отсутствовала полностью с сохранением судорожных компонентов АП (средний балл 2.3). При дозе 0.4 мг/кг введение МК-801 устраняло и судорожный компонент припадка. Установлено, что доза 0.4 мг/кг – относится к категории токсичных [16], что в наших экспериментах проявилось в виде нарушений мышечного тонуса, координации движений и появления двигательных стереотипий.

Таким образом, введение небольших доз МК-801 крысам линии КМ позволило наблюдать “диссоциацию” аудиогенного судорожного припадка и АПК, чего никогда не обнаруживали у интактных животных, а также не наблюдалось в столь выраженной форме при модуляции интенсивности АП другими фармакологическими препаратами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенности дофаминергической системы мозга у крыс КМ (выявленные, в частности, в

Таблица 1. Показатели аудиогенного судорожного припадка в контроле (К) и после введения D-серина у самцов крыс КМ

Группа, доза (мг/кг)	Доля чувств. жив., %	ЛП АП, с	Ср. балл АП	Доля “двухв.” жив, %	Время выхода из припадка, с
К, $n = 25$	100	1.4±0.1	4.0±0.0	0	129.4±8.8
D-серин, 200, $n = 7$	100	1.4±0.3	4.0±0.0	0	160.3±17.3
D-серин, 400, $n = 5$	100	1.4±0.3	3.8±0.1	0	128.8±6.3
D-серин, 600, $n = 10$	100	2.9±1.1	3.8±0.2	0	179.1±17.8
D-серин, 300 хрон, $n = 12$	100	3.0±0.8	3.4±0.5	0	168.4±22.7

n – число животных

Таблица 2. Постиктальная катаlepsия в контроле (К) и после введения D-серина у крыс КМ, доля животных, %.

Группа, доза (мг/кг)	Наличие катаlepsии после припадка в периоды:		
	1–5 мин	5–10 мин	10 мин и более
К, $n = 25$	100	80.0±0.1	76.0±0.1
D-серин, 200, $n = 7$	100	100	100
D-серин, 400, $n = 5$	100	100	100
D-серин, 600, $n = 10$	100	100	80.0±0.1
D-серин, 300 хрон, $n = 12$	100	100	80.0±0.1

Таблица 3. Показатели аудиогенного судорожного припадка у крыс линии КМ в контроле (К) и после введения МК-801

Группа, доза (мг/кг)	Nn	Доля чувствит. жив, %	ЛП АП, с	Ср. балл АП	Доля “двухв.” жив, %	Время выхода из припадка, с
К	25	100	1.4±0.1	4.0±0.0	0	129.4±8.8
МК-801, 0.1 мг/кг	9	88.9±0.1, n = 8	3.9±0.8*	3.2±0.4	0	165.9±33.5
	8	100	8.0±0.7***	2.5±0.3**	62.5±0.2***	121.8±24.1
МК-801, 0.2 мг/кг	5	100	7.6±1.5***	1.4±0.4**	80.0±0.1***	—
	8	87.5±0.11, n = 7	5.9±1.4***	2.3±0.4**	50.0±0.2***	123.5±28.2
МК-801, 0.4 мг/кг	11	54.6±0.2*, n = 6	15.3±3.2***	0.5±0.1***	0	—

n – число животных; * – статистически значимо отличается от показателей контрольной группы при p < 0.05, ** – p < 0.01, *** – p < 0.001.

Прим. Знак “—” в столбце “Время выхода из припадка” обозначает, что тонический компонент АП не развивался и определение времени выхода по стандартному протоколу (фиксация времени постановки всех конечностей на опору) не представлялось возможным.

Таблица 4. Постиктальная катаlepsия в контроле (К) и после введения МК-801 у самцов крыс КМ, доля животных, %

Группа, доза (мг/кг)	n	Наличие катаlepsии после АП в периоды:		
		Тест через 1–5 мин	Тест через 5–10 мин	Тест через 10 мин и более
К	25	100	80.0±0.1	76.0±0.1
МК-801, 0.1 мг/кг	9	22.2±0.1***	11.1±0.1***	11.1±0.1***
	8	0***	0***	0***
МК-801, 0.2 мг/кг	5	40.0±0.2*	40.0±0.2	40.0±0.2
	8	0***	0***	0***
МК-801, 0.4 мг/кг	11	0***	0***	0***

n – число животных; * – статистически значимо отличается от показателей контрольной группы при p < 0.05, *** – p < 0.001.

стриатуме) [4, 5] достаточно сложны, однако они указывают на то, что предрасположенность к АЭ – признак, затрагивающий многие структуры мозга, а не только участки ствола, критически важные для развития собственно АП. Статистически значимые межлинейные различия в величинах V_{max} , отражающих плотность мест специфического связывания и для дофаминовых (D2), и для глутаматных (NMDA) рецепторов, а также различия в динамике повышения уровня дофамина у КМ при введении амфетамина и раклоприда, по сравнению с крысами Вистар, возможно связаны со сниженным числом мест специфического связывания (D2 рецепторов) в этой структуре, и это может сказываться и на особенностях формирования АПК, точнее в различиях экспрессии АП и АПК.

Феномены нарушения мышечного тонуса – катаlepsию, ригидность и акинезию (при блокаде дофаминовой системы стриатума) можно снять ло-

кальным применением NMDA-антагонистов [17]. МК-801 (дизоцилпин) является наиболее сильным NMDA-антагонистом по степени воздействия на катаlepsию, вызванную галоперидолом [15]. Системно или локально введенные NMDA-антагонисты снижают симптомы катаlepsии, вызванные D2-антагонистами благодаря противоположно направленному действию D2 и NMDA рецепторов в стриатуме [18]. Антагонисты глицинового сайта снимают катаlepsитогенное действие галоперидола при введении их в стриатум [19]. Отметим, что и в наших экспериментах NMDA-агонист D-серин усиливал АПК у крыс линии КМ. Характеристики специфического связывания лигандов с D2 и NMDA рецепторами в сопоставлении с межлинейными неврологическими особенностями (в нашем случае – с АЭ и постиктальной катаlepsией) практически не известны.

Можно предположить, что описанное в стригатуме снижение плотности рецепторов является компенсаторной down-регуляцией, которая способствует “переносимости” тяжелых аудиогенных приступов у крыс КМ. Иными словами, при селекции крыс линии КМ на высокую “аудиогенную” судорожную готовность, в процессе селекции в размножение отбирали тех особей (с АП), у которых имелись (вследствие естественной внутривидовой изменчивости) особенности глутаматергической системы.

Установлено, что D1-рецепторы расположены в основном на нейронах стрио-нигрального пути и возбуждают ГАМК-ергические эфференты, а D2-рецепторы расположены на нейронах непрямого пути через стриатум и ингибируют ГАМК-ергические пути [20]. Можно предположить, что такая координация в паттерне активации дофаминовых и NMDA-рецепторов и лежит в основе того, что МК-801 уже в дозе 0.1 мг/кг (в нашем эксперименте) значительным образом подавил проявление постиктальной каталепсии и полностью купировал ее в дозе 0.2 мг/кг, при которой судорожные компоненты АП у крыс КМ все еще сохранялись.

Отметим, что существуют вопросы, для ответа на которые именно АПК крыс линии КМ могла бы послужить продуктивной моделью. В частности, каким образом в неостриатуме поступает информация о необходимости контроля АП (иными словами, почему АПК возникает после АП)? Еще вопрос — неостриатум получает глутаматергические афференты из новой коры, однако АП развивается при активации структур ствола мозга? Кроме того, известно, что инъекции NMDA в нижнее двухолмие в зависимости от дозы приводят либо к реакции замирания, либо к двигательному возбуждению. Механизм генерации данных реакций не вполне известен, однако показано, что при этом в стриатуме не происходит активации нейронов (по экспрессии гена *c-fos*) [21]. Такую реакцию замирания можно сопоставить с аудиогенной каталепсией (развивающейся после звука в отсутствие АП у ряда крыс Вистар, Wag/Rji и крыс линии “0”), и, вероятно всего, она не гомологична АПК, однако также, как и АПК, она потенцируется галоперидолом [7]. Отсутствие гомологии подтверждается и разной картиной формирования аудиогенной каталепсии и АПК в онтогенезе крыс Вистар (1–4 мес. жизни) [1] — последовательным снижением пенетрантности первой и повышением в случае последней.

Исходя из общих соображений, можно предположить, что как реакция замирания, так и реакция бегства (в том числе и АП) должны ослабляться или нивелироваться NMDA-антагонистами. И действительно — у крыс КМ купирование как АП, так и каталепсии, происходят в случае действия

МК-801. Однако если проявление АПК, вероятнее всего, происходит с участием стриатума, то для реакции замирания, вызванной введением NMDA в нижнее двухолмие, стриатум не является критической структурой [21].

Как уже упоминалось выше, предрасположенные к АЭ крысы (выведенные в разных лабораториях) обнаруживают отклонения в функции многих нейромедиаторных систем [22–27]. Это заставляет предполагать возможное существование некоего генетически детерминированного нарушения развития ЦНС, которое впоследствии выражается как во множественных нейрохимических отклонениях, так и в генезе аудиогенных судорог и последующей каталепсии. Сходный “рисунки” девиаций в связывании D2 и NMDA рецепторов у крыс линии КМ является косвенным подтверждением этого предположения и ставит задачу более подробного анализа данного феномена.

Следует отметить, что селекция крыс линии КМ по признаку аудиогенной эпилепсии привела к появлению у них множественных скоррелированных морфологических, нейрохимических и поведенческих изменений [28]. По всей видимости, к особенностям линии КМ следует отнести то, что помимо снижения плотности D2-рецепторов в стриатуме, в этой структуре на 40% снижена плотность и NMDA-рецепторов [4], что не вызывает удивления в связи с тем, что в стриатуме эти рецепторы взаимодействуют в опосредуемых эффектах. Особенно важным представляется тот факт, что эти соотношения выявлены при сравнении данных по КМ с показателями крыс линии “0” [29], т.е. крыс с генотипом, имеющим большую долю генетического фона, общего с линией КМ. В этом плане может показаться противоречивым тот факт, что у крыс КМ и линии “0” (а также линии “4”) имеется определенное сходство во взаимодействии состояния каталепсии после действия звука с галоперидоловой каталепсией. Возможно, что это противоречие можно объяснить тем, что мишенью галоперидола являются и D1-рецепторы. К сожалению, ни нейрохимических данных, ни данных по радиолигандному связыванию для рецепторов данной категории в применении к крысам этих генотипов нет.

Агонист глицинового сайта NMDA-рецептора D-серин, усиливает способность пентилентетразола индуцировать судороги и способен блокировать антиконвульсивный эффект неселективного антагониста глициновых рецепторов, кинурениновой кислоты против судорог, вызываемых NMDLA (рацемическая смесь NMDA) [8]. В наших экспериментах D-серин не усилил интенсивность АП у крыс линии КМ (она и без воздействия была максимальной), однако усилил проявление каталепсии в более поздние периоды наблюдения (различие

статистически незначимое, т.к. выраженность АПК у интактных крыс КМ также близка к максимальной). Эти данные согласуются с тем, что галоперидол-индуцированная каталепсия ингибируется рядом антагонистов глицинового сайта NMDA-рецептора, такими как MRZ 2/570, MRZ 2/571 и MRZ 2/576 [30]. Парадоксально, что при хроническом его введении D-серин несколько снизил интенсивность судорог (статистически незначимо), что можно объяснить десенситизацией этих рецепторов.

Как известно, острое и хроническое введение МК-801 (а также других NMDA-антагонистов) является моделью шизофреноподобного расстройства как у животных (крыс, мышей, птиц) так и у людей, вызывая социальный дефицит, проблемы с пространственным обучением, стереотипии и гиперлокомоцию [31, 32]. В нашем эксперименте аналогичные двигательные нарушения наблюдались при введении 0.4 мг/кг МК-801. Интересно, что мыши-нокауты по NMDAR-субъединице GluN1 рецептора в парвальбумин-позитивных интернейронах оказываются парадоксальным образом гиперсенситивизированы к шизофреноподобным эффектам МК-801, демонстрируя стереотипии и каталепсию [33].

Глутаматергическая система нижнего двуххолмия, критической структуры для инициации АП, вовлечена как в эпилептогенез, так и в патогенез двигательных нарушений. Так, через сутки после завершения семикратного ежедневного прозвания крыс линии КМ наблюдалось усиление глутаматергической трансмиссии в нижних буграх четверохолмия: повышался уровень активности ERK1/2-киназы и белка экзоцитоза синапсина 1, а также экспрессия VGLUT1 и VGLUT2 и синаптического белка SV2B [34].

Кроме того, микроинъекции МК-801 в нижние холмики снимают моторный дефицит, возникающий у мышей после терапии МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) [35], а также каталепсию, вызываемую золпидемом (действующим на $\alpha 1$ -содержащие GABA рецепторы) [36]. Далее, было показано, что билатеральное введение NMDA в нижние холмики четверохолмия с последующей микроинъекцией галоперидола в дорсо-роstralный стриатум вызывает каталепсию (в то время как введение физраствора в нижние холмики в аналогичной ситуации не способно ее вызвать). В то же время, каталепсия, вызываемая микроинъекцией галоперидола в вентро-роstralный стриатум полностью предотвращается предварительным введением МК-801 в нижние холмики четверохолмия. Таким образом, глутаматергическая трансмиссия в нижних холмиках может значительным образом воздействовать на интрастриарную галоперидол-индуцированную каталепсию. То есть нижние

холмики, критическая структура для инициации АП, являются также важной структурой для сенсорной интеграции, в том числе, проявления каталептических реакций [37]. Это согласуется с нашими данными: препарат, снимающий АП у крыс линии КМ, снимает и АПК, находящуюся под дофаминергическим контролем. Хотя рассматривать каталепсию после АП как запредельное торможение с охранительной функцией, как это делали наши предшественники [38] было бы и не совсем верно, но определенная восстановительная функция, возможно, этому состоянию свойственна.

Обобщая наши данные, следует отметить, что на крысах линии КМ мы наблюдали потенцирование АПК NMDA-агонистом D-серином (хотя и статистически незначимое) и ее снятие NMDA-антагонистом МК-801, что также имеет место и в случае каталепсии, вызванной D2-антагонистами. Исследование влияния агонистов и антагонистов NMDA рецепторов на АП и АПК у крыс линии КМ было проведено впервые. Полученные данные позволили показать возможность “диссоциации” АП и АПК у крыс линии КМ, чего никогда не наблюдается у интактных животных [1]. Таким образом, АП *per se* не является достаточным условием для развития АПК. Можно предположить, что NMDA-антагонист МК-801 снимает каталептогенный эффект АП, опосредуемый D2-рецепторами стриатума крыс линии КМ.

ВЫВОДЫ

1. Введение D-серина не оказало статистически значимого воздействия на аудиогенный судорожный припадок и постиктальную каталепсию крыс линии КМ.
2. МК-801 в дозозависимой манере снизил интенсивность аудиогенного судорожного припадка и повысил его латентный период у крыс линии КМ.
3. Удалось показать “диссоциацию” аудиогенного судорожного припадка и постиктальной каталепсии. Аудиогенная постиктальная каталепсия была полностью купирована при дозе 0.2 мг/кг, в то время как клонический компонент аудиогенного судорожного припадка при этой дозе все еще сохранялся.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.М.С., И.Б.Ф., И.И.П.), сбор данных (Н.М.С., И.Б.Ф.), обработка данных (Н.М.С.), написание и редактирование манускрипта (И.И.П., Н.М.С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500080-8 и Междисциплинарной научной и образовательной Школой

Московского государственного университета “Мозг, Когнитивные системы, Искусственный интеллект”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, протокол N 12 от 12.03.2014 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федотова ИБ, Сурина НМ, Маликова ЛА, Раевский КС, Поletaева ИИ (2008) Исследование изменений мышечного тонуса (катаlepsии), наступающих у крыс после аудиогенного судорожного припадка. Журн высшнервдеят 58(5):620–627. [Fedotova IB, Surina NM, Malikova LA, Raevskii KS, Poletaeva II (2008) The investigation of cataleptic muscle tonus changes in rats after audiogenic seizures. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova 58(5): 620–627. (In Russ)].
2. Долина СА, Коган БМ, Тананова ГВ (1982) Содержание катехоламинов в стриатуме, гипоталамусе и надпочечниках крыс, генетически предрасположенных к судорожным припадкам. Бюл эксп биол мед 93(2): 12–14. [Dolina SA, Cogan BM, Tananova GV (1982) Catecholamine levels in the striatum, hypothalamus, and adrenals of rats with genetic predisposition to epileptic seizures. Biull Eksp Biol Med 93(2): 12–14. (In Russ)].
3. Косачева ЕС, Кудрин ВС, Федотова ИБ, Семиохина АФ, Раевский КС (1998) Влияние карбамазепина на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс с аудиогенной эпилепсией. Эксп клин фармакол 61(3): 25–27. [Kosacheva ES, Kudrin VS, Fedotova IB, Semiokhina AF, K S Raevskii KS (1998) The effect of carbamazepine on the content of monoamines and their metabolites in the brain structures of rats with audiogenic epilepsy Eksp Klin Farmakol 61(3): 25–27. (In Russ)].
4. Фирстова ЮЮ, Абаимов ДА, Сурина НМ, Поletaева ИИ, Федотова ИБ, Ковалёв ГИ (2012) Связывание специфических лигандов D2- и NMDA-рецепторами клеток стриатума крыс двух линий, контрастных по предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. Бюлл Эксп Биол Мед 154 (8): 158–161. [Firstova YY, Abaimov DA, Surina NM, Poletaeva II, Fedotova IB, Kovalev IB (2012) Binding of specific ligand by D2- and NMDA-receptors of striatum cells in two rat strains predisposed and resistant to audiogenic seizures. Biull Eksp Biol Med 154(2):196–198. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1910-6>.
5. Сорокин АЯ, Кудрин ВС, Клодт ПМ, Туомисто Л, Поletaева ИИ, Раевский КС (2004) Межлинейные различия в эффектах амфетамина и раклоприда на активность дофаминергической системы в дорзальном стриатуме крыс линии КМ и Вистар (микродиализное исследование). Генетика 40(6): 846–849. [Sorokin AY, Kudrin VS, Klodt PM, Tuomisto L, Poletaeva II, Raevskii KS (2004) The interstrain differences in the effects of D-amphetamine and raclopride on dorsal striatum dopaminergic system in KM and Wistar rats (microdialysis study). Genetika 40(6): 846–849. (In Russ)].
6. Куликов АВ, Тихонова МА, Чугуй ВФ, Алехина ТА, Колпаков ВФ, Попова НК (2004) Хроническое введение имипрамина снижает время застывания у крыс, генетически предрасположенных к катаlepsии. Бюлл эксп биол мед 138(4): 401–403. [Kulikov AV, Tikhonova MA, Chugui VF, Alekhina TA, Kolpakov VF, Popova NK (2004) Chronic administration of imipramine reduces the hardening time in rats genetically predisposed to catalepsy. Biull Eksp Biol Med 138(4):401–403. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0111-y>.
7. Сурина НМ (2011) Физиолого-генетическое исследование предрасположенности к катаlepsии. дисс канд биол наук: 03.03.01.– Моск. гос. университет, Москва, 2011 – 180 с. [Surina NM (2011) Fiziologo-geneticheskoe issledovanie predraspologennosti k katalepsii. PhD dissertation: 03.03.01.– Moscow State University, Moscow, 2011–180 p (In Russ)].
8. Singh L, Oles RJ, Tricklebank MD (1990) Modulation of seizure susceptibility in the mouse by the strychnine-insensitive glycine recognition site of the NMDA receptor-ion channel complex. Br J Pharmacol 99(2): 285–288.
9. Long KD, Mastroaolo J, Rosse RB, Deutsch SL (2007) Exogenously administered D-serine failed to potentiate the ability of MK-801 to antagonize electrically precipitated seizures in nonhandled control and stressed mice. Eur Neuropsychopharmacol 17(1): 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.02.007>.
10. Long KD, Mastroaolo J, Rosse RB, Manaye KF, Deutsch SL (2006) Modulatory effects of d-serine and sarcosine on NMDA receptor-mediated neurotransmission are apparent after stress in the genetically inbred BALB/c mouse strain. Brain Res Bull 69(6): 626–630. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.007>.
11. Liu YH, Wang L, Wei LC, Huang YG, Chen LW (2009) Up-regulation of D-serine might induce GABAergic neuronal degeneration in the cerebral cortex and hippocampus in the mouse pilocarpine model of epilepsy. Neurochem Res 34(7): 1209–1218. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9897-0>.
12. Debler EA, Lipovac MN, Lajtha A, Zlocovic BV, Dunlop DS, Jakobson AE, Rice KC, de Costa B, Reith ME (1993) Metaphit – induced audiogenic seizures in mice: 1. Pharmacologic characterization. Epilepsia 34(2): 201–210.
13. Faingold CL, Randall ME, Naritoku DK, Boersma CA, Anderson CA (1993) Noncompetitive and competitive NMDA antagonists exert anticonvulsant effects by actions on different sites within the neuronal network for audiogenic seizures. Exp Neurol 119(2): 198–204.
14. Verma A, Kulkarni SK (1992) D1/D2 dopamine and NMDA receptor participation in experimental catalepsy in rats. Psychopharmacology (Berl) 109(4): 477–483.
15. Рукояткина НИ, Горбунова ЛВ, Гмиро ВЕ, Лукомская НЯ (2000) Способность антагонистов глутаматных рецепторов ослаблять экспериментальную катаlepsию

- у крыс. Росс Физиол Журн им ИМ Сеченова 86(6): 626–633. [*Rukoiatkina NI, Gorbunova LV, Gmiro VE, Lukomskaia NYa* (2000) Glutamate receptor antagonists attenuate experimental catalepsy in rats. Russ Fiziol J 86(6): 626–633. (In Russ)].
16. *De Sarro GB, De Sarro A* (1993) Anticonvulsant properties of non-competitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate receptor in genetically epilepsy-prone rats: comparison with CPPene. *Neuropharmacology* 32(1): 51–58.
 17. *Calderon SF, Sanberg PR, Norman AB* (1988) Quinolinic acid lesions of rat striatum abolish D1- and D2- dopamine receptor-mediated catalepsy. *Brain Res* 450: 403–407.
 18. *Yoshida Y, Ono T, Kawano K, Miyagishi T* (1994) Distinct sites of dopaminergic and glutamatergic regulation of haloperidol-induced catalepsy within the rat caudate-putamen. *Brain Res* 639: 139–148.
 19. *Kretschmer BD, Winterscheid B, Danysz W, Schmidt WJ* (1994) Glycine site antagonists abolish dopamine D2 but not D1 receptor mediated catalepsy in rats. *J Neural Transm* 123–136.
 20. *Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Sussel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR* (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429–1432.
 21. *Ferreira-Netto C, Borelli GK, Brandao ML* (2007) Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. *Exp Neurol* 204: 693–704. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.12.023>.
 22. *Lasley SM* (1991) Roles of neurotransmitter amino acids in seizure severity and experience in the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res* 560(1-2): 63–70. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91215-m](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91215-m)
 23. *Jobe PC, Dailey JW, Reigel CE* (1986) Noradrenergic and serotonergic determinants of seizure susceptibility and severity in genetically epilepsy-prone rats. *Life Sci* 39(9): 775–782. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90455-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90455-8).
 24. *Jobe PC, Dailey JW* (2006) Genetically Epilepsy-Prone Rats (GEPRs) in Drug Research. *CNS Drug Rev* 6: 241–260. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2000.tb00150.x>
 25. *Jobe PC, Mishra PK, Browning RA, Wang C, Adams-Curtis LE, Ko KH, Dailey JW* (1994) Noradrenergic abnormalities in the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res Bull* 35(5-6): 493–504. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90163-5).
 26. *Jobe PC, Dailey JW* (2006) Genetically Epilepsy-Prone Rats (GEPRs) in Drug Research. *CNS Drug Rev*. 6: 241–260. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2000.tb00150.x>.
 27. *Garcia-Cairasco N, Umeoka EHL, Cortes de Oliveira JA* (2017) The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy Behav* EB71:250–273. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.001>.
 28. *Poletaeva II, Surina NM, Kostina ZA, Perepelkina OV, Fedotova IB* (2017) The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav*. 71(Pt B): 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.07>
 29. *Федотова ИБ, Костына ЗА, Сурина НМ, Поletaева ИИ* (2012) Селекция лабораторных крыс по признаку “отсутствии предрасположенности к аудиогенному судорожному припадку”. *Генетика* 48(6): 685–691. [*Fedotova IB, Kostyna ZA, Surina NM, Poletaeva II* (2012) Laboratory rat selection for the trait “the absence of audiogenic seizure proneness”. *Genetika* 48(6): 685–691. (In Russ)].
 30. *Karcz-Kubicha M, Lorenz B, Danysz W* (1999) GlycineB antagonists and partial agonists in rodent models of Parkinson's disease – comparison with uncompetitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38(1):109–119. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(98\)00165-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00165-8).
 31. *Adell A* (2020) Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. *Biomolecules* 10(6): 947. <https://doi.org/10.3390/biom10060947>.
 32. *Bae HJ, Bae HoJ, Kim JY, Park K, Yang X, Jung SY, Park SJ, Kim DH, Shin CY, Ryu JH* (2023) The effect of lansoprazole on MK-801-induced schizophrenia-like behaviors in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 120:110646. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110646>.
 33. *Bygrave AM, Masiulis S, Nicholson E, Berkemann M, Barkus C, Sprengel R, Harrison PJ, Kullmann DM, Banerman DM, Käzel D* (2016) Knockout of NMDA-receptors from parvalbumin interneurons sensitizes to schizophrenia-related deficits induced by MK-801. *Transl Psychiatry* 6(4):e778. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.44>.
 34. *Николаева СД, Никитина ЛС, Глазова МВ, Бахтеева ВТ, Черниговская ЕВ* (2024) Анализ состояния глутамат- и ГАМКергических нейронов нижних бугров четверохолмия крыс линии Крушинского-Молодкиной на ранних этапах эпилептогенеза. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110(3): 480–498. [*Nikolaeva SD, Nikitina LS, Glazova MV, Bakhteeva VT, Chernigovskaya EV* (2024) Analysis of the state of glutamate- and GABA-ergic neurons in the inferior colliculi of Krushinsky-Molodkina strain rats at early stages of epileptogenesis. *Russ Fiziol J* 110(3): 480–498. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813924030108>.
 35. *Melo-Thomas L, Gil-Martínez AL, Cuenca L, Estrada C, Gonzalez-Cuello A, Schwarting RK, Herrero MT* (2018) Electrical stimulation or MK-801 in the inferior colliculus improve motor deficits in MPTP-treated mice. *Neurotoxicology* 65:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.004>.
 36. *Mierzejewski P, Kolaczkowski M, Nowak N, Korkosz A, Scinska A, Sienkiewicz-Jarosz H, Samochowiec J, Kostowski W, Bienkowski P* (2013) Pharmacological characteristics of zolpidem-induced catalepsy in the rat. *Neurosci Lett* 556:99–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.011>.
 37. *Medeiros P, Viana MB, Barbosa-Silva RC, Tonelli LC, L Melo-Thomas L* (2014) Glutamatergic neurotransmission in the inferior colliculus influences intrastriatal haloperidol-induced catalepsy. *Behav Brain Res*. 268:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.027>.
 38. *Прокопец ИМ* (1958) Экспериментальное исследование защитно-восстанавливающей роли функционального каталептоидного состояния. *Научн докл Высш Шк Биол наук Физиол биохим жив* 3: 84–89. [*Prokopets IM* (1958) An experimental study of the protective and restorative role of the functional cataleptoid state. *Nauchn dokl Vish Shkol Biol nauk Fiziol bihim zhivotn* 3: 84–89. (In Russ)].

GLUTAMATERGIC REGULATION OF THE AUDIOGENIC SEIZURES AND POSTICTAL CATALEPSY IN KRUSHINSKY–MOLODKINA STRAIN RATS: EFFECTS OF DIZOCILPINE AND D-SERINE

N. M. Surina^{a, #}, I. B. Fedotova^a and I. I. Poletaeva^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: Opera_ghost@inbox.ru*

The participation of the glutamatergic neurotransmitter system in the pathogenesis of audiogenic seizures (AS) and post-ictal catalepsy (PIC) in Krushinsky-Molodkina rats was analyzed. Effects of D-serine and dizocilpine administration was investigated. In intact KM rats, the intensity of AS correlates with the duration of PIC. The administration of D-serine (acute administration, doses of 200, 400 and 600 mg / kg, as well as after chronic administration – 5 days of 300 mg / kg, $n = 34$) had no significant effect on AS and PIC. Dizocilpine (MK-801, a non-competitive NMDA antagonist) was administered in an acute experiment at doses of 0.1, 0.2 and 0.4 mg/kg ($n = 41$). MK-801 dose-dependently reduced the intensity of AS and caused a "two-wave pattern" of seizures in the most of animals, and removed PIC at a lower dose than AS seizures. PIC was completely eliminated already at a dose of 0.2 mg/kg, while the clonic component of AS still persisted. Thus, it was possible to show the "dissociation" of AS and PIC. It is assumed that although dopaminergic control is involved in the mechanisms of PIC development, glutamatergic neurotransmission is also taking part in the PIC expression.

Keywords: audiogenic epilepsy, postictal catalepsy, dizocilpine, D-serine, glutamatergic neurotransmission, dopamine, Krushinsky-Molodkina strain rats

РОЛЬ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ В ПОТЕНЦИАЦИИ GNE-9278 ТОКОВ NMDA РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНОВ КОРЫ КРЫС *IN VITRO*

© 2024 г. А. И. Федорина, С. М. Антонов, Д. А. Сибаров*

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

*e-mail: dsibarov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 30.08.2024 г.

Принята к публикации 02.09.2024 г.

Для компенсации недостатка функций NMDA рецепторов в ЦНС на фоне деменций большой интерес представляют положительные аллостерические модуляторы (ПАМ). Известные ПАМ увеличивают амплитуду интегральных ионных токов, переносимых NMDA рецепторами, однако не влияют на кальций-кальмодулин зависимую десенситизацию последних. Мы изучили возможность модуляции десенситизации NMDA рецепторов недавно синтезированным ПАМ GNE-9278, имеющим уникальный сайт связывания на трансмембранном домене. Эксперименты проводили на нативных NMDA рецепторах, экспрессированных в нейронах неокортекса крысы в первичной культуре ткани. Методом “patch-clamp” регистрации трансмембранных токов проведено сравнительное изучение влияния на десенситизацию NMDA рецепторов трех веществ, потенцирующих токи NMDA рецепторов: GNE-9278 (10 мкМ), дитиотреитола (1 мМ) и ионов меди (5 мкМ). Эти вещества увеличивали амплитуду токов, вызванных 100 мкМ NMDA, однако только GNE-9278 уменьшал разницу между равновесной и пиковой амплитудами токов на 15%. Кроме того, GNE-9278 вдвое увеличивал постоянную времени спада от пика к равновесному состоянию, т.е. ослаблял десенситизацию NMDA рецепторов. Поскольку GNE-9278 не изменял эффективную концентрацию внеклеточного кальция для генерации десенситизации, его эффект вероятно не мешает взаимодействию рецептора с кальмодулином. Анализ формы токов в рамках кинетической модели показал, что GNE-9278 уменьшает два кинетических параметра: скорость закрывания канала, определяющую время открытого состояния, а также скорости входа в и выхода рецептора из десенситизированного состояния, определяющие вероятность открытого состояния канала. Модуляция кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов выделяет GNE-9278 среди других известных ПАМ, что вероятно определяется сайтом связывания GNE-9278 в сегменте пре-M1 GluN1 субъединицы.

Ключевые слова: ионные каналы, кальций, NMDA, десенситизация, GNE-9278

DOI: 10.31857/S0044452924050091, EDN: XOTJLT

ВВЕДЕНИЕ

NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторы принадлежат к одному из подтипов ионотропных рецепторов глутамата, выполняющих функции возбуждающей синаптической передачи в ЦНС млекопитающих. При активации через ионные каналы этих рецепторов в клетку наряду с ионами натрия входит кальций, что играет ключевую роль в механизмах синаптической пластичности. При этом NMDA рецепторы подвержены кальций-кальмодулин-зависимой десенситизации (КЗД), проявляющейся в постепенном уменьшении интегрального трансмембранного тока через каналы при постоянном действии агониста. Существует также глицин-зависимая десенситизация NMDA рецепторов, наблюдаемая при дефиците ко-агониста глу-

тамата глицина [см. обзор 1]. Однако, при насыщающих сайт связывания концентрациях глицина, ее эффект (вклад в падение амплитуды токов в экспериментальных условиях) многократно слабее, чем для КЗД. Поэтому при дальнейшем изложении под десенситизацией рецепторов мы будем подразумевать именно кальций-зависимый процесс десенситизации. Этот механизм ограничивает избыточное поступление ионов в нейроны, ограничивая нейротоксический эффект избыточной активации. КЗД возникает в результате связывания комплекса кальций-кальмодулин (CaCam) с внутриклеточным доменом GluN1 субъединицы рецептора [2], а её выраженность прямо пропорциональна входу ионов кальция через каналы активированных рецепторов и накоплению внутриклеточного кальция.

КЗД может модулироваться внешними факторами, влияющими на концентрацию свободного кальция в примембранной области цитоплазмы за счет буферизации, диффузии и локального транспорта соседними с рецептором белками [см. обзор 3]. В частности, натрий-кальциевый обменник модулирует КЗД за счет удаления кальция из примембранной области цитоплазмы [4, 5]. На процесс КЗД также влияют другие белки ассоциирующие кальмодулин [6]. К структурным детерминантам, влияющим на кинетику КЗД можно отнести мутации N-терминального домена GluN1 субъединицы [7], и разницу в субъединичном составе рецепторов [8].

Для компенсации дефицита функций NMDA рецепторов на фоне деменций большой интерес представляют положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) [9]. Хорошо изучена положительная аллостерическая модуляция полиаминами [10, см. обзор 11] и нейростероидами [12, 13], которые являются эндогенными факторами, регулирующими синаптическую передачу. Токи, опосредуемые активацией NMDA рецепторов, возрастают в результате фосфорилирования [14, 15]. Потенцирование токов NMDA рецепторов происходит также при действии сероводорода, дитиотреитола (ДТТ) и ионов меди – редокс агентов, вызывающих химическое восстановление дисульфидных связей, что вызывает разрыв последних [16 – 19].

Несмотря на то, что известные ПАМ увеличивают токи через NMDA рецепторы, среди них обнаружено только одно вещество, потенцирующий эффект которого на токи связан с ослаблением КЗД [20]. Для остальных веществ, вызывающих потенцирование токов NMDA рецепторов такой эффект не выявлен. В частности, КЗД не ослабляется при действии таких редокс агентов, как дититотреитол [19], сероводород [21], глутатион [16]. Причем два последних являются эндогенными модуляторами функций NMDA рецепторов [16, 22, 23]. Хотя действие редокс агентов неспецифично в отношении NMDA рецепторов, они проявляют свойства ПАМ последних, что имеет существенное физиологическое значение.

Известно, что большинство ПАМ действуют на лиганд-связывающий домен или другие структурные элементы NMDA рецепторов, не участвующие в КЗД. Например, прегненолон-сульфат [24] вызывает увеличение токов NMDA рецепторов, связываясь в области трансмембранного домена, и не ослабляет КЗД. Для многих других ПАМ этот аспект влияния на токи NMDA рецепторов не изучался.

Недавно синтезирован новый ПАМ GNE-9278 с уникальным сайтом связывания на внеклеточной поверхности трансмембранного домена NMDA рецептора [25]. Он не является специфичным в отношении определенного субъединичного состава

NMDA рецепторов. Структурные детерминанты (T550 и D552) на сегменте пре-M1 GluN1 субъединицы вероятно определяют связывание GNE-9278 [25], причем именно этот сегмент претерпевает существенные конформационные изменения в присутствии CaCam [26]. Это заставляет предполагать возможное влияние GNE-9278 на процесс КЗД.

Поскольку в настоящее время известен только один низкомолекулярный фармакологический агент, ослабляющий КЗД NMDA рецепторов [20], было решено исследовать, может ли и GNE-9278 влиять на этот процесс. Эксперименты проводили на нативных NMDA рецепторах, экспрессированных в нейронах коры головного мозга, и содержащих наряду с GluN1 только GluN2A и GluN2B субъединицы [27, 28]. Такой субъединичный состав определяет выраженную подверженность этих рецепторов КЗД [8]. На нейронах в первичной культуре коры большого мозга крыс мы провели сравнительное изучение влияния на КЗД NMDA рецепторов трех ПАМ: GNE-9278, дитиотреитола и ионов меди.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры большого мозга, полученного из эмбрионов крыс линии Вистар. Методика приготовления первичной культуры ткани нейронов коры мозга крыс детально была описана ранее [23]. На 16–17 дни пренатального развития (E16–E17) выделяли ткань неокортекса и культивировали при 37°C и 5% CO₂ в нейробазальной питательной среде (ПанЭко, Россия) с ростовой добавкой В-27 (ПанЭко, Россия) на покровных стеклах, покрытых поли-D-лизинном. Эксперименты на нейронах проводили на 10–14 дни культивирования.

В опытах применяли внеклеточный раствор следующего состава (мМ): NaCl 144, KCl 2.8, HEPES 10, (pH 7.2–7.4, доводили NaOH), осмолярность 310 мОсм. Если не указано иное, то концентрация CaCl₂ в базовом растворе составляла 1 мМ. Трансмембранные токи нейронов регистрировали методом “patch-clamp” в конфигурации целой клетки с использованием усилителя Multiclamp 700B (Molecular Devices, США) с включенным фильтром нижних частот 400 Гц и оцифровкой со скоростью сбора данных 20 тысяч измерений в секунду с использованием АЦП Digidata 1440A (Molecular Devices, США) и программного обеспечения pClamp v10.6 (Molecular Devices). Замену раствора осуществляли с помощью быстрой перфузионной системы, как описано ранее [4]. Внутриклеточный пипеточный раствор содержал (в мМ): 120 CsF, 10 CsCl, 10 EGTA и 10 HEPES, осмолярность 300 мОсм, pH доводили до 7.4 с помощью CsOH. Пипетки с сопротивлением 4–6 МОм

изготавливали из капилляров из боросиликатного стекла RWD B-15086-10F (Китай). Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–25 °C). Мембранный потенциал фиксации устанавливали на -70 мВ. Данные представлены без поправок на величину жидкостного потенциала, который в наших экспериментах составлял -11 мВ. Токи NMDA рецепторов вызывали аппликацией 100 мкМ NMDA совместно с 30 мкМ глицина в качестве ко-агониста. Вещества NMDA (M3262), глицин (G7126) и дитиотреитол, DTT (D0632) приобретены в Sigma-Aldrich, США. GNE-9278 (кат. 6369) в Tocris Inc., США.

Для определения эффективной концентрации наружного кальция ($EC_{50}[Ca^{2+}]$), необходимой для развития процесса десенситизации NMDA рецепторов, измеряли соотношения равновесных токов рецептора (I_{ss}) к пиковым значениям (I_{ss} / I_{peak}) при различных концентрациях внеклеточного кальция ($[Ca^{2+}]$). Полученные данные аппроксимировали уравнением Хилла: $I_{ss} / I_{peak} = 1 + (m - 1) * [Ca^{2+}]^h / (EC_{50}^h + [Ca^{2+}]^h)$, где h – коэффициент Хилла, m – минимальная величина соотношения плато/пик.

Для подбора кинетических констант скоростей активации, деактивации, а также входа и выхода рецептора из десенситизации использовали макро-скопический анализ токов в программе ChanneLab (Synaptosoft). В качестве базовой модели использовали набор констант, опубликованный для нативных NMDA рецепторов постоянно связанных с глицином [30]. Симуляцию токов на основании полученных констант выполняли в той же программе.

Данные показаны как репрезентативные записи и средние значения \pm стандартная ошибка среднего, (n) относится к количеству исследованных нейронов. Пары данных сравнивались с использованием непарного двустороннего t-критерия Стьюдента. Несколько групп сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением критерия Тьюки. Статистическая значимость представлена на рисунках в соответствии со следующими символами * и ***, которые обозначают значения доверительной вероятности p менее 0.05 и 0.001, соответственно. Кроме того, указаны значения p для каждого сравнения. Аппроксимацию кривой проводили с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab Corp.). Значения EC_{50} , полученные в результате отдельных экспериментов, проведенных в одних и тех же экспериментальных условиях, усредняли для получения средних значений \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменение соотношения равновесного тока к пиковому при действии ПАМ

Для проверки предположения, что ПАМ могут влиять на процесс КЗД NMDA рецепторов, на каждом исследованном нейроне мы анализировали форму токового ответа нейронов на аппликацию 100 мкМ NMDA (+30 мкМ глицина) (рис 1a) в контроле, а затем на фоне действия одного из трех

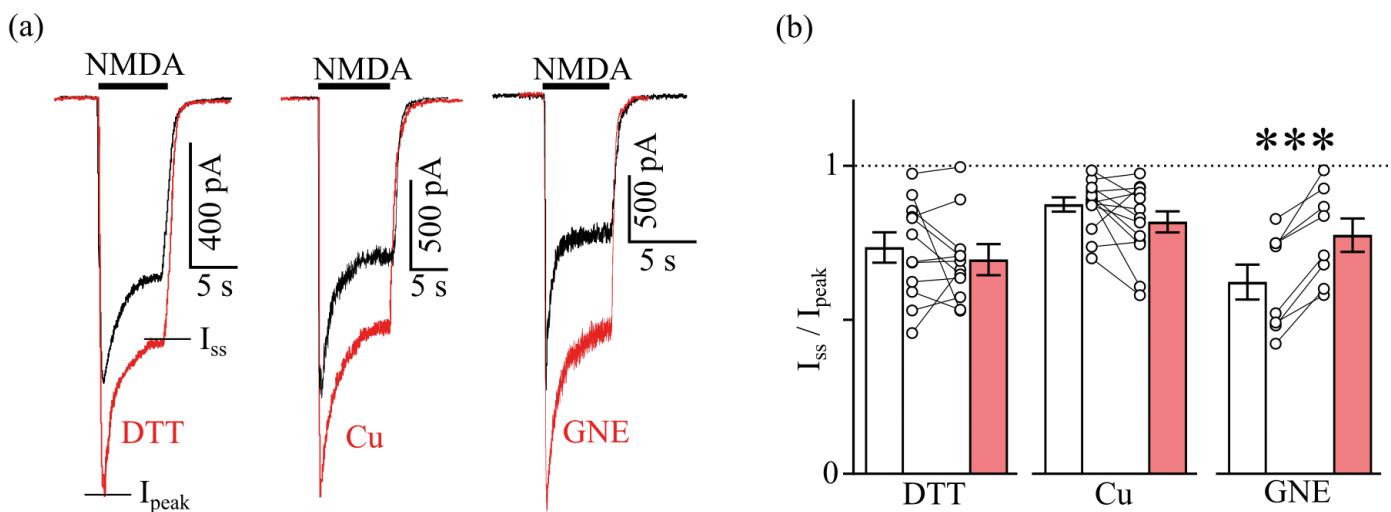


Рис. 1. Влияние положительных аллостерических модуляторов на степень кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов. (a) – Примеры токов NMDA рецепторов, зарегистрированных в конфигурации целой клетки на нейронах при аппликации 100 мкМ NMDA в присутствии 30 мкМ глицина. $V_m = -70$ мВ при постоянной концентрации внеклеточного кальция 1 мМ. Черные кривые – токи в контроле. Красные кривые – на фоне действия дитиотреитола (DTT, 1 мМ), $CuSO_4$ (Cu, 5 мкМ) или GNE-9278 (GNE, 10 мкМ). Степень десенситизации оценивали по отношению амплитуд равновесного тока к пиковому (I_{ss} / I_{peak}). (b) – Средние значения отношения I_{ss} / I_{peak} в контроле (белые столбики) и на фоне действия аллостерических модуляторов (красные столбики). Кружки показывают результаты измерений в отдельных нейронах: DTT ($n = 14$), Cu ($n = 12$), GNE ($n = 8$). *** – отличие от контроля в присутствии GNE, $p = 0.0002$, парный t-критерий Стьюдента.

ПАМ. Опыты проводили в присутствии 1 мМ внеклеточного кальция. GNE-9278 (10 мкМ) и CuSO_4 (5 мкМ) апплицировали совместно с NMDA. Используемая концентрация ионов меди соответствовала максимальному потенцирующему эффекту на NMDA рецепторы, поскольку более высокие концентрации могут напротив вызывать ингибирование [18]. DTT (1 мМ) добавляли во внеклеточный раствор на 90 сек, отмывали 30 сек внеклеточным раствором, после чего апплицировали NMDA. Такой протокол воздействия DTT был разработан ранее [16] и позволяет модифицировать только наиболее доступные дисульфидные связи во внеклеточном домене рецептора, к которым относится связь C744–798, разрыв которой и вызывает потенцирующий эффект [31].

Соотношение амплитуд равновесного тока к пиковому (I_{ss} / I_{peak}) не изменялось на фоне действия DTT или ионов меди (рис 1b). Однако добавление 10 мкМ GNE-9278 увеличивало это соотношение с 0.62 ± 0.06 в контроле до 0.77 ± 0.05 на фоне GNE-9278. Таким образом, в отличие от DTT и ионов меди, действующих на редокс сайты во внеклеточном домене рецептора, GNE-9278, связывающийся с трансмембранным доменом, ослаблял кальций-зависимую десенситизацию NMDA рецепторов.

Возрастание интегрального тока через NMDA рецепторы на фоне действия ПАМ гипотетически

могло бы влиять на выраженность КЗД за счет изменившегося входа кальция. В связи с этим, изучали возможную связь между эффективностью потенцирования пикового тока изучаемыми ПАМ и их влиянием на КЗД (рис. 2). Все три ПАМ ожидаемо достоверно увеличивали величину пикового тока в среднем на 16% для GNE-9278 и ионов меди (рис. 2a, b), и на 32% для DTT (рис. 2b). Поскольку при одинаковой выраженности потенцирования пикового ответа ионами меди и GNE-9278 только последний вызывал ослабление кальций-зависимой десенситизации, можно предположить, что эффективность потенцирования не связана с влиянием на КЗД. Кроме того, изменение концентрации внеклеточного кальция также не влияло на возрастание пиковой амплитуды токов при действии ПАМ.

Зависимость эффектов GNE-9278 от внеклеточного кальция

Эффективная концентрация внеклеточного кальция, необходимая для проявления КЗД NMDA рецепторов ($EC_{50}[\text{Ca}^{2+}]$), зависит от входа Ca^{2+} через рецептор, его буферизации, связывания с кальмодулином (Cam) и взаимодействия CaCam с внутриклеточным доменом рецептора. Мы предположили, что GNE-9278 мог бы влиять на процесс взаимодействия рецептора с CaCam . В этом случае

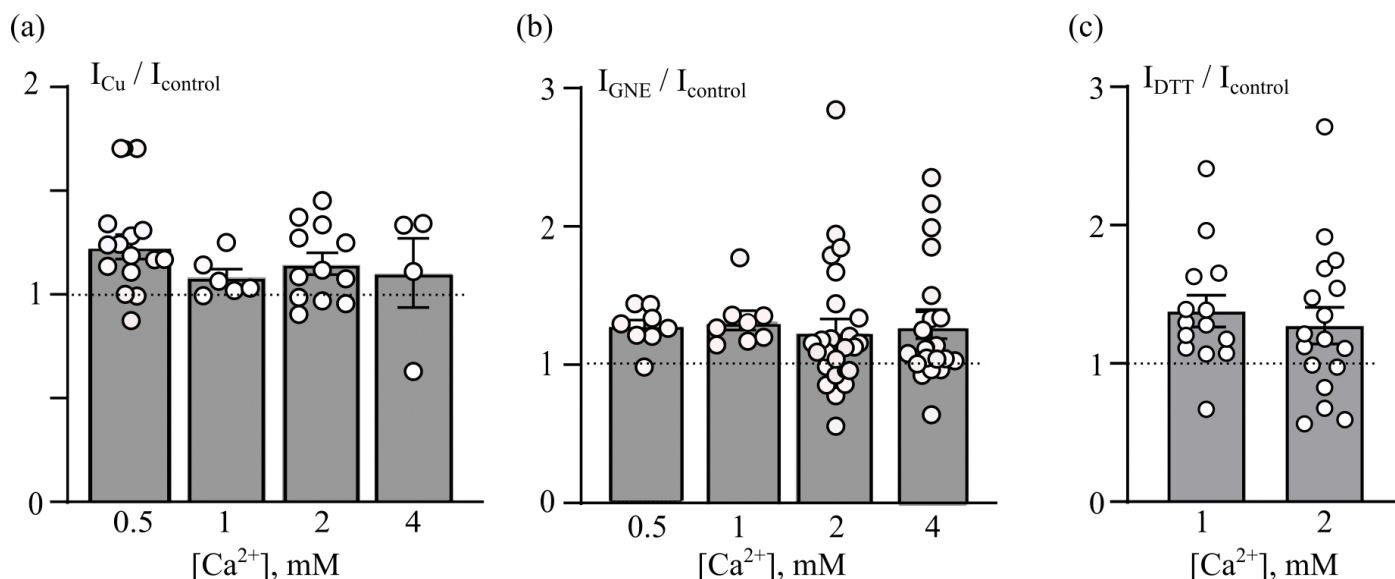


Рис. 2. Эффект положительных аллостерических модуляторов на пиковый ток, вызываемый аппликацией 100 мкМ NMDA в присутствии 30 мкМ глицина при различных экспериментальных условиях.

(a) — Отношение пикового в присутствии 5 мкМ CuSO_4 (Cu) к пиковому току в контроле. (b) — Отношение пикового тока в присутствии 10 мкМ GNE-9278 (GNE) к пиковому току в контроле. (c) — Отношение пикового тока после 90 сек обработки 1 мМ дитиотрептолом (DTT) к пиковому току в контроле. Кружки показывают результаты измерений в отдельных нейронах. Во всех экспериментальных условиях наблюдали достоверное увеличение амплитуды пикового тока относительно контрольного на фоне модуляторов ($p < 0.05$, парный t-критерий Стьюдента). Потенцирование тока достоверно не изменяется в зависимости от типа использованного ПАМ, а также от концентрации внеклеточного кальция (ANOVA).

величина $EC_{50}[Ca^{2+}]$ изменялась бы под действием GNE-9278.

Для определения $EC_{50}[Ca^{2+}]$ в контроле и в присутствии 10 мкМ GNE-9278 нами были построены концентрационные кривые зависимости соотношения I_{ss} / I_{peak} от концентрации внеклеточного кальция в диапазоне от 0.5 до 4 мМ $[Ca^{2+}]$ (рис. 3а). В случае, если GNE-9278 влияет на десенситизацию путем изменения $EC_{50}[Ca^{2+}]$ наблюдался бы сдвиг кривой вправо в сторону больших $[Ca^{2+}]$ в присутствии GNE-9278. Однако, $EC_{50}[Ca^{2+}]$ в контроле (1.79 ± 0.20 мМ) достоверно не возрастала в присутствии GNE-9278 (1.7 ± 0.2 мМ). Таким образом, действие GNE-9278 вероятно связано только с изменением кинетики десенситизации самого рецептора, но не с его взаимодействием с CaCam.

Влияние GNE-9278 на постоянную времени КЗД

Оценка кинетики развития процесса кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов возможна путем одноэкспоненциальной аппроксимации спада тока от пика к плато. Мы измерили постоянную времени (τ) спада тока в контроле и на фоне действия GNE-9278 при различных концентрациях внеклеточного кальция (рис 3б). В диапазоне концентраций Ca^{2+} от 0.5 до 2 мМ GNE-9278 вызывал достоверное увеличение τ приблизи-

тельно вдвое, что говорит о 2-кратном замедлении процесса десенситизации.

Таким образом, в отличие от DTT и ионов меди, GNE-9278 ослабляет кальций-зависимую десенситизацию NMDA рецепторов, что проявляется в уменьшении разницы между пиковым и равновесным током и замедлении КЗД, но не за счет влияния на эффективную концентрацию кальция, необходимую для развития десенситизации.

Моделирование токовых ответов NMDA рецепторов

Наблюдаемые изменения в кинетике интегрального тока, опосредуемого активацией NMDA рецепторов, при действии GNE-9278 могут быть проанализированы с использованием простой кинетической модели, которая описывает набор последовательных состояний рецептора от связывания лиганда до открытого состояния через константы скорости перехода между этими состояниями [25] (рис. 4а). Такая модель позволяет выполнить симуляцию интегральной формы тока через каналы множества рецепторов в ответ на аппликацию агониста. При симуляции мы подразумеваем, что оба коагониста – NMDA и глицин используются в насыщающих концентрациях, причем глицин постоянно присутствует в растворе. В таких усло-

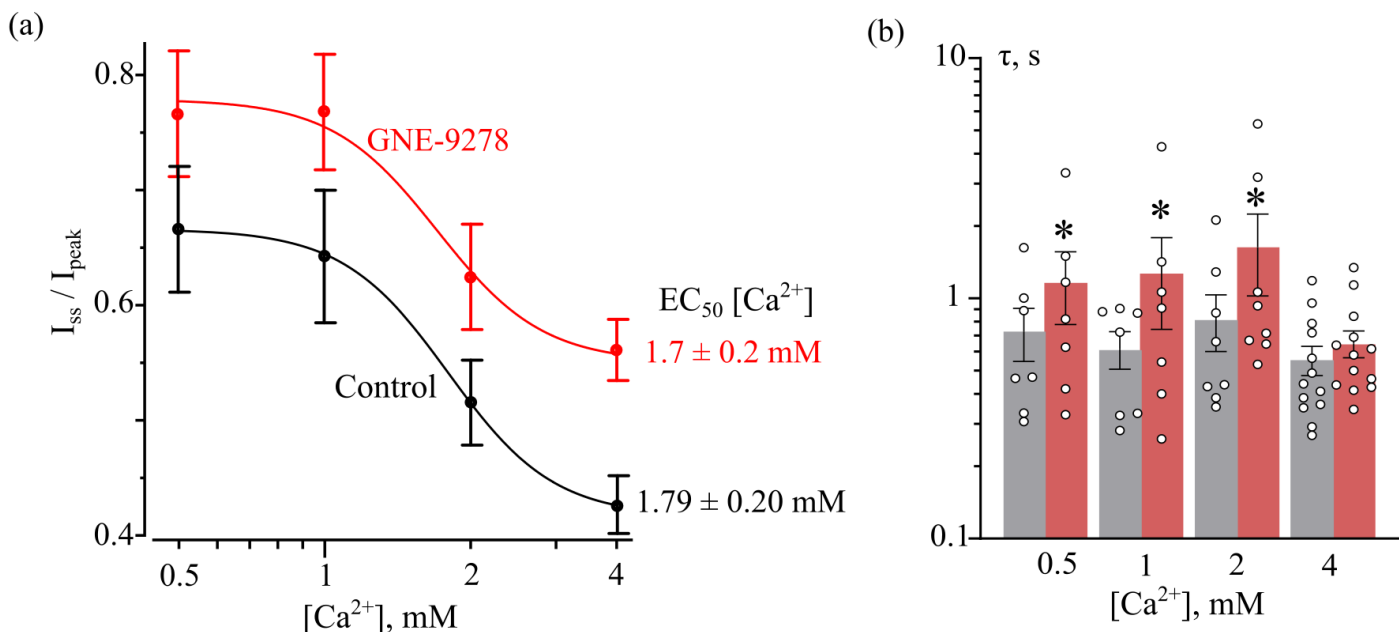


Рис. 3. Количественная зависимость влияния GNE-9278 на выраженность кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов от концентрации внеклеточного кальция.

(а) – Зависимость соотношения плато/пик (I_{ss} / I_{peak}) от концентрации внеклеточного кальция. Кружки показывают средние значения по результатам 8–14 опытов. Аппроксимация при помощи уравнения Хилла (кривые) позволила определить эффективные концентрации кальция (EC_{50}), необходимые для развития кальций-зависимой десенситизации в контроле (черный) и на фоне 10 мкМ GNE-9278. (б) – Постоянная времени спада тока от пика к равновесному состоянию при различных концентрациях внеклеточного кальция. Серые столбцы – контроль. Красные – на фоне 10 мкМ GNE-9278. Кружки показывают результаты измерений в отдельных нейронах. * – достоверные отличия от контроля, $p < 0.05$, парный t-критерий Стьюдента.

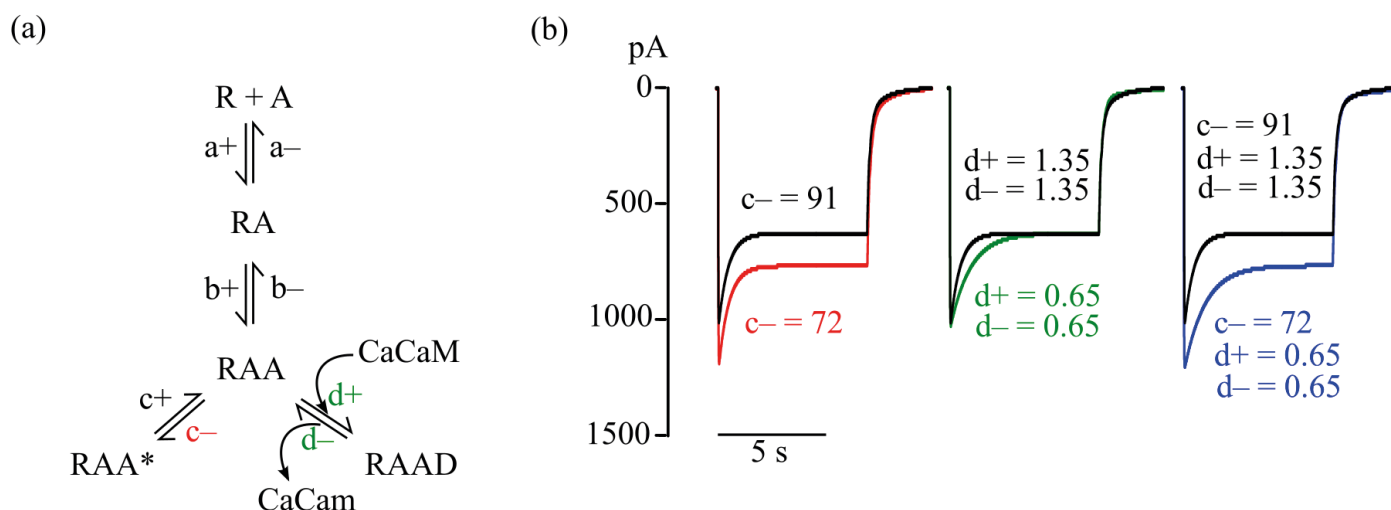


Рис. 4. Анализ возможного механизма действия GNE-9278 в рамках кинетической модели NMDA рецептора.

(a) — Математическая модель [25] использованная для симуляции и описывающая скорости перехода NMDA рецептора между состояниями: R + A — рецептор не связанный с агонистом, RA — связывание первой молекулы NMDA, RAA — связывание двух молекул NMDA, RAA* — лигандированный рецептор с открытым ионным каналом, RAAD — десенситизированный рецептор, ассоциированный с комплексом Ca^{2+} -кальмодулин (CaCaM). a, b, c и d — прямые (+) и обратные (-) скорости переходов между состояниями в s^{-1} (величины приведены в таблице 1). В модели подразумевается постоянное оккупирование GluN1 субъединицы глицином, поэтому связывание рецептора с глицином не показано. (b) — Симуляция формы токовых ответов NMDA рецепторов на 7-секундные аппликации NMDA с параметрами, наиболее соответствующими экспериментальным значениям при концентрации внеклеточного Ca^{2+} 1 mM (таблица 1). Черные кривые — Симуляция тока в контроле. Константы $d+$ и $d-$ изменены, по сравнению с опубликованной моделью чтобы соответствовать нашим экспериментальным данным. Снижение скорости деактивации рецептора ($c-$) вызывает рост амплитуды тока и изменение соотношения плато-пик — красная кривая. Изменение $c-$ не влияет на постоянную времени КЗД. Одновременное уменьшение скоростей входа ($d+$) и выхода ($d-$) рецептора из десенситизации влияет исключительно на постоянную времени десенситизации — зеленая кривая. Синяя кривая — Симуляция тока в присутствии GNE-9278. Сумма обоих эффектов изменения $c-$, $d+$ и $d-$ позволяет воспроизвести форму токового ответа, полученного в экспериментах при действии GNE-9278.

виях, даже если ПАМ вызывает снижение константы связывания агониста, это не скажется на амплитуде и форме токов.

В принципе, увеличение токов ионотропных рецепторов может определяться только тремя причинами: увеличением их проводимости, увеличением времени открытого состояния и увеличением вероятности открытого состояния. Последнее может регулироваться за счет изменения КЗД. Наблюдаемые изменения токов NMDA рецепторов при действии GNE-9278 характеризуются тремя параметрами — соотношением равновесного тока к пиковому (I_{ss} / I_{peak}), возрастанием амплитуды пикового тока ($I / I_{control}$) и постоянной времени спада (таблица 1). Для экспериментально полученных данных о форме тока в контроле достаточно подобрать значения констант $d+$ и $d-$, определяющих скорости входа в десенситизацию и выхода рецептора из десенситизированного состояния (таблица 1). Значения остальных констант ($a+$, $a-$, $b+$, $b-$, $c+$, $c-$) были взяты из опубликованной ранее модели [30].

Мы предположили, что наблюдаемые эффекты GNE-9278 связаны с влиянием на прямые и/или обратные константы скорости активации рецептора ($c+$, $c-$), что может соответствовать изменению времени открытого состояния, и входа в десенси-

тизированное состояние ($d+$, $d-$), что может приводить к изменению вероятности открытого состояния. Т.е., неактивный рецептор, связанный с агонистами (RAA), может перейти либо в активированное состояние (RAA*) с открытым ионным каналом, либо в десенситизированное (RAAD) с закрытым каналом (рис 4a).

Наблюдаемое в эксперименте увеличение амплитуды пикового тока и изменение соотношения плато-пик в присутствии GNE-9278 (таблица 1) можно смоделировать, если уменьшить скорость закрывание канала ($c-$) (рис 4b, красная кривая). Подобная симуляция не оказывает влияние на постоянную времени КЗД. Одновременное уменьшение на половину констант скорости входа в десенситизацию и выхода из десенситизированного состояния ($d+$ и $d-$) объясняет 2-кратное замедление КЗД в присутствии GNE-9278 (рис 4b, зеленая линия), но не влияет на соотношение плато-пик. Сумма этих двух эффектов позволяет воспроизвести форму экспериментально полученного тока в присутствии GNE-9278 (рис 4b, синяя линия). Таким образом, GNE-9278 вероятно одновременно замедляет переход рецептора в десенситизированное состояние и выход из него, а также снижает вероятность его деактивации т.е. закрывания канала.

Таблица 1. Кинетические параметры токов NMDA рецепторов

	Экспериментальные значения			Результат подбора параметров (с ⁻¹)							
	r I _{ss} / I _{peak}	Пиковый ток I / I _{control}	τ мс	a+	a-	b+	b-	c+	c-	d+	d-
Контроль	0.62	1	616	1·10 ⁷	4.7	5·10 ⁶	9.4	46.5	91	1.35	1.35
GNE-9278	0.78	1.16	1267	1·10 ⁷	4.7	5·10 ⁶	9.4	46.5	72	0.65	0.65

Экспериментальные значения включают выраженность десенситизации (r), амплитуду пикового тока, нормализованную к контролю и постоянную времени десенситизации (τ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку ПАМ вызывают увеличение амплитуды токов, вызываемых NMDA, мы можем ожидать связанный с этим рост входа кальция в нейроны, что, потенциально может оказать влияние на выраженность КЗД. В случае значительной разницы в эффективности ПАМ в отношении потенцирования токов эти вещества теоретически могли бы влиять на КЗД по-разному. Пиковый ток в ответ на аппликацию агониста не подвержен действию КЗД, и может быть использован для измерения эффективности потенцирования тока различными ПАМ. Поэтому мы сравнили степень увеличения пикового тока ионами меди, DTT и GNE-9278, чтобы выявить связан ли эффект этих ПАМ на КЗД со степенью потенцирования токов. Ионы меди и GNE-9278 вызывали одинаковое 16% увеличение амплитуды пиковых токов. Однако эти два ПАМ по-разному влияли на соотношение плато-пик. По-видимому, увеличение амплитуды токов не связано с особенностями действия GNE-9278 на КЗД.

Кроме того, эффективная концентрация внеклеточного кальция, необходимая для возникновения десенситизации NMDA рецепторов, не изменялась в присутствии GNE-9278. Вероятнее всего эффект GNE-9278 на КЗД ограничен влиянием на сам рецептор и не затрагивает кинетику взаимодействия рецептора с Ca_{Ca}.

Анализ изменения формы токов, активируемых NMDA, показал, что GNE-9278 изменяет два кинетических параметра: снижает скорость закрытия канала (с⁻), что согласуется с предположениями других авторов [25], а также замедляет процессы входа в десенситизацию и выхода рецептора из десенситизованного состояния (d⁺, d⁻). Последнее вероятно связано с уникальным сайтом связывания GNE-9278 во внеклеточной части трансмембранного домена в области рс-М1 GluN1 субъединицы [25], изменения конформации которой происходит в процессе КЗД [26]. Этот сайт не перекрывается с областью связывания нейростероидов [32] и лишь частично совпадает с таковой для CIQ, который потенцирует токи GluN2C и GluN2D содержащих NMDA рецепторов [33]. Однако, токи GluN2C и GluN2D содержащих рецеп-

торов не подвержены КЗД, поэтому эффект CIQ на этот процесс выявить не удалось. В отличие от CIQ, GNE-9278 менее селективен в отношении GluN2 субъединицы NMDA рецепторов и может влиять на токи GluN2A и GluN2B содержащих рецепторов, обладающих выраженной КЗД.

Возможность существования низкомолекулярных соединений, влияющих на КЗД NMDA рецепторов, является интересным с точки зрения поиска безопасных фармакологических препаратов для компенсации дефицита функций NMDA рецепторов на фоне деменций и некоторых других неврологических нейродегенеративных заболеваний. Снижение КЗД NMDA рецепторов увеличивает интегральный вход кальция при синаптической передаче. Это теоретически может увеличивать эффективность формирования феномена долговременной потенциации, связанного с процессами обучения и памяти. В связи с этим нам представляется перспективным дальнейшим изучение этого вопроса.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.А.С.), сбор данных (А.И.Ф.), обработка данных (А.И.Ф., Д.А.С.), написание и редактирование манускрипта (Д.А.С., С.М.А.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке госзадания ИЭФБ РАН 075-00264-24-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с рекомендациями Федерации ассоциаций по изучению лабораторных животных (FELASA) и одобрены Комитетами по содержанию и использованию животных Института имени И.М. Сеченова (Протокол 1-6/2022 заседания Комитета по биоэтике от 27 января 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, Swanson GT, Swanger SA, Greger IH, Nakagawa T, McBain CJ, Jayaraman V, Low CM, Dell'Acqua ML, Diamond JS, Camp CR, Perszyk RE, Yuan H, Traynelis SF (2015) Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 73(4): 298–487. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131>
- Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Huganir RL (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84: 745–755. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81052-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81052-1)
- Sibarov DA, Antonov SM (2018) Calcium-dependent desensitization of NMDA receptors. *Biochemistry (Moscow)* 83(10): 1173–1183. <https://doi.org/10.1134/S0006297918100036>
- Sibarov DA, Abushik PA, Poguzhelskaya EE, Bolshakov KV, Antonov SM (2015) Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent N-methyl-D-aspartate receptor inactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 355(3): 484–495. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227173>
- Boikov SI, Karelina TV, Sibarov DA, Antonov SM (2024) Selective inhibitor of sodium-calcium exchanger, SEA0400, affects NMDA receptor currents and abolishes their calcium-dependent block by tricyclic antidepressants. *Front Pharmacol* 15:1432718. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1432718>
- Rycroft BK, Gibb AJ (2004) Regulation of single NMDA receptor channel activity by alpha-actinin and calmodulin in rat hippocampal granule cells. *J Physiol* 557(3): 795–808. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059212>
- Zhang S, Ehlers MD, Bernhardt JP, Su CT, Huganir RL (1998) Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuron* 21(2): 443–453.
- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1996) Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. *Mol Pharmacol* 50(6): 1680–1688.
- Hill MD, Blanco M, Salituro FG, Bai Z, Beckley JT, Ackley MA, Dai J, Doherty JJ, Harrison BL, Hoffmann EC, Kazdoba TM, Lanzetta D, Lewis M, Quirk MC, Robichaud AJ (2022) SAGE-718: A first-in-class N-methyl-D-aspartate receptor positive allosteric modulator for the potential treatment of cognitive impairment. *J Med Chem* 65(13): 9063–9075. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00313>
- Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 463–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.002335>
- Skatchkov SN, Antonov SM, Eaton MJ (2016) Glia and glial polyamines. Role in brain function in health and disease. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 10: 73–98. <https://doi.org/10.1134/S1990747816010116>
- Bowlby MR (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 43: 813e819.
- Paul SM, Doherty JJ, Robichaud AJ, Belfort GM, Chow BY, Hammond RS, Crawford DC, Linsenbardt AJ, Shu HJ, Izumi Y, Mennerick SJ (2013) The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurosci* 33: 17290–17300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2619-13.2013>
- Skeberdis VA, Chevaleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, Lin Y, Bennett MV, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci* 9(4): 501–510. <https://doi.org/10.1038/nn1664>
- Jackson MF, Konarski JZ, Weerapura M, Czerwinski W, MacDonald JF (2006) Protein kinase C enhances glycine-insensitive desensitization of NMDA receptors independently of previously identified protein kinase C sites. *J Neurochem* 96(6): 1509–1518. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03651.x>
- Köhr G, Eckardt S, Lüddens H, Monyer H, Seeburg PH (1994) NMDA receptor channels: Subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron* 12: 1031–1040. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90311-5)
- Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066–1071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
- Marchetti C, Baranowska-Bosiacka I, Gavazzo P (2014) Multiple effects of copper on NMDA receptor currents. *Brain Res* 1542: 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.029>
- Sibarov DA, Boikov SI, Karelina TV, Antonov SM (2020) GluN2 Subunit-dependent redox modulation of NMDA receptor activation by homocysteine. *Biomolecules* 10: 1441. <https://doi.org/10.3390/biom10101441>
- Zhang XL, Li YX, Berglund N, Burgdorf JS, Donello JE, Moskal JR, Stanton PK (2024) Zelquistinel acts at an extracellular binding domain to modulate intracellular calcium inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology* 6; 259:110100. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.110100>
- Yakovlev AV, Kurmasheva E, Ishchenko Y, Giniatullin R, Sitdikova G (2017) Age-dependent, subunit specific action of hydrogen sulfide on GluN1/2A and GluN1/2B NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 11: 375. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00375>
- Chen CQ, Xin H, Zhu YZ (2007) Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacol Sin*. 28(11): 1709–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00629.x>. PMID: 17959020.
- Varga V, Jenei Z, Janáky R, Saransaari P, Oja SS (1997) Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem Res* 22(9): 1165–1171. <https://doi.org/10.1023/a:1027377605054>. PMID: 9251108.

24. Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky LJr (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* 24(46): 10318–10325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2099-04.2004>
25. Wang TM, Brown BM, Deng L, Sellers BD, Lupardus PJ, Wallweber HJA, Gustafson A, Wong E, Volgraf M, Schwarz JB, Hackos DH, Hanson JE (2017) A novel NMDA receptor positive allosteric modulator that acts via the transmembrane domain. *Neuropharmacology*, 121: 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.041>
26. Bhatia NK, Carrillo E, Durham RJ, Berka V, Jayaraman V (2020) Allosteric changes in the NMDA receptor associated with calcium-dependent inactivation. *Biophys J* 119(11): 2349–2359. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.045>.
27. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529–540. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
28. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA Receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
29. Mironova EV, Evstratova AA, Antonov SM (2007) A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J Neurosci Meth* 163(1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.010>
30. Lester RA, Jahr CE (1992) NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J Neurosci* 12(2): 635–643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00635.1992>
31. Sullivan JM, Traynelis SF, Chen HS, Escobar W, Heinemann SF, Lipton SA (1994) Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13(4): 929–936. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90258-5).
32. Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH (2004) A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8198–8203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401838101>
33. Ogden KK, Traynelis SF (2013) Contribution of the M1 transmembrane helix and pre-M1 region to positive allosteric modulation and gating of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol pharmacol* 83(5): 1045–1056. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085209>

THE ROLE OF CALCIUM-DEPENDENT DESENSITIZATION IN THE POTENTIATION BY GNE-9278 OF NMDA RECEPTOR CURRENTS IN RAT CORTAL NEURONS *IN VITRO*

A. I. Fedorina, S. M. Antonov and D. A. Sibarov[#]

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

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

To compensate for the lack of functions of NMDA receptors in the central nervous system against the background of dementia, positive allosteric modulators (PAMs) are of great interest. Known PAMs increase the amplitude of integral ion currents carried by NMDA receptors, but do not affect the calcium-calmodulin dependent desensitization of the latter. We studied the possibility of modulating NMDA receptor desensitization by the newly synthesized PAM GNE-9278, which has a unique binding site on the transmembrane domain. Experiments were performed on native NMDA receptors expressed in rat neocortical neurons in primary tissue culture. Using the “patch-clamp” method of recording transmembrane currents, a comparative study of the effect of three substances potentiating NMDA receptor currents on the desensitization of these receptors was carried out: GNE-9278 (10 μM), dithiothreitol (1 mM) and copper ions (5 μM). These substances increased the amplitude of currents evoked by 100 μM NMDA, but only GNE-9278 reduced the difference between steady-state and peak current amplitudes by 15%. In addition, GNE-9278 doubled the decay time constant from peak to steady state, i.e., weakened the desensitization of NMDA receptors. Because GNE-9278 did not alter the effective extracellular calcium concentration to generate desensitization, its effect likely does not affect the receptor's interaction with calmodulin. Analysis of the shape of the currents within the framework of the kinetic model revealed that GNE-9278 reduces two kinetic parameters: the rate of channel closure, which determines the time of the open state, as well as the rates of entry into and exit of the receptor from the desensitized state, which determine the probability of the open state of the channel. Modulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization distinguishes GNE-9278 from other known PAMs, which is likely determined by the binding site of GNE-9278 in the pre-M1 domain of the GluN1 subunit.

Keywords: ion channels, calcium, NMDA, desensitization, GNE-9278

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРОЛАКТИНА И ПРОЛАКТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ТРЁХИГЛОЙ КОЛЮШКИ *G. ACULEATUS L.*: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ПОЛА И ПРЕСНОВОДНОЙ АДАПТАЦИИ

© 2024 г. Н. С. Павлова^{1, *}, Т. В. Неретина², О. В. Смирнова¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия
Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова, Карельская республика, Россия

*e-mail: pav.nad.ser@gmail.com

Поступила в редакцию 13.06.2024 г.

После доработки 08.09.2024 г.

Принята к публикации 10.09.2024 г.

Данная работа фокусируется на половых различиях экспрессии гена пролактина (*Prl1*) в мозге и его рецепторов (*PrlRa* и *PrlRb*) в осморегуляторных органах (мозге, почках, жабрах и кишечнике) самок и самцов трёхиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus L.*) в ходе пресноводной адаптации. Особи морской морфы колюшки были отловлены в нерестовый период и в течение 72 ч адаптированы к условиям пресной воды. После этого экспрессия генов интереса была оценена с использованием метода РТ-ПЦР. За счёт повышения экспрессии гена *Prl1* в мозге самок в условиях пресноводной адаптации проявлялись половые различия, отсутствовавшие в условиях морской воды. Экспрессия гена *PrlRa* в мозге была ниже у самок по сравнению с самцами в условиях морской воды, однако после перехода в пресную воду достоверно повышалась, и после пресноводной адаптации этот параметр был сопоставим у особей обоих полов. Экспрессия гена *PrlRb* в мозге самок достоверно повышалась в ходе пресноводной адаптации. В почках экспрессия гена *PrlRa* не различалась у самок и самцов в контрольной группе, и снижалась у особей обоих полов в ходе адаптации к пресной воде. Экспрессия гена *PrlRb* в почках не зависела от пола особей контрольной группы, а после адаптации к пресной воде достоверно повышалась у самок, но снижалась у самцов, таким образом приводя к появлению половых различий после пресноводной адаптации. В жабрах экспрессия генов *PrlRa* и *PrlRb* не зависела ни от пола особей, ни от солёности среды содержания. Экспрессия гена *PrlRa* в кишечнике не зависела ни от пола особей, ни от солёности среды. Экспрессия гена *PrlRb* в кишечнике не зависела от пола и после пресноводной адаптации снижалась у самок и самцов. Таким образом, зависимость осморегуляторной функции пролактина от пола колюшек проявляется в половых различиях экспрессии самого гена пролактина в мозге и в сенсibilизации мозга и осморегуляторных органов к нему в ходе пресноводной адаптации.

Ключевые слова: пролактин, пролактиновый рецептор, трёхиглая колюшка, водно-солевой обмен, пресноводная адаптация, зависимость от пола

DOI: 10.31857/S0044452924050101, EDN: ХОТСМЛ

ВВЕДЕНИЕ

Пролактин – пептидный гормон, имеющий плейотропное действие: описано более сотни различных физиологических функций пролактина у позвоночных, включая лактацию, осморегуляцию, рост, репродукцию и иммунную функцию [1, 2]. Классически считается, что основной функцией пролактина у низших позвоночных является регуляция водно-солевого обмена. Адаптация организма эвригалинных видов рыб, таких как мозамбикская тиляпия *Oreochromis mossambicus*, азиатский паралихт *Paralichthys olivaceus*, антарктическая рогатка *Harpagifer antarcticus*, к пресной воде сопряжена с изменением осмолярности плазмы крови и

стимуляцией пролактиновой оси, что выражается в увеличении экспрессии хотя бы одного из двух генов пролактина в мозге и повышением концентрации хотя бы одного из двух пролактинов в плазме крови [3, 4]. Это часто сопровождается изменением чувствительности к пролактину осморегуляторных органов рыб, в частности, почек, жабр и кишечника, что выражается в изменении экспрессии генов пролактиновых рецепторов. Финальным эффектом осморегуляторной функции пролактина является изменение транскрипционной активности генов ионных транспортёров, таких как NCC, NKCC1a, NHE3, CFTR, AQP3, AQP8, NKAα1a, NKAα1b [4, 5]. Примечательно, что в подобных работах выборку рыб не разделяют по полу.

Репродуктивная функция пролактина у рыб была открыта позже и изучена хуже. Однако известно, что пролактиновая ось (уровни мРНК гена пролактина) меняется при половом созревании рыб: она приобретает зависимость от пола, становясь менее активной у самок *Takifugu rubripes*, оставаясь без изменений у самцов [6].

Интенсивность пролактинового сигналинга и, как следствие, эффекта, зависит не только от уровня центральной секреции гормона, но и от плотности рецепторов на тканях и органах-мишенях. Различия в локальной экспрессии генов рецепторов лежат в основе тканеспецифичной регуляции со стороны гормона.

Трёхиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus L.* является эвригалинной и имеет сложное репродуктивное и родительское поведение, таким образом, обладая и высокой осморегуляторной пластичностью, и ярко выраженными половыми различиями [7]. Разными авторами была показана ключевая роль пролактина в родительском поведении у самцов колюшек, которое выражается в аэрации гнёзд с икрой плавниками [8–10]. У колюшек (без разделения по полу) гипофизарная секреция пролактина снижается при адаптации к морской воде, а изменение размеров клубочков почки в ответ на введение пролактина различалось между колюшками морской формы, адаптированными и не адаптированными к пресной воде [11, 12]. Таким образом, известно участие пролактина как в осморегуляторной, так и в репродуктивной функции колюшек, однако комплексный эффект пролактина в контексте зависимости от пола пресноводной адаптации до сих пор остается неизученным.

Ранее в нашей группе была показана неодинаковая у самок и самцов суточная динамика экспрессии генов *Prl1*, *PrlRa* и *PrlRb* в ткани мозга при острой 24-часовой пресноводной адаптации, а также зависимость от пола и пресноводной адаптации экспрессия генов опсинов в сетчатке глаза [13, 14]. Целью данной работы стало изучение сенсibilизации мозга и осморегуляторных органов к действию пролактина в модели хронической, 72-часовой, адаптации особей к условиям пресной воды. Выбор более долгого временного интервала эксперимента обусловлен предположением о том, что в течение трёх суток организм колюшек адаптируется к новым условиям не только на уровне экспрессии пролактина, но и на уровне изменения чувствительности к нему осморегуляторных тканей.

Нами было выдвинуто предположение о том, что в ходе пресноводной адаптации самок и самцов трёхиглой колюшки изменение экспрессии гена пролактина в мозге и генов его рецепторов в мозге, почках, жабрах и кишечнике может зависеть от пола и определенный вклад в это может вносить сам пролактин. Наша работа поможет оценить вза-

имосвязи механизмов пролактиновой регуляции водно-солевого обмена и репродуктивной системы. Таким образом, целью данного исследования стала оценка изменения экспрессии генов пролактина в мозге и генов пролактиновых рецепторов в мозге, жабрах, почках и кишечнике самок и самцов трёхиглой колюшки в модели пресноводной адаптации.

Поскольку у самок и самцов трёхиглой колюшки различается половое и родительское поведение, а у самцов в почках также при нересте синтезируется белок спиггин, необходимый для строительства гнезда, мы предполагаем зависимость функции этих органов от пола. Жабры и кишечник – ключевые органы осморегуляции рыб, контактирующие не только с внутренней средой организма, но и с внешней, следовательно, мы предполагаем большую независимость этих органов от факторов внутренней среды, включая эндокринные, и большую чувствительность к факторам внешней среды, таким как ее осмолярность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная модель. Особи морской морфы *G.aculeatus L.* были отловлены в Кандалакшском заливе Белого моря в июне 2021 г. в период нереста. Длина тела самок 7 ± 0.3 см, самцов – 6.6 ± 0.4 см. Далее особей разделили по полу, разбили на контрольную и опытную группы и в течение суток адаптировали к условиям содержания (аквариумы объёмом 20 л., световой и температурный режим, соответствующие естественным условиям). Затем в течение трёх суток особи контрольной группы содержались в условиях морской воды (“Control”), а особи экспериментальной группы – в условиях пресной воды (“72h FA”). $n = 10$ для каждой группы. По завершении эксперимента у особей хирургическим путём извлекали ткань мозга, включая гипофиз (для контроля экспрессии гена пролактина), почки, жабры (жаберные лепестки), а также кишечник; образцы фиксировали в IntactRNA (“Евроген”, Россия). Также определяли морфометрические показатели: гепатосоматический (относительная масса печени) и реносоматический (относительная масса почек) индексы. Относительные уровни экспрессии генов интереса в тканях проводили с использованием методики, описанной в наших предыдущих исследованиях [13, 14]. Последовательности праймеров к генам интереса и референсным генам приведены в таблице 1.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 9 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа two-way ANOVA с поправкой Шидака. В качестве исследуемых факторов были выбраны пол и наличие или отсутствие пресноводной адаптации. На графиках для каждой груп-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров к генам интереса и референсным генам, а также длина ПЦР-продукта.

Ген	Нуклеотидная последовательность прямого (for) и обратного (rev) праймеров, 5'–3'	Длина ПЦР-продукта, п.н.
<i>Prl1</i>	for – ACCTGGACTCGCATTTGCCTCTC rev – AAGGTCCGACTCTGGTACTTGAAG	125
<i>Prl2</i>	for – TCCAATAAAGCCCTAGAGATGAG rev – AGGCTGCTGACGGTGTGCTTAT	113
<i>PrlRa</i>	for – CGGCGATCTGGGTCAACTAC rev – GGAGGATTAGGCTGAACGATGT	112
<i>PrlRb</i>	for – CGACGACAGCCCTCTACTT rev – GACGTGTACTCTGCCCACTT	132
<i>Rpl13α</i>	for – CACCTTGGTCAACTTGAACAGTG rev – TCCCTCCGCCCTACGAC	178
<i>Ubc</i>	for – AGACGGGCATAGCACTTGC rev – CAGGACAAGGAAGGCATCC	180

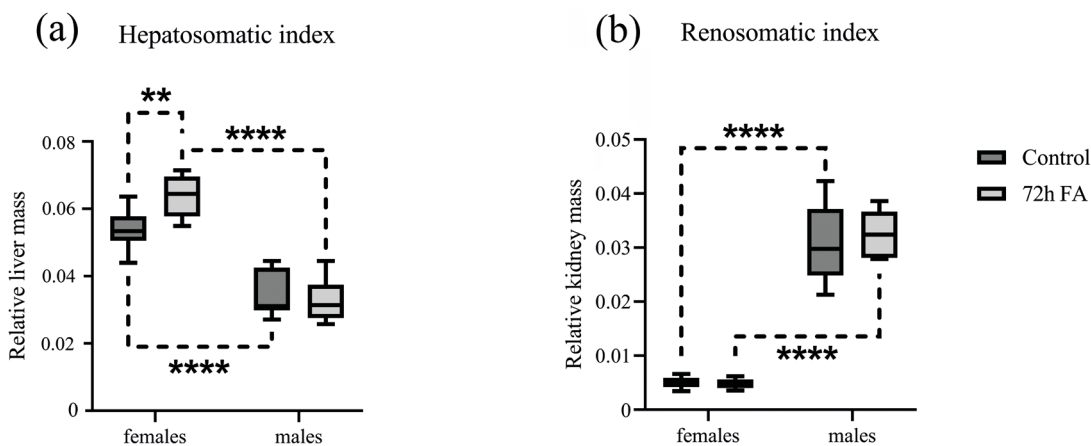


Рис. 1. Изменение гепатосоматического (a) и реносоматического (b) индексов в группах самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительная масса печени (a) и почек (b). По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхиглой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (** – $p < 0.01$; **** – $p < 0.0001$, two-way ANOVA).

пы данные представлены в виде медианы, нижней и верхней квартили, а также минимального и максимального значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации на морфометрические показатели

Гепатосоматический индекс у самок был выше, чем у самцов за счет продукции их печенью вителлогенина и дополнительно повышался при переходе в пресную воду (рис. 1a), а у самцов остался без изменений. Реносоматический индекс ни у самок, ни у самцов не зависел от условий солёности среды (рис. 1b) и был существенно выше у самцов за счет продукции почками спиггина, необходимого для постройки гнезда.

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактинов *Prl1*, *Prl2* и генов пролактиновых рецепторов *PrlRa*, *PrlRb* в ткани мозга колюшек

Достоверных различий в экспрессия гена пролактина *Prl1* в мозге самок и самцов контрольной группы обнаружено не было. После 72-часовой пресноводной адаптации выявлено достоверное повышение экспрессии гена *Prl1* в мозге самок по сравнению с контролем ($p = 0.03$, рис. 2a), при отсутствии изменений данного показателя в этих условиях у самцов. В результате при пресноводной адаптации стали выявляться половые различия уровня экспрессии данного гена: у самое она была выше, чем у самцов ($p = 0.002$, рис. 2a).

Уровни экспрессии мРНК гена *Prl2* в ткани мозга самок и самцов в условиях морской воды, а также

после 72-часовой пресноводной адаптации были обнаружены на разрешающей границе метода ПЦР в реальном времени ($C_q > 32$).

В мозге самцов экспрессия гена *PrIRa* в условиях морской воды была выше, чем у самок ($p = 0.003$, рис. 2b). В ткани мозга самок после 72-часовой пресноводной адаптации экспрессия гена *PrIRa* росла по сравнению с контрольной группой ($p = 0.01$, рис. 2b). В группе самцов после пресноводной адаптации не было обнаружено достоверных различий экспрессии гена *PrIRa* по сравнению с контрольной группой. За счет этого половые различия экспрессии гена пролактинового рецептора а *PrIRa* в пресной воде перестали выявляться ($p > 0.1$).

Экспрессия гена *PrIRb* в ткани мозга наблюдалась на сопоставимом уровне при сравнении самок и самцов в условиях морской воды и после пресноводной адаптации. По сравнению с контрольной группой в ткани мозга самок после 72-часовой пресноводной адаптации экспрессия гена *PrIRb* была на достоверно более высоком уровне ($p = 0.04$, рис. 2c), не достигая достоверных различий с данным показателем у самцов в этих условиях.

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактиновых рецепторов PrIRa и PrIRb в ткани почек колюшек

Уровни экспрессии гена пролактинового рецептора а *PrIRa* в ткани почек в условиях морской воды достоверно различались между группами самок и самцов с преобладанием у самок ($p < 0.0001$, рис. 3a). После 72-часовой пресноводной адаптации в ткани почек наблюдались сопоставимые статистически значимые половые различия экспрессии уровня мРНК гена *PrIRa* ($p = 0.0001$, рис. 3a). Как у самцов, так и у самок, группы после 72-часовой пресноводной адаптации имели сопоставимые уровни экспрессии гена *PrIRa* по сравнению с контрольными группами (рис. 3a).

Уровни экспрессии гена пролактинового рецептора б *PrIRb* в ткани почек в условиях морской воды не различались достоверно между группами самок и самцов. После 72-часовой пресноводной адаптации экспрессия гена *PrIRb* в ткани почек наблюдалась на более высоком уровне в группе самок по сравнению с группой самцов ($p < 0.0001$, рис. 3b). Это происходило за счет того, что в ткани почек самок после 72-часовой пресноводной адаптации, наблюдались статистически значимо более высокие уровни мРНК гена *PrIRb* по сравнению с контрольной группой ($p = 0.03$, рис. 3b), а в ткани почек самцов после 72-часовой пресноводной адаптации наблюдались статистически более низкие уровни мРНК гена *PrIRb* по сравнению с контрольной группой ($p < 0.0001$, рис. 3b).

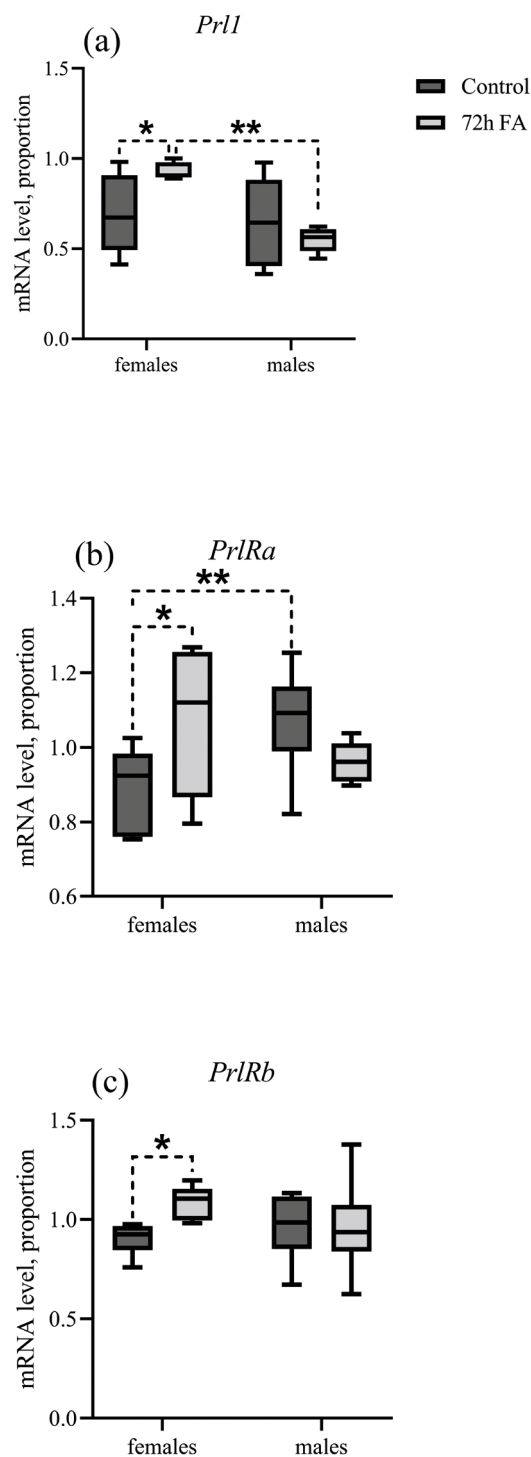


Рис. 2. Экспрессия генов *PrII*, *PrIRa* и *PrIRb* в ткани мозга самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактина *PrII* (a) и пролактиновых рецепторов *PrIRa* (b) и *PrIRb* (c) в ткани мозга. По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхглазой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$, two-way ANOVA).

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани жабр колюшек

Достоверные различия в экспрессии генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани жабр между группами самок и самцов колюшек не были обнаружены ни в условиях морской, ни в условиях пресной воды (рис. 4а, 4б).

Также ни для группы самок, ни для группы самцов не были обнаружены значимые различия в экспрессии генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* после 72-часовой пресноводной адаптации в сравнении с условиями морской воды (рис. 4а, 3б).

Влияние 72-часовой пресноводной адаптации и пола на экспрессию генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани кишечника колюшек

Уровни экспрессии гена пролактинового рецептора а *PrlRa* в ткани кишечника не различались достоверно между группами самок и самцов ни в условиях морской воды, ни после пресноводной адаптации. Также ни в группе самок, ни в группе самцов не было выявлено достоверных изменений относительных количеств мРНК гена *PrlRa* при сравнении контрольной и опытной группы (рис. 5а).

Относительные количества мРНК гена *PrlRb* в ткани кишечника не различались между группами

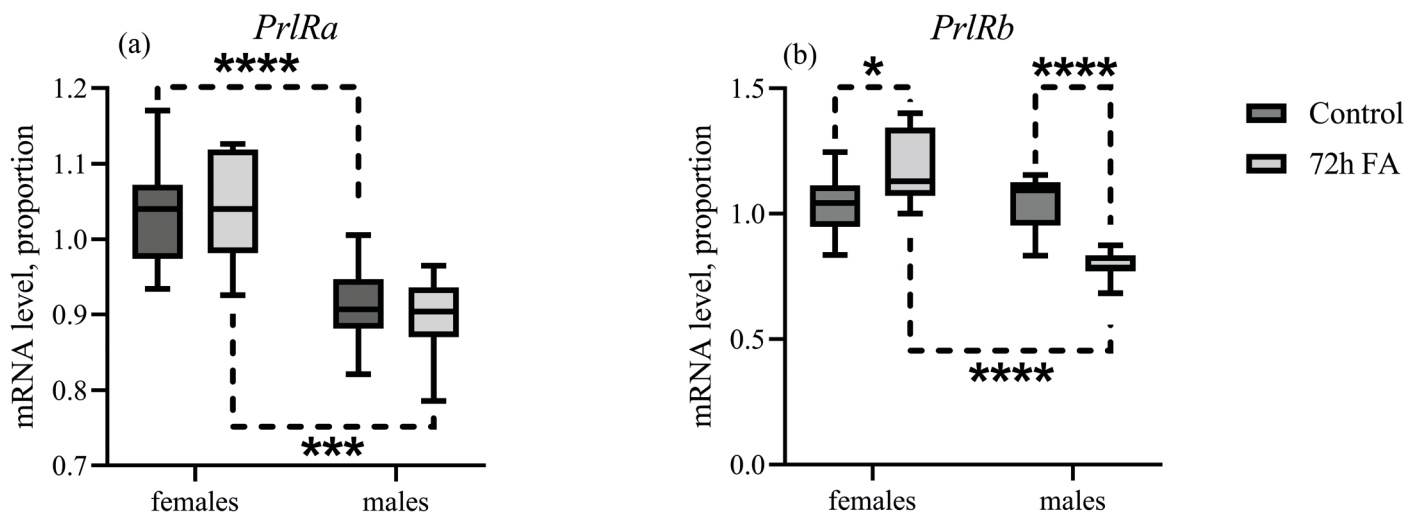


Рис. 3. Экспрессия генов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани почек самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* (а) и *PrlRb* (б) в ткани почек. По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхиглой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (* – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$, two-way ANOVA).

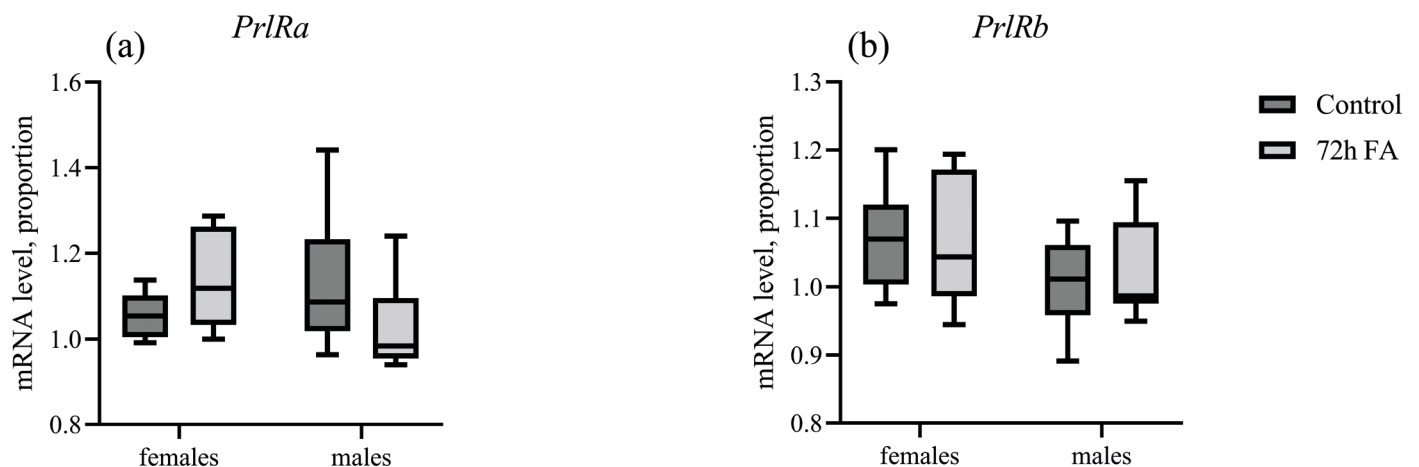


Рис. 4. Экспрессия генов *PrlRa* и *PrlRb* в ткани жабр самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактиновых рецепторов *PrlRa* (а) и *PrlRb* (б) в ткани жабр. По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхиглой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$.

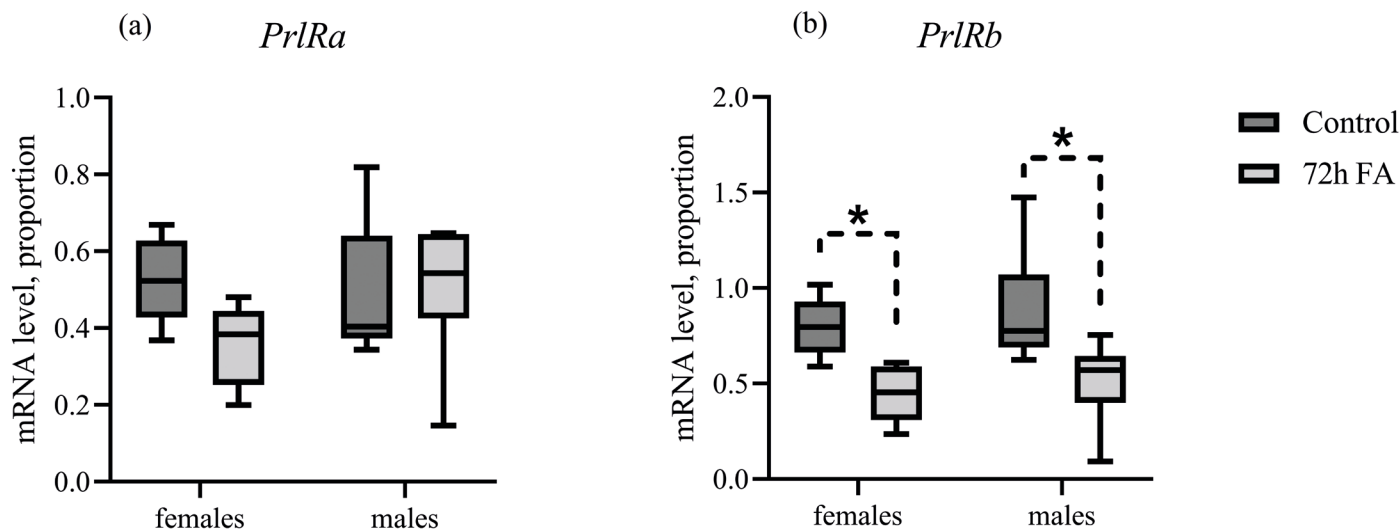


Рис. 5. Экспрессия генов *Pr1Ra* и *Pr1Rb* в ткани кишечника самок и самцов колюшек в зависимости от пола и адаптации к пресной воде. По оси Y: относительные уровни мРНК генов пролактиновых рецепторов *Pr1Ra* (a) и *Pr1Rb* (b) в ткани кишечника. По оси X: группы самок (“females”) и самцов (“males”) трёхиглой колюшки в условиях морской воды (“control”, тёмно-серые ящики) и после 72-часовой пресноводной адаптации (“72h FA”, светло-серые ящики). Количество в каждой группе: $n = 10$. Пунктирная линия указывает группы, между которыми обнаружены статистически значимые различия (* – $p < 0.05$, two-way ANOVA).

самок и самцов ни в условиях морской воды, ни после пресноводной адаптации. Тем не менее, и у самок, и у самцов наблюдались достоверные различия в экспрессии гена *Pr1Rb* в кишечнике при сравнении контрольной и опытной групп ($p = 0.022$ для самок, $p = 0.017$ для самцов, рис. 5b).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние пресноводной адаптации на экспрессию гена Pr1 в мозге и Pr1Ra и Pr1Rb в мозге, жабрах, почках и кишечнике самок и самцов трёхиглой колюшки

В результате пресноводной адаптации достоверно увеличилась экспрессия гена *Pr1* в мозге самок, но не самцов трёхиглой колюшки (рис. 2a). Эти результаты согласуются с результатами предыдущих наших исследований, посвящённых половым различиям пролактиновой оси трёхиглой колюшки [13, 14]. Для ряда других видов рыб (*Argyrosomus regius*, *Danio rerio*, *Oreochromis mossambicus*, *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus*) также характерна стимуляция экспрессии гена пролактина в условиях пресноводной адаптации, однако стоит учитывать, что данные исследования были выполнены для общих выборок, включающих в себя особей обоих полов без разделения [3, 4, 15–18]. Таким образом, экспрессия гена *Pr1* у самок колюшек, как и у других эвригалинных видов рыб, положительно

зависит от гипоосмолярности внутренней среды, которая, судя по литературным данным, может напрямую влиять на экспрессионную и секреторную активность лактотрофов гипофиза [19].

Сонаправленно под действием 72-часовой пресноводной адаптации в ткани мозга самок колюшек изменяется и экспрессия генов обоих пролактиновых рецепторов (рис. 2b, 2c). На основании этих результатов можно предположить участие пролактина в регуляции транскрипции генов *Pr1Ra* и *Pr1Rb* в мозге самок трёхиглой колюшки, либо возможную сонаправленную регуляцию генов *Pr1*, *Pr1Ra* и *Pr1Rb* в ткани мозга. Известно, что у млекопитающих экспрессия пролактиновых рецепторов положительно зависит в том числе от самого пролактина [20]. В сравнении, у мозамбикской тилапии *Oreochromis mossambicus* в условиях пресной воды экспрессия гена *Pr1R2* в гипофизе ниже, чем в условиях морской воды, а экспрессия гена *Pr1R1* не зависит от солёности воды [4, 21]. Следовательно, односторонняя регуляция экспрессии генов пролактина и его рецепторов в мозге может зависеть не только от пола особи, но и от вида рыб, и может быть связана с видоспецифическими особенностями репродукции.

В ткани почек колюшек от солёности среды зависела экспрессия гена *Pr1Rb*, достоверно повышаясь у самок, но снижаясь у самцов под влиянием пресноводной адаптации (рис. 3b). Противоположный эффект у особей разного пола может быть связан

с эффектом половых стероидов. Так, для человека была показана положительная регуляция экспрессии гена пролактинового рецептора со стороны эстрадиола [20, 22, 23]. Переход в гипоосмолярную среду сопровождается выбросом кортизола и сравним с кратковременной стрессовой реакцией, следовательно, логично предположить необходимость устанавливать заново иерархию среди особей мужского пола. Это может быть сопряжено с усилением андрогенных эффектов у самцов, классически антагонистичных эстрогенным эффектам.

В ткани жабр экспрессия обоих генов пролактиновых рецепторов достоверно не изменилась под влиянием пресноводной адаптации ни у самок, ни у самцов (рис. 4а, 4б). Схожие результаты были получены в эксперименте по изучению механизмов активной и пассивной адаптации к пресной воде на смешанной по полу выборке азиатского паралихта *Paralichthys olivaceus*. Вне зависимости от поведенческого типа адаптации, экспрессия рецептора пролактина в ткани жабр *P. olivaceus* достоверно не менялась [24]. В жабрах тилапии *Oreochromis mossambicus* экспрессия гена пролактинового рецептора *PrlR1* наблюдалась на более высоком уровне у особей, содержащихся в условиях пресной воды по сравнению с морским контролем, в то время как экспрессия гена *PrlR2* достоверно не различалась между особями обеих групп [4]. В другом исследовании было показано, что при адаптации и *O. mossambicus*, и *O. niloticus* к морской воде, уже в первые сутки у особей обоих видов экспрессия гена второго пролактинового рецептора достоверно снижается [25]. Подобные видовые различия могут быть связаны с тем, что тилапии обычно обитают в среде с динамично меняющейся солёностью, и чувствительность их жабр к пролактину, а также экспрессия ионных транспортёров обладают большей пластичностью [26]. В жабрах *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus* и *Acanthopagrus schlegelii* в условиях пресноводной адаптации экспрессия гена единственного известного для этих видов пролактинового рецептора *PrlR* также повышалась [3, 18, 27]. Тем не менее, учитывая достоверное повышение экспрессии гена пролактина *Prl1* в мозге у самок трёхиглой колюшки, мы предполагаем больший вклад пролактина в регуляцию ткани жабр самок в условиях пресной воды, несмотря на отсутствие изменения содержания в ткани мПНК *PrlRa* и *PrlRb* при адаптации к пресной воде.

В ткани кишечника экспрессия гена *PrlRb* достоверно снизилась как у самок, так и у самцов (рис. 5б). Похожие данные были получены на мозамбикской тилапии, в кишечнике которой при адаптации к морской воде достоверно растёт экс-

прессия гена *PrlR2*. Следовательно, у мозамбикской тилапии в условиях пресной воды экспрессия *PrlR2* в кишечнике ниже [28, 29]. Один из эффектов пролактина в кишечнике рыб – уменьшение захвата Na^+ , поэтому снижение экспрессии гена *PrlRb* в ходе пресноводной адаптации может рассматриваться как компенсаторный механизм для повышения захвата ионов Na^+ из просвета кишечника [30].

Интересно отметить, что экспрессия гена *PrlRa* в жабрах, почках и кишечнике не изменилась достоверно в ходе 72-часовой пресноводной адаптации ни у самок, ни у самцов (рис. 3а, 4а, 5а). Это позволяет выдвинуть предположение о том, что пролактиновый рецептор b, но не a, является ключевым в регуляции водно-солевого баланса.

Различия, связанные с полом особей трёхиглой колюшки, в условиях морской воды и пресноводной адаптации

В условиях морской воды различия, связанные с полом особей, наблюдались в экспрессии гена *PrlRa* в мозге и почках (рис. 2б, 3а). И мозг, и почки принимают участие в репродукции у колюшек: мозг по причине наличия у колюшек сложного репродуктивного и родительского поведения, а в почках у самцов под влиянием андрогенов синтезируется белок спиггин, который они используют для построения гнёзд. Реносоматический индекс самцов (рис. 1б) при пресноводной адаптации остался столь же высоким, как и в условиях морской воды, поскольку самцы так же остались на этапе установления иерархии. Возможно, репродуктивная функция пролактина реализуется преимущественно через пролактиновый рецептор a, однако данное предположение требует дополнительных доказательств. Так, по данным литературы, пролактин стимулирует экспрессию гена *Egr-1* в гипоталамусе крыс, в то время как этот ген повышается в мозге самцов колюшек в период заботы о потомстве [31, 32].

После пресноводной адаптации различия, связанные с полом особей, наблюдались в экспрессии гена *Prl1* в мозге, что подтверждает его ключевую роль для организма самок (рис. 2а). Более того, гепатосоматический индекс самок после перехода в пресную воду достоверно повысился (рис. 1а). Гепатосоматический индекс отражает продукцию печени зависимо от эстрогенов белка вителлогенина, являющимся основным компонента желтка. Резонно предположить, что эстрогены могут стимулировать продукцию вителлогенина не только прямо, но через пролактин, являясь основными стимуляторами его продукции. Экспрессия гена

Prl1 в мозге самок при пресноводной адаптации соответствует классическим представлениям о пролактине рыб как гормоне пресноводной адаптации, в то время как у самцов она может находиться под влиянием более сложных и многокомпонентных регуляторных систем [33]. Сохранились различия в экспрессии гена *PrlRa* в почке с преобладанием у самок по сравнению с самцами (рис. 3а). Мы предполагаем, что транскрипция гена *PrlRa* в ткани почек регулируется преимущественно половыми гормонами, включая половые стероиды, и в меньшей степени зависит непосредственно от пролактина и условий солёности воды. Экспрессия гена *PrlRb* в почках, которая в условиях морской воды у самок и самцов наблюдалась на сопоставимом уровне, после пресноводной адаптации была достоверно выше у самок (рис. 3б). Известно, что в условиях пресноводной адаптации в почках *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus* и *Acanthopagrus schlegelii* экспрессия гена единственного известного для этих видов рыб пролактинового рецептора *PrlR* достоверно повышалась по сравнению с контролем [3, 18, 27]. Таким образом, эффект адаптации к условиям пресной воды, оказываемый на экспрессию гена пролактинового рецептора *b* в почках самок колюшек согласуется с литературными данными, полученными на других видах рыб без разделения выборки по полу.

Наличие половых различий в экспрессии гена пролактина в пресной воде, предположительно, связано с эффектом половых стероидов, в первую очередь, эстрадиола. Эстрогены стимулируют секрецию пролактина не только у млекопитающих, но также у рыб как *in vitro*, так и *in vivo* на примере *Oreochromis mossambicus* и *Clarias batrachus* [20, 34, 35]. На *O. niloticus* было показано, что экспрессия гена пролактинового рецептора 2 *PrlR2* в ткани яичников положительно регулируется эстрадиолом [36]. Эффекты андрогенов и пролактина в репродуктивном периоде рыб противопоставляются: андрогены принимают участие в опосредовании фазы конкуренции между самцами и ухаживания за самками, а пролактин — последующую заботу о потомстве у таких видов, как *Lepomis macrochirus* и *Gasterosteus aculeatus* [10, 37]. Следовательно, условия пресной воды и стимуляция пролактиновой оси у самок при пресноводной адаптации могут вовлекать гонадотропную ось в потенцирование эффекта пролактина, оказываемого на почки, в то время как у самцов вклад пролактина в регуляцию этого органа снижается. В результате данной работы можно выдвинуть предположение о наличии регуляции эстрогенами экспрессии не только гена пролактина, но и генов пролактиновых рецепторов в мозге и почке.

Интересно отметить, что различия, связанные с полом, наблюдаются только в мозге и почках трёхглазой колюшки. Мозг и почки являются органами, зависящими от внутренних факторов, и их чувствительность к пролактину в условиях адаптации к пресной воде уже проявляет зависимость от пола. Более того, оба органа непосредственно участвуют в репродукции колюшек либо в плане поведения (мозг), либо в плане продукции ползависимых белков (синтез спиггина в почках самцов). Различная чувствительность мозга и почек к пролактину у особей разного пола способствует соответствующим репродуктивным функциям.

Наоборот, несмотря на различную степень активации пролактиновой оси со стороны центральной секреции у самок и самцов колюшек, чувствительность жабр и кишечника к пролактину не зависит от пола. Поскольку и жабры, и кишечник контактируют не только с внутренней, но и с внешней средой, их ответ может во многом определяться влияниями со стороны внешней среды. Опосредованные пресноводной адаптацией влияния пролактиновой оси со стороны внутренней среды могут вносить минорную роль. Тем не менее, поскольку у самок экспрессия гена *Prl1* достоверно выше, чем у самцов, после пресноводной адаптации, даже при одинаковой чувствительности жабр и кишечника, у самок и самцов итоговый эффект может различаться. Таким образом, пролактин может способствовать пресноводной адаптации в соответствии с полом особей.

Различия в ответе элементов пролактиновой оси самок и самцов в условиях пресноводной адаптации могут быть обусловлены принципиально разными репродуктивными стратегиями самок и самцов колюшек. В то время как репродуктивная стратегия самок сводится исключительно к выбору наиболее подходящего партнёра и нересту, половое поведение самцов включает в себя фазы, требующие различных поведенческих реакций, и предполагает поочерёдную смену конкурентного, полового и родительского поведения. Таким образом, в работе установлена зависимость осморегуляторной функции пролактина от пола рыб, по-разному проявляющаяся в условиях разной солёности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания Московского государственного университета № 121032300075-6 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00734). В работе использовано оборудование, предоставленное федеральным проектом

“Развитие инфраструктуры для науки и образования” (Соглашение №161).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены комиссией МГУ по биоэтике; № протокола 98а; № собрания комиссии 108-о. (Animal-related experiments were conducted in accordance with the NIH Guidelines for the care and use of laboratory animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Animal protocols were approved by the MSU Bioethics Commission, protocol number 98а; № of Commission 108-о).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Авторы П.Н.С., С.О.В, Н.Т.В.), сбор данных (П.Н.С.), обработка данных (П.Н.С.), написание и редактирование манускрипта (П.Н.С., С.О.В, Н.Т.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grattan DR, Kokay IC* (2008) Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20: 752–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01736.x>
2. *Bernard V, Young J, Binart N* (2019) Prolactin – a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 15: 356–365. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
3. *Yuan M, Jia Q, Wang T, Lu Q, Tang L, Wang Y, Lu W* (2017) Dynamic responses of prolactin, growth hormone and their receptors to hyposmotic acclimation in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gen Comp Endocrinol* 254: 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.005>
4. *Moorman BP, Inokuchi M, Yamaguchi Y, Lerner DT, Grau EG, Seale AP* (2014) The osmoregulatory effects of rearing Mozambique tilapia in a tidally changing salinity. *Gen Comp Endocrinol* 207: 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.013>
5. *Vargas-Chacoff L, Dann F, Paschke K, Oyarzún-Salazar R, Nualart D, Martínez D, Wilson JM, Guerreiro PM, Navarro JM* (2021) Freshening effect on the osmotic response of the Antarctic spiny plunderfish *Harpagifer antarcticus*. *J Fish Biol* 98: 1558–1571. <https://doi.org/10.1111/jfb.14676>
6. *Zahangir MM, Matsubara H, Ogiso S, Suzuki N, Ueda H, Ando H* (2021) Expression dynamics of the genes for the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in tiger puffer (*Takifugu rubripes*) at different reproductive stages. *Gen Comp Endocrinol* 301: 113660. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113660>
7. *Wootton RJ* (1984) A functional biology of sticklebacks. Univ of California Press
8. *Slijkhuis H, de Ruiter AJ, Baggerman B, Wendelaar Bonga SE* (1984) Parental fanning behavior and prolactin cell activity in the male three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen Comp Endocrinol* 54: 297–307. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(84\)90184-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(84)90184-9)
9. *de Ruiter AJ, Wendelaar Bonga SE, Slijkhuis H, Baggerman B* (1986) The effect of prolactin on fanning behavior in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen Comp Endocrinol* 64: 273–283. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0016-6480(86)90014-6)
10. *Páll MK, Mayer I, Borg B* (2002) Androgen and behavior in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. II. Castration and 11-ketoandrostenedione effects on courtship and parental care during the nesting cycle. *Horm Behav* 42: 337–344. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1820>
11. *Lam TJ, Leatherland JF* (1969) Effects of prolactin on the glomerulus of the marine threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., form trachurus, after transfer from seawater to fresh water, during the late autumn and early winter. *Can J Zool* 47: 245–250.
12. *Benjamin M* (1980) The Response of Prolactin, ACTH, and Growth Hormone Cells in the Pituitary Gland of the Three-Spined Stickleback: *Gasterosteus aculeatus* L. form leirus, to Increased Environmental Salinities. *Acta Zool* 61: 1–7.
13. *Pavlova NS, Gizatulina AR, Neretina TV, Smirnova OV* (2022) Expression of Opsin Genes in the Retina of Female and Male Three-Spined Sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L.: Effect of Freshwater Adaptation and Prolactin Administration. *Biochem* 87: 215–224.
14. *Pavlova NS, Neretina TV, Smirnova OV* (2020) Dynamics of prolactin axis genes in the brain of male and female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (*Gasterostidae*) during short-term freshwater adaptation. *J Ichthyol* 60: 299–304.
15. *Mohammed-Geba K, González AA, Suárez RA, Galal-Khalaf A, Martos-Sitcha JA, Ibrahim HM, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM* (2017) Molecular performance of Prl and Gh/Igf1 axis in the Mediterranean meager, *Argyrosomus regius*, acclimated to different rearing salinities. *Fish Physiol Biochem* 43: 203–216.
16. *Shu Y, Lou Q, Dai Z, Dai X, He J, Hu W, Yin Z* (2016) The basal function of teleost prolactin as a key regulator on ion uptake identified with zebrafish knockout models. *Sci Rep* 6: 1–12.
17. *Watanabe S, Itoh K, Kaneko T* (2016) Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: exploring with

- an improved gill incubation system. *Gen Comp Endocrinol* 232: 151–159.
18. *Liu Z, Ma A, Zhang J, Yang S, Cui W, Xia D, Qu J* (2020) Cloning and molecular characterization of PRL and PRLR from turbot (*Scophthalmus maximus*) and their expressions in response to short-term and long-term low salt stress. *Fish Physiol Biochem* 46: 501–517. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00699-2>
 19. *Dobolyi A, Oláh S, Keller D, Kumari R, Fazekas EA, Csikós V, Renner É, Cservenák M* (2020) Secretion and Function of Pituitary Prolactin in Evolutionary Perspective. *Front Neurosci* 14: 621. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00621>
 20. *Kavarthapu R, Dufau ML* (2022) Prolactin receptor gene transcriptional control, regulatory modalities relevant to breast cancer resistance and invasiveness. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 949396.
 21. *Hewage TMG, Woo DW, Celino-Brady FT, Seale AP* (2023) Temperature modulates the osmosensitivity of tilapia prolactin cells. *Sci Rep* 13: 20217. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47044-5>
 22. *Leondires MP, Hu ZZ, Dong J, Tsai-Morris CH, Dufau ML* (2002) Estradiol stimulates expression of two human prolactin receptor isoforms with alternative exons-1 in T47D breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 82: 263–268. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(02\)00184-x](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(02)00184-x)
 23. *Banks CM, Trott JF, Hovey RC* (2024) The prolactin receptor: A cross-species comparison of gene structure, transcriptional regulation, tissue-specificity, and genetic variation. *J Neuroendocrinol* e13385.
 24. *Zeng J, Li J, Yang K, Yan J, Xu T, Lu W* (2022) Differential branchial response of low salinity challenge induced prolactin in active and passive coping style olive flounder. *Front Physiol* 13: 913233.
 25. *Yamaguchi Y, Breves JP, Haws MC, Lerner DT, Grau EG, Seale AP* (2018) Acute salinity tolerance and the control of two prolactins and their receptors in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Mozambique tilapia (*O. mossambicus*): A comparative study. *Gen Comp Endocrinol* 257: 168–176.
 26. *Seale AP, Pavlosky KK, Celino-Brady FT, Yamaguchi Y, Breves JP, Lerner DT* (2019) Systemic versus tissue-level prolactin signaling in a teleost during a tidal cycle. *J Comp Physiol B, Biochem Syst Environ Physiol* 189: 581–594. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01233-9>
 27. *Nagarajan G, Aruna A, Chang Y-M, Alkhamis YA, Mathew RT, Chang C-F* (2023) Effects of Osmotic Stress on the mRNA Expression of prl, prlr, gr, gh, and ghr in the Pituitary and Osmoregulatory Organs of Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Int J Mol Sci* 24(6): 5318. <https://doi.org/10.3390/ijms24065318>
 28. *Seale AP, Stagg JJ, Yamaguchi Y, Breves JP, Soma S, Watanabe S, Kaneko T, Cnaani A, Harpaz S, Lerner DT, Grau EG* (2014) Effects of salinity and prolactin on gene transcript levels of ion transporters, ion pumps and prolactin receptors in Mozambique tilapia intestine. *Gen Comp Endocrinol* 206: 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.07.020>
 29. *Takahashi H, Prunet P, Kitahashi T, Kajimura S, Hirano T, Grau EG, Sakamoto T* (2007) Prolactin receptor and proliferating/apoptotic cells in esophagus of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and in seawater. *Gen Comp Endocrinol* 152: 326–331.
 30. *Manzon LA* (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol* 125: 291–310.
 31. *Kent M, Bell AM* (2018) Changes in behavior and brain immediate early gene expression in male threespined sticklebacks as they become fathers. *Horm Behav* 97: 102–111.
 32. *Blume A, Torner L, Liu Y, Subburaju S, Aguilera G, Neumann ID* (2009) Prolactin induces Egr-1 gene expression in cultured hypothalamic cells and in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1302: 34–41.
 33. *Dobolyi A, Oláh S, Keller D, Kumari R, Fazekas EA, Csikós V, Renner É, Cservenák M* (2020) Secretion and Function of Pituitary Prolactin in Evolutionary Perspective. *Front Neurosci* 14: 621. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00621>
 34. *Saha I, Chakraborty A, Das S* (2021) Prolactin Influences Different Aspects of Fish Biology. *Asian J Biol Life Sci* 10: 51.
 35. *Singh SP, Singh TP* (1981) Effect of sex steroids on pituitary and serum prolactin level in ovariectomized catfish, *Clarias batrachus*. In: *Annales D'endocrinologie*. pp 57–62.
 36. *Zhang Y, Long Z, Li Y, Yi S, Shi Y, Ma X, Huang W, Lu D, Zhu P, Liu X, Meng Z, Huang X, Cheng CHK, Lin H* (2010) The second prolactin receptor in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and gene expression. *Fish Physiol Biochem* 36: 283–295. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9355-1>
 37. *Cunha AAP, Partridge CG, Knapp R, Neff BD* (2019) Androgen and prolactin manipulation induces changes in aggressive and nurturing behavior in a fish with male parental care. *Horm Behav* 116: 104582.

EXPRESSION OF PROLACTIN AXIS GENES IN THE BRAIN, GILLS, AND KIDNEYS OF THE THREE-SPINED STICKLEBACK *G. ACULEATUS* L.: DEPENDENCY ON FRESHWATER ADAPTATION AND SEX

N. S. Pavlova^{a, #}, T. V. Neretina^b and O. V. Smirnova^a

^a*Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*N.A. Pertsov White Sea Biological Station, Biological faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University*

[#]*e-mail: pav.nad.ser@gmail.com*

The dependence of prolactin gene (Prl1) expression on sex in the brain and its receptors (PrlRa and PrlRb) in the brain, kidneys, gills, and intestine of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) was studied in the context of freshwater adaptation. Males and females of the marine morph were adapted to freshwater for 72 hours, and the expression levels of Prl1 in the brain and PrlRa and PrlRb in the examined organs were assessed using RT-PCR. In seawater, no sex differences in Prl1 gene expression in the brain were observed; however, after freshwater adaptation, significant sex differences were detected due to increased Prl1 expression in females. In the brains of females, PrlRa gene expression was significantly lower in seawater compared to males but increased significantly after freshwater adaptation, eliminating sex differences. PrlRb gene expression in the brain increased significantly in females following freshwater adaptation. In the kidneys, no sex differences in PrlRa gene expression were found in either seawater or freshwater, although expression significantly decreased after freshwater adaptation in both sexes. PrlRb gene expression in the kidneys showed no sex differences in seawater but did so under freshwater conditions due to a significant increase in females and a decrease in males. In the gills, the expression of PrlRa and PrlRb genes was independent of both sex and salinity. In the intestine, neither sex nor salinity influenced the expression of the PrlRa gene. PrlRb gene expression in the intestine showed no sex differences and decreased in both sexes after transitioning to freshwater. It is concluded that the osmoregulatory function of prolactin's dependence on sex is manifested in the sex differences in the expression of the prolactin gene itself and in the sensitization of the brain and osmoregulatory organs to it during freshwater adaptation.

Keywords: prolactin, prolactin receptor, threespined stickleback, osmoregulation, freshwater adaptation, sex dependency