

Том 60, Номер 6

ISSN 0044-4529

Ноябрь – Декабрь 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 6, 2024

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Роль интегрированного ответа на стресс (ИОС) в нейropsychических патологиях ЦНС

Н. П. Ильин, В. С. Никитин, А. В. Калусев

575

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Особенности эритропоэза гибернирующих сусликов *Uroditellus undulatus*

К. И. Лизоркина, Г. Е. Аксенова, В. Н. Афанасьев, П. О. Теплова, Н. М. Захарова

599

Сравнительная характеристика клеток купфера в печени крыс SHR и Wistar

И. А. Никитина, В. А. Разенкова, Д. Э. Коржевский

608

Влияние адреналина на мембранный потенциал митохондрий
и показатели клеточного иммунного ответа гемоцитов
средиземноморской мидии (*Mytilus Galloprovincialis*)

А. А. Ткачук, Т. А. Кухарева, Е. С. Кладченко, А. Ю. Андреева

617

Внеклеточные потенциалы действия кардиомиоцитов желудочков в изолированном сердце крыс,
содержащихся на высокожировой/высокосахарозной диете

И. В. Кубасов, А. В. Степанов, Ю. А. Филиппов,
О. Ю. Карнишкина, А. А. Панов, М. Г. Добрецов

626

Динамика изменений маркеров апоптоза, циркадных ритмов
и антиокислительных процессов на модели височной эпилепсии у крыс

А. А. Нуснова, Д. А. Лисенкова, А. З. Биджиев,
А. П. Ивлев, Е. В. Черниговская, Е. Д. Бажанова

637

Сравнительный анализ иммунного ответа, кишечной микробиоты
и восприимчивости к бактериям *Bacillus thuringiensis*
у колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*

Д. С. Терещенко, Е. В. Гризанова, Е. В. Шелихова,
Т. Ю. Аликина, М. Р. Кабилов, И. М. Дубовский

649

Contents

Vol. 60, No. 6, 2024

REVIEWS

Role of the Integrated Stress Response System (ISR)
in Neuropsychiatric Pathologies
of the Central Nervous System

N. P. Ilyin, V. S. Nikitin, and A. V. Kalueff

575

EXPERIMENTAL ARTICLES

Features of Erythropoiesis of Hibernating Ground Squirrels *Urocitellus Undulatus*

K. I. Lizorkina, G. E. Aksenova, V. N. Afanasyev, P. O. Teplova, and N. M. Zakharova

599

Comparative Characterization of Kupffer Cells in the Livers of SHR and Wistar Rats

I. A. Nikitina, V. A. Razenkova, and D. E. Korzhevskii

608

Effect of Adrenaline on Mitochondrial Membrane Potential and Indicators
of the Cellular Immunity of Hemocytes of the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*)

A. Tkachuk, T. A. Kukhareva, E. S. Kladchenko, and A. Yu. Andreyeva

617

Extracellular Action Potentials of Ventricular Cardiomyocytes
in the Heart Isolated From Rats Kept on a High-Fat/High-Sucrose Diet

I. V. Kubasov, A. V. Stepanov, Yu. A. Filippov, O. Yu. Karnishkina, A. A. Panov, and M. G. Dobretsov

626

Dynamics of Changes in Markers of Apoptosis, Circadian Rhythms
and Antioxidant Processes in the Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats

*A. A. Nuzhnova, D. A. Lisenkova, A. Z. Bidzhiev, A. P. Ivlev,
E. V. Chernigovskaya, and E. D. Bazhanova*

637

Comparative Analysis of Immune Response, Intestinal Microbiota and Susceptibility
to *Bacillus Thuringiensis* Bacteria of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa Decemlineata*

*D. S. Tereshchenko, E. V. Grizanova, E. V. Shelikhova, T. J. Alikina,
M. R. Kabilov, and I. M. Dubovskiy*

649

РОЛЬ ИНТЕГРИРОВАННОГО ОТВЕТА НА СТРЕСС (ИОС) В НЕЙРОПСИХИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЯХ ЦНС

© 2024 г. Н. П. Ильин^{1,2}, В. С. Никитин³, А. В. Калуев^{1,2,3,*}

¹Институт Трансляционной Биомедицины, Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

³Направление нейробиология, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-Технологический Университет “Сириус”, Сочи, Россия

*e-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 02.08.2024 г.

После доработки 12.10.2024 г.

Принята к публикации 17.10.2024 г.

Интегрированный ответ на стресс (ИОС) представляет собой консервативный для всех эукариот механизм клеточного ответа на различные сильные стрессовые сигналы, включая гипоксию, нехватку аминокислот и глюкозы, воспаление, стресс эндоплазматического ретикулума и другие. Центральным элементом ИОС является фосфорилирование эукариотического фактора инициации трансляции 2 альфа (eIF2 α). Этот процесс регулируется четырьмя киназами: PERK, GCN2, HRI и PKR, каждая из которых активируется различными стрессовыми условиями. Система ИОС играет критическую роль в поддержании гомеостаза клеток и их выживании в условиях стресса, однако ее хроническая активация может привести к дисфункции клеток и программируемой клеточной смерти. Недавние исследования показывают, что ИОС активно вовлечен в патогенез нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, а также активируется при травматическом повреждении мозга. В то же время вклад ИОС в развитие психических расстройств, таких как депрессия, тревожные расстройства, шизофрения, биполярное расстройство, посттравматическое стрессовое расстройство и аддикции, остается недостаточно изученным. В работе рассматриваются современные данные о роли ИОС в патогенезе психических расстройств ЦНС, а также обсуждаются возможности терапевтической модуляции системы ИОС в контексте этих заболеваний.

Ключевые слова: интегрированный ответ на стресс, нейропсихические патологии, депрессия, шизофрения, аддикция, eIF2 α , ATF4

DOI: 10.31857/S0044452924070019, **EDN:** KKFOCH

ВВЕДЕНИЕ

Интегрированный ответ на стресс (ИОС)

Интегрированный ответ на стресс (ИОС, Integrated stress response, ISR) представляет собой высококонсервативный механизм клеточного ответа на стрессовые воздействия, встречающийся у всех эукариот от дрожжей до людей [1]. Ключевым событием сигнального каскада ИОС является фосфорилирование субъединицы эукариотического фактора инициации трансляции, eIF2 α (рис. 1). Известны четыре киназы, способных катализировать эту реакцию: PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума (PERK), недерепрессируемая киназа общего контроля 2 (GCN2), гем-регулируемая ингибиторная киназа (HRI) и протеинкиназа R (PKR) [2]. В ответ на внутренние и внешние стрессовые сигналы происходит активация этих киназ, сопровождающаяся фосфорилированием соответ-

Сокращения: A β — бета-амилоид; ATF4 — активирующий транскрипционный фактор 4; BDNF — нейротрофический фактор мозга; БА — болезнь Альцгеймера; БР — биполярное расстройство; CREP — конститутивный репрессор фосфорилирования eIF2 α ; СНОР — индуцируемый повреждением ДНК транскрипт 3; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота; eIF2 — эукариотический фактор инициации трансляции 2; eIF2 α — эукариотический фактор инициации трансляции 2, субъединица альфа; eIF2B — эукариотический фактор инициации трансляции, субъединица 2B; GCN2 — недерепрессируемая киназа общего контроля 2; ГДФ — гуанозиндифосфат; ГТФ — гуанозинтрифосфат; HRI — гем-регулируемая ингибиторная киназа; ИОС — интегрированный ответ на стресс; мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота; РАС — рассеянный склероз; NMDA — N-метил-D-аспартат; PERK — PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума; PKR — протеинкиназа R; ПТСР — посттравматическое стрессовое расстройство; РР1 — протеинфосфатаза 1; РНК — рибонуклеиновая кислота; РС — рассеянный склероз; СИОЗС — селективный ингибитор обратного захвата серотонина; TrkB — тирозинкиназный рецептор B (tyrosine kinase receptor B); ТПМ — травматическое поражение мозга; УРПМ — условно-рефлекторное предпочтение места; ф-eIF2 α — фосфорилированная форма эукариотического фактора инициации трансляции 2 α ; ВОП — вентральная область покрышки

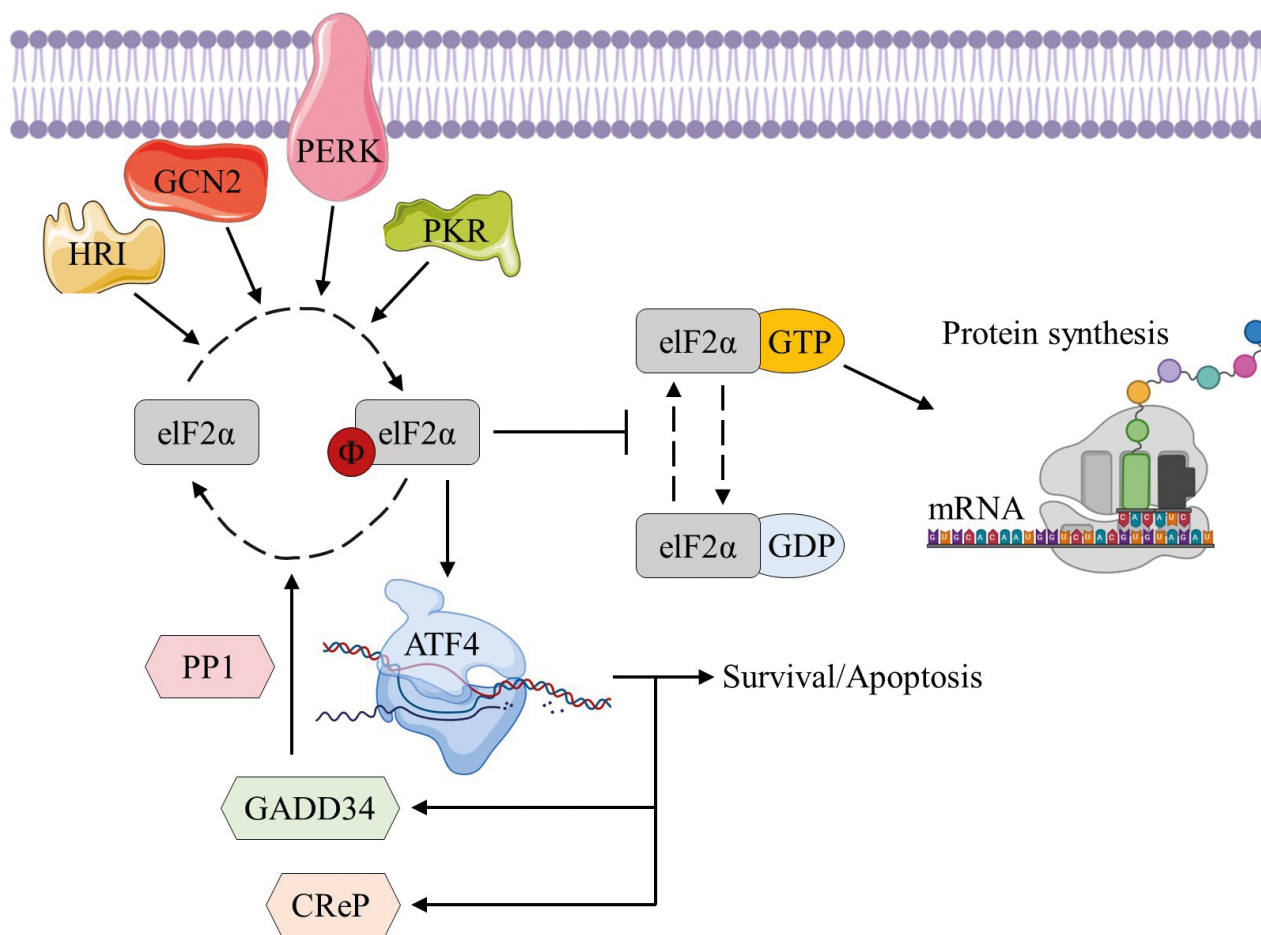


Рис. 1. Сигнальный путь интегрированного ответа на стресс (ИОС). PERK — PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума; GCN2 — недерепрессируемая киназа общего контроля 2; PKR — протеинкиназа R; HRI — гем-регулируемая ингибиторная киназа; eIF2α — эукариотический фактор инициации трансляции 2α; ATF4 — активирующий транскрипционный фактор 4; GADD34 — регуляторная субъединица протеинфосфатазы 1 15а; PP1 — протеинфосфатаза 1; CRP — конститутивный репрессор фосфорилирования eIF2α; ГТФ — гуанозинтрифосфат; ГДФ — гуанозиндифосфат.

ствующих сайтов. Например, PERK активируется в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума, возникающий в результате накопления неправильно сложенных белков или нарушения кальциевого гомеостаза [3-5], HRI может быть активирована дефицитом железа, тепловым шоком или осмотическим стрессом [6], а GCN2 реагирует на депривацию аминокислот, ультрафиолетовое излучение и некоторые другие сигналы [7, 8]. Сигналами для активации PKR могут служить вирусная двухцепочечная РНК, цитокины, белки теплового шока и активные формы кислорода [9-11]. Таким образом, запуск ИОС происходит в ответ на широкий спектр стрессовых воздействий, общим процессом для которых является фосфорилирование указанными киназами фактора eIF2α в положении *Ser51*, с образованием ф-eIF2α.

Белок eIF2α является субъединицей комплекса эукариотического фактора инициации трансляции

2 (eIF2), в состав которого также входят β- и γ-субъединицы. Фактор eIF2 образует тройной комплекс совместно с ГТФ и инициаторной мет-тРНК, который принимает участие в инициации трансляции [12]. При этом ГТФ гидролизуетс с образованием ГДФ, после чего комплекс eIF2-ГДФ теряет связь с 40S-субъединицей рибосомы и диффундирует в цитоплазму. Для повторной активации комплекса необходим еще один фактор, eIF2B, который служит в качестве обменника нуклеотидов, способствуя замещению ГДФ на ГТФ, с образованием eIF2-ГТФ, который способен вновь участвовать в инициации трансляции.

Однако в условиях активации ИОС фосфорилирование eIF2α в положении *Ser51* приводит к тесному и необратимому связыванию eIF2 и eIF2B [13]. В таких условиях eIF2 теряет возможность образовывать тройной комплекс с ГТФ и мет-тРНК, что приводит к общему торможению трансляции

мРНК и синтеза белка в клетке. Параллельно этому, увеличивается трансляция некоторых мРНК, имеющих короткие открытые рамки считывания в 5'-некодирующей области, за счет использования альтернативных механизмов инициации трансляции [14–16]. Эти мРНК транслируются в белки, обеспечивающие реакцию клетки на воздействие стрессоров.

Среди них наиболее изучен ATF4 — транскрипционный фактор 4, регулирующий экспрессию генов, продукты которых участвуют в транспорте и биосинтезе аминокислот, метаболизме углеводов, антиоксидантной защите апоптозе и других процессах, необходимых для клеточного ответа на нарушение гомеостаза [17]. Кроме того, ATF4 способен запускать генетическую экспрессию ряда белков, участвующих в регуляции программируемой смерти клеток, ключевым из которых является про-апоптотический фактор индуцируемый повреждением ДНК транскрипт 3, также известный как CHOP [18, 19]. В целом, ИОС считается адаптивной реакцией, направленной на восстановление гомеостаза и выживание клетки, однако хроническая активация ИОС приводит к нарушению функции клетки и запуску путей программируемой смерти [1].

Важно, что активация ИОС никогда не приводит к полной остановке синтеза белка в клетке, в том числе за счет существования механизма обратной связи: ATF4 индуцирует генетическую экспрессию белка GADD34 — регуляторной субъединицы протеинфосфатазы 1, что способствует дефосфорилированию eIF2 α [19, 20]. Другой механизм обратной связи включает в себя ИОС-индуцированное увеличение уровня белка C σ eP — конститутивного репрессора фосфорилирования eIF2 α [21]. Экспериментальные данные также свидетельствуют о некотором базовом уровне активации ИОС, поскольку часть молекул eIF2 α всегда находится в фосфорилированном состоянии [22–25]. Таким образом, стрессовые воздействия лишь смещают баланс ф-eIF2 α /eIF2 α в сторону фосфорилированной формы. Более того, ИОС сигналинг может принимать участие в ряде физиологических процессов, независимых от наличия стрессоров, таких как регуляция клеточного цикла [26], метаболизм глюкозы [27] и поддержание антиоксидантной защиты [23].

Особую роль eIF2 α сигналинг играет в нервных клетках. Так, изменение отношения ф-eIF2 α /eIF2 α служит механизмом для регуляции процессов долговременной потенциации и депрессии и формирования синаптической пластичности [28–30]. Закономерна возможная роль ИОС в формировании памяти и реализации когнитивных функций [29–33]. Например, гетерозиготная мутация гена eIF2 α в положении *Ser51* (делающая невозможным

его фосфорилирование) улучшает консолидацию долговременной памяти у мышей [29], тогда как фармакологическое ингибирование дефосфорилирования eIF2 α в гиппокампе мышей снижает ассоциированную со страхом память [29, 34]. Мыши с конститутивной делецией гена eIF2 α -киназы GCN2 демонстрируют парадоксальное улучшение памяти при выполнении сложной задачи, и нарушение памяти в стандартной тренировочной парадигме [35]. Возможно, стимул-индуцированное фосфорилирование eIF2 α в дендритах и аксонах нейронов приводит к локальному подавлению синтеза белка и ATF4-опосредованному ингибированию активности фактора CREB1, который стимулирует экспрессию генов, вовлеченных в синаптическую пластичность [36]. Однако индуцированное снижение уровня мРНК ATF4 в гиппокампе мышей нарушает синаптическую пластичность и глутаматергическую функцию, в конечном итоге нарушая формирование долговременной памяти [37]. Наконец, воздействие на культуру первичных нейронов нейротрофического фактора мозга (BDNF) приводит к увеличению трансляции регуляторной субъединицы протеинфосфатазы 1 15a (GADD34) с последующим снижением уровня ф-eIF2 α и увеличением синтеза белка *de novo* [38]. Помимо участия в процессах формирования памяти у лабораторных животных, показано участие ИОС в регуляции пищевого поведения [39–41]. Например, генетическое редактирование eIF2 α в положении *Ser51* (делающее невозможным его фосфорилирование) в нейронах, экспрессирующих агут-родственный пептид, приводит к расстройству пищевого поведения и увеличению чувствительности к лептину [40].

Важность ИОС в ЦНС подтверждается также тем, что мозг является одним из наиболее восприимчивых к дисрегуляции ИОС органов [42]. Например, мутации в гене, кодирующем C σ eP (конститутивную фосфатазу eIF2 α), связаны с микроцефалией и диабетом [43], мутации в гене eIF2 α -киназы PERK ассоциированы с диабетом, дисплазией скелета и умственной отсталостью [44], а мутации в генах всех пяти субъединиц eIF2B вызывают лейкоэнцефалопатию с исчезновением белого вещества [45]. Все большее количество данных указывает на участие ИОС в патологиях ЦНС, связанных с дегенерацией нервной ткани, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, боковой амиотрофический и рассеянный склероз, а также травматическое поражение мозга [46–50]. Например, многие характерные патологические процессы при данных заболеваниях — окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, нарушение фолдинга белка, депривация аминокислот, нарушение кальциевого гомеостаза — способны запускать ИОС посредством активации соответ-

ствующих eIF2 α -киназ [42]. В свою очередь, гиперактивация ИОС может быть одним из патологических механизмов, ответственных за дисфункцию и дегенерацию клеток нейронов и глии, и, в итоге, — за функциональные нарушения, наблюдаемые при этих заболеваниях мозга. Данные об активации ИОС в данных патологиях и ее модуляции в моделях на животных суммированы в таблице 1.

В то время как участие ИОС в перечисленных патологиях подробно описано [42, 50, 166–168], гораздо менее изучен, и поэтому нуждается в систематизации, вопрос о роли системы ИОС в наиболее распространенных психических расстройствах мозга, в том числе депрессии, тревоге, шизофрении, биполярном расстройстве, посттравматическом стрессовом расстройстве и зависимости от

Таблица 1. Свидетельства активации ИОС в нейродегенеративных патологиях

Ответы	Ссылки
Болезнь Альцгеймера (БА)	
↑ ф-eIF2 α в различных областях мозга людей с БА	[51–58]
↑ ф-PKR в головном мозге людей с БА	[53]
↑ ф-PERK в обонятельных луковицах пациентов с БА	[56]
↓ eIF2B в головном мозге людей с БА	[51]
↓ ф-eIF2 α в головном мозге людей с БА на поздних стадиях заболевания	[59]
Распределение ф-PERK коррелирует с абnormally фосфорилированной формой тау-белка в мозге пациентов с БА	[60]
↑ ф-eIF2 α , ф-PERK, ATF4 и других маркеров ИОС в моделях БА на мышах и крысах	[51, 53–55, 61–72]
↓ ф-eIF2 α в мозге крыс после введения олигомеров A β в желудочки мозга	[73]
↓ ф-eIF2 α на ранних стадиях заболевания в модели Tg2576-трансгенных мышей	[74]
A β -пептид вызывает опосредованное PKR увеличение ф-eIF2 α в первичных нейронах мыши и в мозге обезьян	[34]
PERK-независимое ↑ ф-eIF2 α , ↓ GADD34 и снижение синтеза белка в астроцитах 3xTg-AD мышей	[75]
↑ ф-eIF2 α в клетках со сверхэкспрессией мутантного белка-прекурсора A β	[55]
↑ ф-eIF2 α в клетках нейробластомы человека после воздействия олигомеров A β	[76, 77]
↑ ф-eIF2 α в клеточной линии со сверхэкспрессией мутантного белка-прекурсора A β	[55]
Делеция гена PERK способствует улучшению синаптической пластичности и пространственной памяти в генетических моделях БА на мышах	[61]
Делеция сайта фосфорилирования eIF2 α в 5xFAD-трансгенных мышах не привела к улучшению поведенческих показателей	[78]
Гаплонедостаточность PERK снизила активацию ИОС и когнитивные нарушения в 5XFAD-трансгенных мышах	[62]
Условный нокаут PERK в переднем мозге приводит к снижению ф-eIF2 α и восстановлению долговременной потенциации в APP/PS1 модели БА на мышах	[79]
Делеция гена GCN2 привела к гиперактивации PERK- eIF2 α пути и увеличению амилоидоза в мозге 5XFAD-трансгенных мышей	[80]
Салубринал увеличивает уровень бета-секретазы и синтез A β в первичных нейронах	[54]
Салубринал снизил маркеры окислительного стресса и апоптоза, вызванные инъекциями A β в желудочки мозга крыс	[73]
Салубринал снизил БА-подобную симптоматику на ранних стадиях патологии в модели Tg2576-трансгенных мышей	[74]
GSK2606414 снижают ф-eIF2 α и восстанавливают долговременную потенциацию в APP/PS1 модели БА на мышах	[79]
Ингибитор PKR SAR439883 показал нейропротекторный эффект в нескольких моделях БА на мышах	[72]
Инъекции GADD34 в гиппокамп снизили ↑ ф-eIF2 α и улучшили когнитивные показатели в APP23 модели БА на мышах	[64]

Продолжение таблицы 1.

Ответы	Ссылки
ISRIB предотвращает опосредованное ф-eIF2 α нарушение долговременной памяти на острой модели БА у мышей	[51]
ISRIB восстанавливает функцию синапсов и память на модели БА у трансгенных мышей	[51]
ISRIB уменьшает А β -индуцированные маркеры стресс эндоплазматического ретикулума, нейродегенерации и нейровоспаления в модели введения А β в желудочки мозга крысам	[71]
ISRIB не смог восстановить нарушения памяти в APP/PS1 и APP J20 моделях БА на мышах	[81, 82]
Болезнь Паркинсона (БП)	
↑ ф-eIF2 α и ф-PERK в мозге людей с БП	[83–85]
↑ ф-eIF2 α в моноклеарных клетках крови пациентов с семейными и спорадическими формами БП	[86]
↑ ф-eIF2 α , ф-PERK и ATF4 в генетических и фармакологических моделях БП на грызунах	[83, 87–89]
↑ ф-eIF2 α в <i>pink1</i> - и <i>parkin</i> -мутантных дрозофилах	[90]
↑ ф-eIF2 α и ↑ ф-PERK в культуре астроцитов крысы со сверхэкспрессией α -синуклеина	[91]
↑ ф-eIF2 α и ↑ CHOP в клеточной модели БП со сверхэкспрессией α -синуклеина	[92]
Гуанабенз (ингибирует фосфатазу eIF2 α) способствует выживанию нейронов мыши в различных моделях БП	[93]
GSK2606414 показал нейропротекторный эффект в ряде моделей БП на мышах	[83]
Нейропротекторный эффект салубринала в ротенон-индуцированной модели БП на крысах	[88]
Ингибитор PKR C-16 снижает активацию ATF4 и смерть дофаминергических нейронов в моделях БП на мышах	[89]
Болезнь Хантингтона (БХ)	
↑ ф-eIF2 α в полосатом теле в модели N171-82Q-трансгенных мышей	[94]
↑ ф-eIF2 α в клеточной модели БХ	[95, 96]
↑ ATF4 мРНК и уровень белка в клеточной модели БХ	[97]
ISRIB снижает клеточную смерть в культуре клеток полосатого тела STNdhQ111-трансгенных мышей	[98]
GSK2606414 восстанавливает пространственную память и память распознавания, а также восстанавливает плотность дендритных шипов в пирамидных нейронах CA1 в модели мышей R6/1	[99]
Активатор PERK, МК-28, восстанавливает моторные и исполнительные функции, а также увеличивает продолжительность жизни в модели R6/2 мышей	[100]
Ингибитор фосфатазы eIF2 α салубринал оказывает нейропротекцию в клеточной модели БХ	[96]
Боковой амиотрофический склероз (БАС)	
↑ ф-eIF2 α в образцах спинного мозга людей с БАС	[101]
↑ ф-eIF2 α и ф-PERK в образцах коры головного мозга больных C9ORF72-обусловленным БАС	[102]
↑ ATF4 в спинном мозге пациентов со спорадическим и семейным БАС	[103]
Сигнальный путь ИОС способствует трансляции интронных повторов, вовлеченных в патогенез БАС	[104]
↑ ATF4 мРНК в спинном мозге в модели SOD1-мутантных мышей	[105]
Активация PERK в моторных нейронах SOD1-мутантных мышей	[106]
↑ ф-eIF2 α и ф-PERK в SOD1-мутантных клетках нейробластомы	[107]
GSK2606414 снизил клеточную смерть в модели БАС на культуре нейронов	[108]
Гетерозиготный нокаут гена PERK усиливает течение болезни в модели mtSOD1 трансгенных мышей	[109]
Нокаут гена ATF4 способствует увеличению продолжительности жизни SOD1-мутантных мышей	[110]

Продолжение таблицы 1.

Ответы	Ссылки
Sephin1 (ингибитор фосфатазы eIF2 α) нивелировал поведенческие, морфологические и молекулярные изменения у SOD1-мутантных мышей	[111]
Гуанабенз показал нейропротекцию в модели mtSOD1-трансгенных мышей через ингибирование фосфатазы eIF2 α	[112]
Салубринал снижает патогенез у SOD1-мутантных мышей	[113]
ISRIB улучшил выживание SOD1-G93A трансгенных нейронов	[114]
ISRIB-подобные 2BAct и PRXS571 ухудшают течение болезни у SOD1-G93A трансгенных мышей	[115]
↑ ф-eIF2 α в областях поражения мозга людей с PC	[116]
Рассеянный склероз (РС)	
↑ ATF4, CHOP и биомаркеров стресса эндоплазматического ретикулума в мозге людей с РС	[117–119]
↑ ф-eIF2 α , ATF4 и CHOP в культуре человеческих олигодендроцитов под воздействием РС-релевантных стрессоров	[120]
Активация PERK-eIF2 α -CHOP пути в нейронах оптических нервов в модели аутоиммунного энцефаломиелита на мышах	[121]
↑ ф-eIF2 α , ф-PERK и маркеров в ганглиях дорсальных корешков мыши в модели аутоиммунной энцефалопатии	[122]
↑ ф-eIF2 α в олигодендроцитах мыши в модели ЦНС-специфичной сверхэкспрессии интерферона- γ	[123]
↑ GADD34 в олигодендроцитах мыши в модели ЦНС-специфичной сверхэкспрессии интерферона- γ	[124]
↑ ф-eIF2 α в культуре олигодендроцитов в модели воспалительного стресса	[125]
Интерферон- γ вызывает фосфорилирование ф-eIF2 α и увеличение маркеров апоптоза в культуре олигодендроцитов	[123]
Нейропротекторный эффект интерферон- γ -опосредованного увеличения ф-PERK и ф-eIF2 α в олигодендроцитах мышей в модели аутоиммунной энцефалопатии	[126, 127]
Нейропротекторный эффект инактивации гена GADD34 в модели интерферон- γ -опосредованной демиелинизации	[124]
Делеция гена фосфатазы eIF2 α GADD34 приводит к облегчению патологии в модели аутоиммунной энцефалопатии на мышах	[125]
Инактивация гена PERK в олигодендроцитах мыши приводит к снижению ф-eIF2 α , потере олигодендроцитов, демиелинизации и деградации аксонов в модели аутоиммунной энцефалопатии	[128]
Индукцированная гиперактивация PERK в олигодендроцитах способствует нейропротекции и ремиелинизации в культурах клеток и моделях РС на мышах	[129]
Гетерозиготный нокаут гена PERK ухудшает течение патологии в модели ЦНС-специфичной сверхэкспрессии интерферона- γ	[123, 130]
ISRIB восстановил рост отростков и снизил клеточную смерть олигодендроцитов в условиях РС-релевантного стресса	[120]
Sephin1 ингибировал образование олигодендроцитами отростков в условиях стресса	[120]
Sephin1 увеличил ф-eIF2 α в культуре олигодендроцитов в модели воспалительного стресса, а также показал нейропротекторный эффект в модели аутоиммунной энцефалопатии на мышах	[125]
Салубринал увеличил ф-eIF2 α , снизил гипомиелинизацию и потерю олигодендроцитов в срезах гиппокампа после воздействия интерферона- γ	[124]
Гуанабенз увеличивает ф-eIF2 α , снижает интерферона- γ -индуцированную потерю олигодендроцитов и демиелинизацию в культуре клеток, а также в моделях РС на мышах	[131]
Травматическое поражение мозга (ТПМ)	
↑ ф-eIF2 α , ф-PERK, ATF4 и других маркеров ИОС в различных областях мозга в моделях ТПМ на мышах и крысах	[46, 132–158]

Окончание таблицы 1.

Ответы	Ссылки
↓ ф-eIF2α и ATF4 в модели мягкого ТПМ на мышах	[159]
Условный нокаут гена PERK в олигодендроцитах приводит к гиперактивации ИОС и большему разрушению белого вещества в результате травмы спинного мозга	[160]
Салубринал снижает нейроапоптоз в модели латерального удара (ТПМ) у крыс	[134]
Салубринал улучшает поведенческие показатели в модели ТПМ, вызванного контузией, на крысах	[138]
Салубринал снижает маркеры стресса эндоплазматического ретикулума, аутофагии и апоптоза в модели кортикального удара на мышах	[142]
Салубринал улучшил когнитивные показатели и снизил смерть нейронов в модели мягкого ТПМ у мышей	[159]
Салубринал снижает маркеры апоптоза и нормализовал импульсивное поведение в модели ТПМ, вызванной взрывом	[152]
Гуанабенз увеличил ф-eIF2α и улучшил поведенческие параметры в модели контролируемого кортикального удара	[135]
GSK2606414 снижает потерю нейронов и улучшил контекстуальную дискриминацию в модели контролируемого кортикального удара на мышах	[140]
GSK2606414 снижает экспрессию маркеров ИОС и нейрональный апоптоз в модели хирургической травмы мозга на крысах	[145]
GSK2656157 предотвращает потерю дендритных шипиков и нормализует нарушение памяти в модели контролируемого кортикального удара на мышах	[161]
ISRIB восстановил функцию долговременной памяти, а также нормализовал нарушение долговременной потенциации в модели фокальной контузии на мышах	[46]
ISRIB снижает нейрональный апоптоз и способствовал нормализации локомоторной функции в модели травмы спинного мозга на мышах	[151]
ISRIB снижает нейровоспаление и нормализовал поведенческие нарушения в модели травмы спинного мозга	[162]
ISRIB снижает ферроптоз и повреждение белого вещества в модели контролируемого кортикального удара на крысах	[163]
ISRIB нормализовал импульсивное поведение и синаптическую функцию в модели многократного ТПМ на мышах	[164]
ISRIB нормализовал локомоторные и когнитивные нарушения в модели ТПМ на рыбах зебраданию (zebrafish, <i>Danio rerio</i>)	[165]

психоактивных веществ. Отдельное внимание в работе будет также уделено экспериментальным данным о перспективах фармакологической модуляции ИОС в контексте данных патологий.

МОДУЛЯТОРЫ КАСКАДОВ ИОС

Ингибитор интегрированного ИОС (ISR inhibitor, ISRIB) — относительно недавно синтезированная экспериментальная малая молекула (рис. 2), оказывающая ингибирующее воздействие на путь клеточного ИОС [169, 170]. ISRIB оказывает свое действие, высокоспецифично связываясь с eIF2B (β-субъединицей эукариотического фактора инициации трансляции-2), способствуя его димеризации, в результате чего увеличивается эффективность eIF2B как фактора обмена нуклеотидов, а eIF2B становится нечувствительным к фосфорилированию eIF2α (Рис. 2). Таким образом, ISRIB блоки-

рует негативный эффект фосфорилирования eIF2α на трансляцию, что препятствует развитию ИОС, воздействуя напрямую на основной активирующий его механизм [169].

Салубринал (рис. 2) — еще один новый экспериментальный препарат-модулятор ИОС [171, 172]. Основным механизмом его действия связан с ингибированием формирования комплекса GADD34:PP1, состоящего из серин/треониновой протеинфосфатазы (PP1) и регуляторной субъединицы (GADD34), выступающего PP1 регулирующей субъединицей 15A [173–176]. Это приводит к ингибированию дефосфорилирования eIF2α и, как следствие, — к не-прямой активации ИОС. Аналогичный механизм действия наблюдается и у некоторых других, родственных салубриналу препаратов, в частности Sal003 и Sephin1 [125, 177–180]. Третьим ключевым классом препаратов, оказывающих выраженное влияние на ИОС, являются ингибиторы PERK, в част-

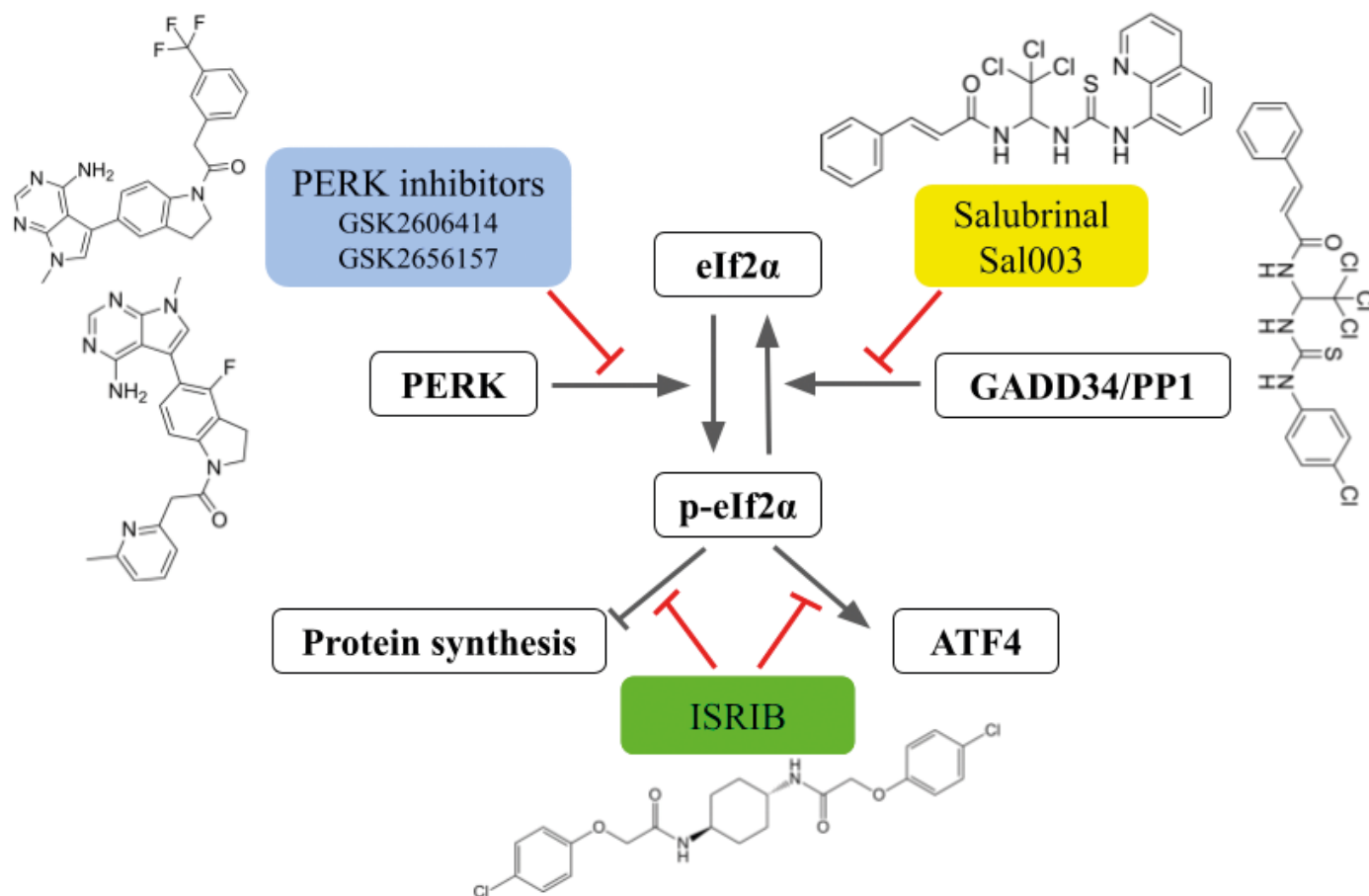


Рис. 2. Механизмы действия препаратов-модуляторов ИОС. PERK — PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикула; eIF2α — эукариотический фактор инициации трансляции 2α; ATF4 — активирующий транскрипционный фактор 4; GADD34 — регуляторная субъединица протеинфосфатазы 1 15а; PP1 — протеинфосфатаза 1.

ности GSK2606414 и GSK2656157 (рис. 2) [181–183]. В отличие от обсуждаемых выше препаратов, ингибиторы PERK оказывают стимулирующее воздействие на ИОС, и их использование в экспериментальной практике связано преимущественно с возможностью подавления роста опухолей [184, 185].

ИОС В ПСИХИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЯХ ЦНС

Большое депрессивное расстройство

Большое депрессивное расстройство представляет собой широко распространенное и клинически гетерогенное психическое заболевание со сложной этиологией и высокой устойчивостью к терапии. Основными симптомами депрессии являются продолжительное снижение настроения и мотивации, нарушение когнитивных функций, а также вегетативные симптомы, такие как расстройства сна и аппетита [186]. В патогенез депрессии вовлечены также нейровоспаление [187], окислительный стресс [188] и стресс эндоплазматического ретику-

лума [189], каждый из которых, как указывалось выше, способен запускать ИОС. И хотя клинических исследований, указывающих на активацию ИОС в депрессии, довольно мало, описано увеличение экспрессии ATF4 в посмертных образцах префронтальной коры больных депрессией, погибших в результате суицида [190], и в периферических образцах мононуклеарных клеток крови больных с депрессией [191, 192]. Кроме того, результаты исследований полногеномных ассоциаций указывают на потенциальную взаимосвязь с риском возникновения депрессии интронного варианта гена *EIF2B* (который кодирует регуляторную субъединицу комплекса eIF2) [193], полиморфизма связывающего транскрипционный фактор домена гена *EIF2AK1* (который кодирует eIF2α-киназу HRI) [194], а также полиморфизм регуляторной области гена *ATF4* [195].

Данные, полученные в экспериментальных моделях депрессии на животных, также указывают на возможную активацию ИОС при депрессивном патогенезе. В модели хронического социального по-

ражения на мышцах наблюдается увеличение уровня фосфорилированных форм PERK и eIF2 α в гиппокампе [196]. Активация PERK-eIF2 α пути может ингибировать фактор CREB, что приводит к подавлению экспрессии BDNF, наблюдаемому в данной модели [196]. Аналогично, признаки активации ИОС были обнаружены в моделях депрессии у крыс, основанных на умеренном непредсказуемом стрессе, приводя к увеличению фосфорилирования PERK и eIF2 α в гиппокампе, а также увеличению уровня белков ATF4 и фосфорилированной формы eIF2 α в префронтальной коре [192] на фоне депрессивно-подобного поведения в тестах предпочтения сахарозы и вынужденного плавания. У самцов крыс линии Wistar, подвергнутых воздействию мягких стрессоров (белый шум, стробоскопическое освещение, фиксацию, плавание в горячей и холодной воде и др.) в течение 6 недель [197] также описано депрессивно-подобное поведение на фоне увеличения содержания фосфорилированных форм PERK и eIF2 α в образцах гиппокампа, а серотонергический антидепрессант — селективный ингибитор обратного захвата серотонина (СИОЗС) флуоксетин — нормализует изменения в фосфорилировании PERK и eIF2 α в гиппокампе. Наконец, у самок крыс линии Wistar, 6-недельный протокол хронического непредсказуемого стресса вызывает увеличение экспрессии гена ATF4 в префронтальной коре животных, которое снимается другим СИОЗС (сертралином) [198]. Это позволяет предположить, что подавление активности eIF2 α -сигналинга может быть связано с механизмами терапевтического эффекта антидепрессантов группы СИОЗС.

В другой модели депрессивно-подобное состояние у крыс индуцировалось инъекциями липополисахарида, что также привело к активации киназы PERK в гиппокампе, но не в префронтальной коре [199]. При этом введение крысам ISRIB снижает вызванное липополисахаридом нейровоспаление, а также показатели депрессивно-подобного поведения [199]. Наконец, на двух моделях депрессии на мышцах — липополисахарид-индуцированного нейровоспаления и кортикостерон-индуцированного стресса — показано увеличение фосфорилирования eIF2 α в серотонинергических нейронах ядер шва [200] на фоне снижения уровня BDNF, увеличения содержания белков, связанных со стрессом эндоплазматического ретикулума, а также тревожно- и депрессивно-подобного поведения [200]. Инъекции туникамицина — соединения, вызывающего стресс эндоплазматического ретикулума и, как следствие, активацию ИОС — в дорсальные ядра шва мышей также увеличивают уровень ф-eIF2 α в дорсальных ядрах шва и депрессивно-подобное поведение мышей. Локальные инъекции туникамицина в ядра шва изменяют экс-

прессию генов, связанных с нейропластичностью (таких как BDNF, его рецептор TrkB, нейритин и другие), а также снижают серотонин-опосредованную нейротрансмиссию в различных других областях мозга [200].

Инъекции ISRIB, наоборот, блокируют вызванные туникамицином изменения экспрессии генов синаптических белков, а также предотвращают депрессивное поведение животных [200]. В то же время введение салубринала (ингибитора eIF2 α и активатора ИОС) усиливает эффект туникамицина на перечисленные параметры [200]. Интересно, что кетамин — ингибитор N-метил-D-аспаратных (NMDA) рецепторов глутамата, рассматриваемый в качестве быстродействующего антидепрессанта, также нормализует индуцированные туникамицином изменения уровня ф-eIF2 α и поведения [200], позволяя допустить, что увеличение фосфорилирования eIF2 α и активация ф-eIF2 α -опосредованного сигналинга в дорсальных ядрах шва может отвечать за нарушения нейротрансмиссии, нейропластичности и поведения, наблюдаемые в экспериментальных моделях [200]. В целом, несмотря на нехватку клинических данных, исследования в моделях на животных свидетельствуют о том, что ИОС и особенно PERK-eIF2 α сигналинг могут играть важную роль в патогенезе депрессии, открывая новые возможности для использования препаратов, нацеленных на систему ИОС, в качестве возможных антидепрессантов.

Шизофрения

Шизофрения представляет собой распространенное гетерогенное заболевание со сложной этиологией, возникающее в результате комбинации генетической предрасположенности и факторов окружающей среды [201]. К числу симптомов шизофрении относятся позитивные (бред и галлюцинации), а также негативные (отсутствие мотивации, социальная изоляция и когнитивные нарушения) [202]. Роль ИОС в патогенезе этого заболевания остается малоизученной, однако, свидетельства участия ИОС в шизофрении можно найти в генетических исследованиях, клинических данных, а также в экспериментальных моделях этого заболевания. Так, определенные мононуклеотидные мутации в гене ATF4 сопряжены с шизофренией у мужчин, но не у женщин в Китае [203]. По данным общегеномной ассоциации >13000 случаев болезни показана связь шизофрении с геном *EIF2AK2*, кодирующим киназу eIF2 α HRI [204]. Протеомный анализ префронтальной коры больных шизофренией показывает увеличение содержания другой киназы eIF2 α — GCN2 [205]. На нейросферах из клеток обонятельного эпителия больных шизофренией так же показано снижение глобального син-

теза белка и снижение содержания рибосомальных белков. Последующий анализ путей дифференциально экспрессируемых белков и мРНК транскриптов в нейросферах показал обогащение пути, связанного с eIF2 α сигналингом. Исследования клеток крови больных шизофренией показывают увеличение фосфорилирования eIF2 α в лимфоцитах [206] и фракции моноклеарных клеток крови [207], указывая на возможную системную активацию ИОС.

Признаки активации ИОС также описаны в моделях шизофрении на мышах. Так, в модели пренатального воздействия полирибоинозиновой-полирибозитидиловой кислоты (иммуностимулянт, вызывает шизофрено-подобные изменения у потомства) наблюдается увеличение отношения ф-eIF2 α /eIF2 α в гиппокампе и префронтальной коре [206]. В другой модели мыши с условным нокаутом гена *CACNA1C* (кодирующего кальциевый канал Cav1.2, ассоциированный с шизофренией и биполярным расстройством) в эксайторных глутаматергических нейронах префронтальной коры [208] демонстрируют повышенную тревожность и нарушения социального поведения, а также снижение синтеза белка и увеличение ф-eIF2 α в префронтальной коре, тогда как ISRIB восстанавливает синтез белка и нормализует поведенческие нарушения в данной модели [208]. С использованием культуры кортикальных нейронов с мутантным геном *DISC1* (*Disrupted In Schizophrenia 1*, ассоциирован с шизофренией) отмечается накопление ATF4 в ядрах клеток и ATF4-индуцированные изменения экспрессии ряда генов, приводящих к нарушению синаптической функции [209]. Структурный анализ показал, что мутации в гене *DISC1* препятствуют образованию комплекса DISC1-ATF4, что приводит к нарушению DISC1-опосредованного подавления активности ATF4 [209]. Генетическое подавление экспрессии ATF4 (гетерозиготная мутация *ATF4*) нормализует синаптическую функцию, восстанавливая плотность синаптических контактов, повышая среднюю частоту спонтанных разрядов и количество активных нейронных соединений. Напротив, усиление экспрессии ATF4 в культуре немутантных нейронов приводит к транскриптомным изменениям и снижению синаптической возбудимости, аналогичным наблюдаемым в DISC1-мутантных клетках. Это указывает на ключевую роль фактора ATF4 в патогенезе DISC1-опосредованной шизофрении, и поднимает вопрос о роли ИОС-опосредованной активации ATF4 в других формах этого заболевания (например, анализ образцов коры мозга пациентов с шизофренией показывает снижение ключевых компонентов ИОС — PERK и ATF4 [210]).

Более того, мыши с условным нокаутом гена *PERK* в коре мозга демонстрируют ряд шизофрено-подобных поведенческих нарушений, связанных с обработкой информации и поведенческой гибкостью, а также снижение уровней ф-eIF2 α и ATF4 в префронтальной коре [210]. Содержание ф-eIF2 α и ATF4 в префронтальной коре пожилых людей с шизофренией не отличается от контроля [211]. В целом, противоречивость представленных данных может быть связана с большой клинической гетерогенностью шизофрении, а также с различиями животных моделей, используемых в работах. Поэтому, несмотря на растущее количество данных в пользу участия ИОС в шизофрении, конкретная роль этого пути в ее патологии остается неясной и требует дальнейшего изучения.

Биполярное расстройство

Биполярное расстройство (БР) характеризуется повторяющимися эпизодами повышенного настроения и депрессии, которые связаны с характерными когнитивными, физиологическими и поведенческими симптомами [212]. На данный момент существуют лишь косвенные данные о возможной роли ИОС в патогенезе БР. Так, на модели клеточной культуры лимфоцитов человека туникамицин (как активатор стресса эндоплазматического ретикулаума) стимулирует фосфорилирование eIF2 α в контрольной группе, но не в лимфоцитах больных БР [213]. Отсутствие нормальной реакции на туникамицин сопровождается повышенной смертностью клеток, причем этот эффект наблюдается только для лимфоцитов пациентов на поздней стадии заболевания. Эти данные позволяют допустить роль дисфункций ИОС в БР.

Кроме того, на периферических клетках больных БР показано увеличение маркеров стресса эндоплазматического ретикулаума [213–216], однако остается неизвестным, сопряжены ли эти изменения с фосфорилированием eIF2 α и активацией ИОС. Наконец, недавний генетический анализ открытых баз данных геномов больных БР с использованием метода менделевской рандомизации на предмет связи генов компонентов ИОС пути с БР [217] выявил значимые ассоциации БР с геном *EIF2B5*, кодирующим субъединицу фактора eIF2B (молекулярную мишень ISRIB), а также с геном *EIF2AK4*, кодирующим GCN2 - киназу eIF2 α .

Посттравматическое стрессовое расстройство

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) возникает в результате сильного травмирующего события, и сопровождается долговременными психическими, нейроэндокринными и нейрофизиологическими нарушениями [218]. Данные об участии ИОС в патогенезе ПТСР в настоящее

время ограничиваются моделями на животных с использованием однократного пролонгированного стресса у крыс, где показано увеличение содержания ф-eIF2 α и ф-PERK, а также нескольких маркеров стресса эндоплазматического ретикулума в префронтальной коре [219, 220] и накопление в ядрах нейронов префронтальной коры белков ATF4 и CHOP на фоне увеличения апоптоза и поведенческих нарушений, связанных со способностью крыс к обучению и памяти [219]. Интересно, что ингибитор PERK GSK2606414 восстанавливает как изменения уровня белков, так и поведенческие нарушения, наблюдаемые в данной модели ПТСР [219]. В целом, эти данные указывают на PERK-зависимую гиперактивацию ИОС в данной модели, однако для однозначного вывода о роли ИОС в ПТСР необходимы дальнейшие исследования с использованием других моделей, а также более обширные и систематические клинические данные.

Зависимость от психоактивных препаратов

Зависимость от употребления самых разных классов психоактивных веществ имеет сходные нейробиологические механизмы — долгосрочные молекулярные и клеточные изменения нейронов мезолимбической дофаминергической системы [221]. Недавно показано, что ИОС играет активную роль в этих процессах. Так, в моделях условно-рефлекторного предпочтения места (УРПМ) и самостимуляции кокаином и морфином у крыс воздействие стимула, ассоциированного с наркотиком, вызывает снижение ф-eIF2 α и ATF4 в базолатеральной миндалине [222], тогда как инъекции Sal003 (ингибитора фосфатазы eIF2 α) в эту область мозга подавляет поведение, направленное на ассоциированные с наркотиками стимулы, а снижение экспрессии гена *ATF4* путем РНК-интерференцией блокирует эффект Sal003. Инъекции последнего в прилежащее ядро крыс приводит к подавлению поведения, направленного на поиск наркотика в модели отмены кокаина [223]. У мышей, кокаин [224, 225], никотин [226], алкоголь и метафетамин [224] снижают уровень фосфорилирования eIF2 α в вентральной области покрышки (ВОП) — ключевой зоны мозга, вовлеченной в формирование зависимости [227]. Интересно, что молодые мыши-подростки, характеризующихся сниженным отношением ф-eIF2 α /eIF2 α в ВОП, проявляют большую предрасположенность к возникновению зависимости от кокаина и никотина [224, 226]. Более того, у молодых мышей кокаин и никотин способны вызывать долговременную потенциацию в нейронах ВОП (один из механизмов формирования зависимости) в меньших дозах, по сравнению со взрослыми [224, 226].

Генетическое подавление фосфорилирования eIF2 α в ВОП (замена Ser51 на аланин в одном из аллелей гена *Eif2s1*) приводит к снижению порога долговременной потенциации никотином и кокаином в нейронах ВОП у взрослых мышей, до уровня сопоставимого с наблюдаемым у подростков [224, 226]. При этом введение активатора ИОС Sal003 в ВОП ингибирует эффект кокаина на долговременную потенциацию, а также снизило показатели аддиктивного поведения у мышей-подростков [224].

Напротив, ISRIB усиливает эффект кокаина и никотина на долговременную потенциацию, а также способствовал формированию аддиктивного поведения [225]. Введение агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 крысам также снижает фосфорилирование eIF2 α в прилежащем ядре подростков, но не взрослых особей [228], тогда как WIN 55,212-2 и кокаин усиливают поведенческие эффекты друг друга (кросс-сенситизация) у крыс-подростков [228]. Вовлеченность eIF2 α сигналинга в патогенез зависимости также подтверждает то, что у людей генетическая предрасположенность к курению связана с полиморфизмом гена *Eif2s1*, кодирующего eIF2 α [226]. Таким образом, ингибирование ИОС в нейронах мезолимбической системы играет важную роль в формировании зависимости от самых разных наркотиков, а подавление ф-eIF2 α сигналинга может быть ключевым фактором, определяющим большую предрасположенность молодых особей к наркотикам.

Хроническое воздействие морфина увеличивает содержание ф-eIF2 α в коре головного мозга крыс, что сопровождалось апоптотическими изменениями морфологии клеток [229], а системные инъекции морфина повышают уровень ф-eIF2 α в спинном мозге крыс и увеличивают экспрессию маркеров апоптоза и стресса эндоплазматического ретикулума [230]. Многократное введение амфетамина увеличивает фосфорилирование ф-eIF2 α и снижает общий уровень синтеза белка в стриатуме мышей [231], а однократное воздействие высокой дозы метамфетамина и амфетамина — повышает уровень ф-eIF2 α в гиппокампе мышей [232] и стриатуме крыс [233]. Данные наблюдения указывают на то, что патологические изменения в мозге, вызываемые наркотическими препаратами (в том числе опиатами и амфетаминном), сопряжены с активацией системы ИОС.

ОБСУЖДЕНИЕ

ИОС представляет собой важный защитный механизм, направленный на поддержание клеточного гомеостаза в стрессовых условиях. При этом изменения в активации eIF2 α -сигналинга могут иметь как адаптивный, так и патогенный эффект в зави-

симости от контекста и степени активации ИОС. В краткосрочной перспективе этот механизм способствует выживанию клеток, снижая общий уровень синтеза белков и перераспределяя ресурсы для восстановления гомеостаза. Однако хроническая активация этого пути может вызвать программируемую клеточную смерть через такие медиаторы, как ATF4 и CHOP, что может приводить к нейрональной дисфункции и гибели клеток, описанных при болезни Альцгеймера, Паркинсона и других нейродегенеративных расстройствах. В то же время, для психических заболеваний функциональное значение сигнальных каскадов ИОС остается неясным. С одной стороны, приведенные выше данные указывают на вовлеченность компонентов ИОС в патогенез психических расстройств, таких как депрессия, шизофрения, биполярное расстройство, аддикции и ПТСР. Более того, модуляторы ИОС, такие как ISRIB и салубринал, показывают терапевтическую эффективность в некоторых моделях этих заболеваний. С другой стороны, нельзя исключить вероятность того, что изменения в eIF2 α -сигналинге являются не причиной, а следствием общей клеточной дисрегуляции в условиях патологии. Важно также отметить, что большая часть приведенных данных получена с использованием моделей на животных, внося определенные ограничения в их интерпретацию. Во-первых, такие модели не всегда полностью отражают сложность и многокомпонентность психических заболеваний у человека. Патогенез депрессии или шизофрении у людей часто включает широкий спектр факторов, таких как генетические, социальные и биохимические компоненты, которые трудно воспроизвести в экспериментах на животных. Во-вторых, значимость ИОС в моделях нейродегенерации и психических расстройств у грызунов может варьироваться в зависимости от использованных методов и экспериментальных условий. Например, активация ИОС в гиппокампе у крыс в модели хронического непредсказуемого стресса может быть реакцией на хронический стресс, но не обязательно означать, что данный каскад является первопричиной заболевания.

Кроме того, вопрос о целесообразности искусственной модуляции активности eIF2 α сигналинга в условиях патологии остается открытым. С одной стороны, препараты, такие как ISRIB и салубринал, демонстрируют потенциал в улучшении поведенческих и нейрофизиологических показателей в некоторых моделях рассматриваемых патологий. С другой стороны, искусственное ингибирование или стимуляция eIF2 α сигналинга могут иметь непредсказуемые последствия для общего клеточного гомеостаза, особенно в условиях сложных многокомпонентных патологий ЦНС. В целом, несмотря на потенциальную важность ИОС в патогенезе психических расстройств, текущие данные оста-

ются фрагментарными, а вопрос о том, является ли ИОС ключевым механизмом или же сопутствующим звеном в более широкой сети патофизиологических изменений, остается открытым. Будущие исследования должны быть сосредоточены на интеграции знаний о роли ИОС с другими сигнальными каскадами и на разработке терапевтических стратегий, нацеленных на точное и контролируемое вмешательство в этот путь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИОС в мозге является важным механизмом адаптации клеток к стрессу, влияющим на нейрональную активность и участвующим в патогенезе ряда заболеваний ЦНС. На фоне психических расстройств может наблюдаться как активация (при депрессии и ПТСР), так и ингибирование (в некоторых моделях биполярного расстройства, шизофрении и зависимости) ИОС. Таким образом, нацеленные на различные компоненты системы ИОС фармакологические агенты, такие как ISRIB и салубринал, представляют собой перспективные терапевтические средства, способные модулировать негативные эффекты активации или ингибирования ИОС, модулируя симптомы психических заболеваний. В целом, будущие исследования могут быть направлены на дальнейшее выяснение специфических ролей путей ИОС в психических расстройствах и разработку целенаправленных терапий для смягчения их пагубных эффектов и предотвращения развития нежелательных побочных эффектов, связанных с дисрегуляцией ИОС. Понимание сложного взаимодействия между стрессовыми реакциями клетки и патогенезом психических расстройств будет способствовать продвижению стратегий лечения этих состояний.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (А.В.К., Н.П.И.), подготовка черновика статьи (Н.П.И., В.С.Н., А.В.К.), редактирование и подготовка финальной версии (Н.П.И., А.В.К.)

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа финансово поддержана средствами Санкт-Петербургского государственного университета (проект 93020614).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep* 17(10):1374–1395. <https://doi.org/10.15252/embr.201642195>

2. *Boye E, Grallert B* (2020) eIF2 α phosphorylation and the regulation of translation. *Curr Genet* 66(2):293–297. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01026-1>
3. *Liang S-H, Zhang W, Mcgrath BC, Zhang P, Cavener DR* (2006) PERK (eIF2 α kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis. *Biochem J* 393(1):201–209. <https://doi.org/10.1042/BJ20050374>
4. *Wang P, Li J, Tao J, Sha B* (2018) The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *J Biol Chem* 293(11):4110–4121. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001294>
5. *Almeida LM, Pinho BR, Duchon MR, Oliveira JM* (2022) The PERKs of mitochondria protection during stress: insights for PERK modulation in neurodegenerative and metabolic diseases. *Biol Revs* 97(5):1737–1748. <https://doi.org/10.1111/brv.12860>
6. *Girardin SE, Cuziol C, Philpott DJ, Arnoult D* (2021) The eIF2 α kinase HRI in innate immunity, proteostasis, and mitochondrial stress. *FEBS J* 288(10):3094–3107. <https://doi.org/10.1111/febs.15553>
7. *Hinnebusch AG* (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Ann Rev Microbiol* 59:407–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133833>
8. *Marbach I, Licht R, Frohnmeyer H, Engelberg D* (2001) Gcn2 mediates Gcn4 activation in response to glucose stimulation or UV radiation not via GCN4 translation. *J Biol Chem* 276(20):16944–16951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100383200>
9. *Lemaire PA, Anderson E, Lary J, Cole JL* (2008) Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J Mol Biol* 381(2):351–360. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.056>
10. *Gal-Ben-Ari S, Barrera I, Ehrlich M, Rosenblum K* (2019) PKR: a kinase to remember. *Front Mol Neurosci* 11:480. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00480>
11. *Chukwurah E, Farabaugh KT, Guan BJ, Ramakrishnan P, Hatzoglou M* (2021) A tale of two proteins: PACT and PKR and their roles in inflammation. *FEBS J* 288(22):6365–6391. <https://doi.org/10.1111/febs.15691>
12. *Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N* (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* 352(6292):1413–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>
13. *Kashiwagi K, Yokoyama T, Nishimoto M, Takahashi M, Sakamoto A, Yonemochi M, Shirouzu M, Ito T* (2019) Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response. *Science* 364(6439):495–459. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4104>
14. *Lu PD, Harding HP, Ron D* (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167(1):27–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>
15. *Zhang J, Shi Y* (2024) An upstream open reading frame (5'-uORF) links oxidative stress to translational control of ALCAT1 through phosphorylation of eIF2 α . *Free Rad Biol Med* 214:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.02.015>
16. *Silva J, Fernandes R, Romão L* (2019) Translational regulation by upstream open reading frames and human diseases. *mRNA Metab Hum Dis* 99–116. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19966-1_5
17. *Neill G, Masson GR* (2023) A stay of execution: ATF4 regulation and potential outcomes for the integrated stress response. *Front Mol Neurosci* 16:1112253. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1112253>
18. *Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I* (2016) The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Curr Mol Med* 16(6):533–544. <https://doi.org/10.2174/1566524016666160523143937>
19. *Márton M, Bánhegyi G, Gyöngyösi N, Kálmán EÉ, Pettkó-Szandtner A, Káldi K, Kapuy O* (2022) A systems biological analysis of the ATF4-GADD34-CHOP regulatory triangle upon endoplasmic reticulum stress. *FEBS Open Biol* 12(11):2065–2082. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13484>
20. *Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D* (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* 153(5):1011–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1011>
21. *Kastan JP, Dobrikova EY, Bryant JD, Gromeier M* (2020) CREP mediates selective translation initiation at the endoplasmic reticulum. *Sci Adv* 6(23):eaba0745. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0745>
22. *Jimenez-Diaz A, Remacha M, Ballesta JP, Berlanga JJ* (2013) Phosphorylation of initiation factor eIF2 in response to stress conditions is mediated by acidic ribosomal P1/P2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8(12):e84219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084219>
23. *Lewerenz J, Maher P* (2009) Basal levels of eIF2 α phosphorylation determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression. *J Biol Chem* 284(2):1106–1115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807325200>
24. *Wek RC* (2018) Role of eIF2 α kinases in translational control and adaptation to cellular stress. *Cold Spring Harb Persp Biology* 10(7):a032870. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032870>
25. *Zeng N, Li Y, He L, Xu X, Galicia V, Deng C, Stiles BL* (2011) Adaptive Basal Phosphorylation of eIF2 α Is Responsible for Resistance to Cellular Stress-Induced Cell Death in Pten-Null Hepatocytes. *Mol Cancer Res* 9(12):1708–1717. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0299>
26. *Grallert B, Boye E* (2007) The Gcn2 kinase as a cell cycle regulator. *Cell Cycle* 6(22):2768–2772. <https://doi.org/10.4161/cc.6.22.4933>
27. *Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ* (2001)

- Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7(6):1165–1176.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00265-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00265-9)
28. Di Prisco GV, Huang W, Buffington SA, Hsu C-C, Bonnen PE, Placzek AN, Sidrauski C, Krnjević K, Kaufman RJ, Walter P (2014) Translational control of mGluR-dependent long-term depression and object-place learning by eIF2 α . *Nat Neurosci* 17(8):1073–1082.
<https://doi.org/10.1038/nn.3754>
 29. Costa-Mattioli M, Gobert D, Stern E, Gamache K, Colina R, Cuello C, Sossin W, Kaufman R, Pelletier J, Rosenblum K (2007) eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 129(1):195–206.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.050>
 30. Trinh MA, Klann E (2013) Translational control by eIF2 α kinases in long-lasting synaptic plasticity and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 105:93–99.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.04.013>
 31. Zhang Q, Bestard-Lorigados I, Song W (2021) Cell-type-specific memory consolidation driven by translational control. *Sign Transduct Targ Ther* 6(1):40.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00471-0>
 32. Ma T, Trinh MA, Wexler AJ, Bourbon C, Gatti E, Pierre P, Cavener DR, Klann E (2013) Suppression of eIF2 α kinases alleviates AD-related synaptic plasticity and spatial memory deficits. *Nat Neurosci* 16(9):1299.
<https://doi.org/10.1038/nn.3486>
 33. Sharma V, Sood R, Khlaifia A, Eslamizade MJ, Hung T-Y, Lou D, Asgarihafshejani A, Lalar M, Kiniry SJ, Stokes MP (2020) eIF2 α controls memory consolidation via excitatory and somatostatin neurons. *Nature* 586(7829):412–416.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2805-8>
 34. Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF, Sathler LB, Brito-Moreira J, Amaral OB, Silva CA (2013) TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metabol* 18(6):831–843.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.002>
 35. Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M, Bruno M, Bidinosti M, Ben Mamou C, Marcinkiewicz E, Yoshida M (2005) Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2. *Nature* 436(7054):1166–1170.
<https://doi.org/10.1038/nature03897>
 36. Oliveira MM, Klann E (2022) eIF2-dependent translation initiation: Memory consolidation and disruption in Alzheimer's disease. *Sem Cell Devel Biology* 101–109.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.07.009>
 37. Pasini S, Corona C, Liu J, Greene LA, Shelanski ML (2015) Specific downregulation of hippocampal ATF4 reveals a necessary role in synaptic plasticity and memory. *Cell Rep* 11(2):183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.025>
 38. Oliveira MM, Mohamed M, Elder MK, Banegas-Morales K, Mamcarz M, Lu EH, Golhan EA, Navrange N, Chatterjee S, Abel T (2024) The integrated stress response effector GADD34 is repurposed by neurons to promote stimulus-induced translation. *Cell Rep* 43(2).
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113670>
 39. Maurin A-C, Benani A, Lorsignol A, Brenachot X, Parry L, Carraro V, Guissard C, Averous J, Jousse C, Bruhat A (2014) Hypothalamic eIF2 α signaling regulates food intake. *Cell Rep* 6(3):438–444.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.006>
 40. Kim KK, Lee TH, Park BS, Kang D, Kim DH, Jeong B, Kim JW, Yang HR, Kim HR, Jin S, Back SH, Park JW, Kim JG, Lee BJ (2023) Bridging Energy Need and Feeding Behavior: The Impact of eIF2 α Phosphorylation in AgRP Neurons. *Diabetes* 72(10):1384–1396.
<https://doi.org/10.2337/db23-0004>
 41. Anderson R, Agarwal A, Ghosh A, Guan BJ, Casteel J, Dvorina N, Baldwin WM, Mazumder B, Nazarko TY, Merrick WC, Buchner DA, Hatzoglou M, Kondratov RV, Komar AA (2021) eIF2A-knockout mice reveal decreased life span and metabolic syndrome. *FASEB J* 35(11):e21990.
<https://doi.org/10.1096/fj.202101105R>
 42. Costa-Mattioli M, Walter P (2020) The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science* 368(6489):eaat5314.
<https://doi.org/10.1126/science.aat5314>
 43. Kernohan KD, Tetreault M, Liwak-Muir U, Geraghty MT, Qin W, Venkateswaran S, Davila J, Consortium CRC, Holcik M, Majewski J, Richer J, Boycott KM (2015) Homozygous mutation in the eukaryotic translation initiation factor 2 α phosphatase gene, PPP1R15B, is associated with severe microcephaly, short stature and intellectual disability. *Hum Mol Genet* 24(22):6293–6300.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv337>
 44. Julier C, Nicolino M (2010) Wolcott-Rallison syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 5(1):29.
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-29>
 45. Elroy-Stein O, Schiffmann R (2020) Chapter 19 - Vanishing white matter disease. In: Rosenberg RN, Pascual JM, editors. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease* (Sixth Edition). Academic Press p. 301–317.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813866-3.00019-9>
 46. Chou A, Krukowski K, Jopson T, Zhu PJ, Costa-Mattioli M, Walter P, Rosi S (2017) Inhibition of the integrated stress response reverses cognitive deficits after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(31):E6420–E6426.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1707661114>
 47. Marlin E, Viu-Idocin C, Arrasate M, Aragón T. (2022) The Role and Therapeutic Potential of the Integrated Stress Response in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Intl J Mol Sci* 23(14):7823.
<https://doi.org/10.3390/ijms23147823>
 48. Way SW, Popko B (2016) Harnessing the integrated stress response for the treatment of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 15(4):434–443.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00381-6)
 49. Mercado G, Castillo V, Soto P, Sidhu A (2016) ER stress and Parkinson's disease: Pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Res* 1648:626–632.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.042>

50. Oliveira MM, Lourenco MV (2016) Integrated Stress Response: Connecting ApoE4 to Memory Impairment in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 36(4):1053–1055. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4110-15.2016>
51. Oliveira MM, Lourenco MV, Longo F, Kasica NP, Yang W, Ureta G, Ferreira DD, Mendonça PH, Bernalles S, Ma T (2021) Correction of eIF2-dependent defects in brain protein synthesis, synaptic plasticity, and memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Sci Signal* 14(668):eabc5429. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abc5429>
52. Chang RC, Wong AK, Ng H-K, Hugon J (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13(18):2429–2432. <https://doi.org/10.1097/00001756-200212200-00011>
53. Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Bouras C, Pradier L, Gray F, Hugon J (2012) Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1822(6):885–896. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.01.009>
54. O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, Eimer WA, Hitt B, Bembinster LA, Lammich S (2008) Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 60(6):988–1009. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.047>
55. Kim HS, Choi Y, Shin KY, Joo Y, Lee YK, Jung SY, Suh YH, Kim JH (2007) Swedish amyloid precursor protein mutation increases phosphorylation of eIF2 α in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 85(7):1528–1537. <https://doi.org/10.1002/jnr.21267>
56. Murray HC, Dieriks BV, Swanson ME, Anekal PV, Turner C, Faull RL, Belluscio L, Koretsky A, Curtis MA (2020) The unfolded protein response is activated in the olfactory system in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 8:1–15. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00986-7>
57. Ferrer I (2002) Differential expression of phosphorylated translation initiation factor 2 alpha in Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28(6):441–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2002.t01-1-00410.x>
58. Stutzbach LD, Xie SX, Naj AC, Albin R, Gilman S, Group PGS, Lee VM, Trojanowski JQ, Devlin B, Schellenberg GD (2013) The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 1:1–13. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-31>
59. de la Monte SM, Re E, Longato L, Tong M (2012) Dysfunctional pro-ceramide, ER stress, and insulin/IGF signaling networks with progression of Alzheimer's disease. *J Alzheim Dis* 30(s2):S217–S229. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111728>
60. Unterberger U, Höftberger R, Gelpi E, Flicker H, Budka H, Voigtländer T (2006) Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J Neuropathol Exper Neurol* 65(4):348–357. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218445.30535.6f>
61. Ma T, Trinh MA, Wexler AJ, Bourbon C, Gatti E, Pierre P, Cavener DR, Klann E (2013) Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat Neurosci* 16(9):1299–1305. <https://doi.org/10.1038/nn.3486>
62. Devi L, Ohno M (2014) PERK mediates eIF2 α phosphorylation responsible for BACE1 elevation, CREB dysfunction and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35(10):2272–2281. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.04.031>
63. Zhang J-S, Zhou S-F, Wang Q, Guo J-N, Liang H-M, Deng J-B, He W-Y (2016) Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 α pathway in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 325:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.024>
64. Hayakawa-Ogura M, Nakagawa T, Itoh M (2023) GADD34 suppresses eIF2 α phosphorylation and improves cognitive function in Alzheimer's disease-model mice. *Biochem Biophys Res Commun* 654:112–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.02.077>
65. Devi L, Ohno M (2010) Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. *PLoS One* 5(9):e12974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012974>
66. Segev Y, Michaelson DM, Rosenblum K (2013) ApoE ϵ 4 is associated with eIF2 α phosphorylation and impaired learning in young mice. *Neurobiol Aging* 34(3):863–872. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.020>
67. Liang Y, Ye C, Chen Y, Chen Y, Diao S, Huang M (2021) Berberine improves behavioral and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease via regulation of β -amyloid production and endoplasmic reticulum stress. *ACS Chem Neurosci* 12(11):1894–1904. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00808>
68. Hayakawa M, Itoh M, Ohta K, Li S, Ueda M, Wang M-x, Nishida E, Islam S, Suzuki C, Ohzawa K (2015) Quercetin reduces eIF2 α phosphorylation by GADD34 induction. *Neurobiol Aging* 36(9):2509–2518. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.006>
69. Lizarazo S, Yook Y, Tsai NP (2022) Amyloid beta induces Fmr1-dependent translational suppression and hyposynchrony of neural activity via phosphorylation of eIF2 α and eEF2. *J Cell Physiol* 237(7):2929–2942. <https://doi.org/10.1002/jcp.30754>
70. Devi L, Ohno M (2013) Mechanisms that lessen benefits of β -secretase reduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 3(7):e284. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.59>
71. Goswami P, Akhter J, Mangla A, Suramya S, Jindal G, Ahmad S, Raisuddin S (2023) Downregulation of ATF-4 Attenuates the Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Neuroinflammation and Cognitive Impairment in Experimentally Induced Alzheimer's Disease Model. *Mol Neurobiol* :1–12. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03861-3>
72. Lopez-Grancha M, Bernardelli P, Moindrot N, Genet E, Vincent C, Roudieres V, Krick A, Sabuco J-F, Machnik D,

- Ibghi D* (2021) A novel selective PKR inhibitor restores cognitive deficits and neurodegeneration in Alzheimer disease experimental models. *J Pharmacol Exper Ther* 378(3):262–275.
<https://doi.org/10.1124/jpet.121.000590>
73. *Goswami P, Afjal MA, Akhter J, Mangla A, Khan J, Parvez S, Raisuddin S* (2020) Involvement of endoplasmic reticulum stress in amyloid β (1-42)-induced Alzheimer's like neuropathological process in rat brain. *Brain Res Bull* 165:108–117.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.022>
 74. *Borreca A, Valeri F, De Luca M, Ernst L, Russo A, Nobili A, Cordella A, Corsetti V, Amadoro G, Mercuri NB* (2020) Transient upregulation of translational efficiency in prodromal and early symptomatic Tg2576 mice contributes to A β pathology. *Neurobiol Dis* 139:104787.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104787>
 75. *Tapella L, Dematteis G, Moro M, Pistolato B, Tonelli E, Vanella VV, Giustina D, La Forgia A, Restelli E, Barberis E* (2022) Protein synthesis inhibition and loss of homeostatic functions in astrocytes from an Alzheimer's disease mouse model: a role for ER-mitochondria interaction. *Cell Death Dis* 13(10):878.
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-05324-4>
 76. *Chang RCC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J* (2002) Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α in neuronal degeneration. *J Neurochem* 83(5):1215–1225.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01237.x>
 77. *Picón-Pagès P, Gutiérrez DA, Barranco-Almohalla A, Crepin G, Tajés M, Ill-Raga G, Guix FX, Menéndez S, Arumí-Uría M, Vicente R* (2020) Amyloid Beta-Peptide Increases BACE1 Translation through the Phosphorylation of the Eukaryotic Initiation Factor-2 α . *Oxid Med Cell Longevity* 2020(1):2739459.
<https://doi.org/10.1155/2020/2739459>
 78. *Paesler K, Xie K, Hettich MM, Siwek ME, Ryan DP, Schröder S, Papazoglou A, Broich K, Müller R, Trog A* (2015) Limited effects of an eIF2 α S51A allele on neurological impairments in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neural Plasticity* 2015(1):825157.
<https://doi.org/10.1155/2015/825157>
 79. *Yang W, Zhou X, Zimmermann HR, Cavener DR, Klann E, Ma T* (2016) Repression of the eIF2 α kinase PERK alleviates mGluR-LTD impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 41:19–24.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.005>
 80. *Devi L, Ohno M*. Deletion of the eIF2. *PLoS One* 8(10).
 81. *Briggs DI, Defensor E, Ardestani PM, Yi B, Halpain M, Seabrook G, Shamloo M* (2017) Role of endoplasmic reticulum stress in learning and memory impairment and Alzheimer's disease-like neuropathology in the PS19 and APPSwe mouse models of tauopathy and amyloidosis. *ENeuro* 4(4).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0025-17.2017>
 82. *Johnson EC, Kang J* (2016) A small molecule targeting protein translation does not rescue spatial learning and memory deficits in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PeerJ* 4:e2565.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2565>
 83. *Mercado G, Castillo V, Soto P, López N, Axten JM, Sardi SP, Hoozemans JJ, Hetz C* (2018) Targeting PERK signaling with the small molecule GSK2606414 prevents neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 112:136–148.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.01.004>
 84. *Hoozemans J, Van Haastert E, Eikelenboom P, De Vos R, Rozemuller J, Scheper W* (2007) Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 354(3):707–711.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.043>
 85. *Baek J, Mamula D, Tingstam B, Pereira M, He Y, Svenningsson P* GRP78 level is altered in the brain, but not in plasma or cerebrospinal fluid in Parkinson's disease patients. *Front Neurosci* 13: 697. 2019.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00697>
 86. *Mutez E, Nkiliza A, Belarbi K, de Broucker A, Vanbesien-Mailliot C, Bleuse S, Duflot A, Comptdaer T, Semaille P, Blervaque R* (2014) Involvement of the immune system, endocytosis and EIF2 signaling in both genetically determined and sporadic forms of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 63:165–170.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.11.007>
 87. *Motawi TK, Al-Kady RH, Abdelraouf SM, Senousy MA* (2022) Empagliflozin alleviates endoplasmic reticulum stress and augments autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Targeting the GRP78/PERK/eIF2 α /CHOP pathway and miR-211-5p. *Chem-Biol Interact* 362:110002.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110002>
 88. *Gupta S, Mishra A, Singh S* (2021) Cardinal role of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) in progressive dopaminergic neuronal death & DNA fragmentation: Implication of PERK: IRE1 α : ATF6 axis in Parkinson's pathology. *Cell Signal* 81:109922.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109922>
 89. *Demmings MD, Tennyson EC, Petroff GN, Tarnowski-Garner HE, Cregan SP* (2021) Activating transcription factor-4 promotes neuronal death induced by Parkinson's disease neurotoxins and α -synuclein aggregates. *Cell Death Different* 28(5):1627–1643.
<https://doi.org/10.1038/s41418-020-00688-6>
 90. *Celardo I, Costa AC, Lehmann S, Jones C, Wood N, Menicacci NE, Mallucci GR, Loh SH, Martins LM* (2016) Mitofusin-mediated ER stress triggers neurodegeneration in pink1/parkin models of Parkinson's disease. *Cell death Dis* 7(6):e2271.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2016.173>
 91. *Liu M, Qin L, Wang L, Tan J, Zhang H, Tang J, Shen X, Tan L, Wang C* (2018) α synuclein induces apoptosis of astrocytes by causing dysfunction of the endoplasmic reticulum Golgi compartment. *Mol Med Rep* 18(1):322–332.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9002>

92. Jiang P, Gan M, Ebrahim AS, Lin W-L, Melrose HL, Yen S-HC (2010) ER stress response plays an important role in aggregation of α -synuclein. *Mol Neurodegen* 5:1–15. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-56>
93. Sun X, Aimé P, Dai D, Ramalingam N, Crary JF, Burke RE, Greene LA, Levy OA (2018) Guanabenz promotes neuronal survival via enhancement of ATF4 and parkin expression in models of Parkinson disease. *Exp Neurol* 303:95–107. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.01.015>
94. Leitman J, Barak B, Benyair R, Shinkman M, Ashery U, Hartl FU, Lederkremer GZ (2014) ER stress-induced eIF2- α phosphorylation underlies sensitivity of striatal neurons to pathogenic huntingtin. *PLoS One* 9(3):e90803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090803>
95. Almeida LM, Oliveira Â, Oliveira JM, Pinho BR (2023) Stress response mechanisms in protein misfolding diseases: Profiling a cellular model of Huntington's disease. *Arch Biochem Biophys* 745:109711. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109711>
96. Reijonen S, Putkonen N, Nørremølle A, Lindholm D, Korhonen L (2008) Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Exp Cell Res* 314(5):950–960. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.12.025>
97. Sbodio JJ, Snyder SH, Paul BD (2016) Transcriptional control of amino acid homeostasis is disrupted in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(31):8843–8888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608264113>
98. Xu H, Bensalel J, Capobianco E, Lu ML, Wei J (2022) Impaired restoration of global protein synthesis contributes to increased vulnerability to acute ER stress recovery in Huntington's disease. *Cell Mol Neurobiol* 42(8):2757–2771. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01137-9>
99. Espina M, Di Franco N, Brañas-Navarro M, Navarro IR, Brito V, Lopez-Molina L, Costas-Insua C, Guzmán M, Ginés S (2023) The GRP78-PERK axis contributes to memory and synaptic impairments in Huntington's disease R6/1 mice. *Neurobiol Dis* 184:106225. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106225>
100. Ganz J, Shacham T, Kramer M, Shinkman M, Eiger H, Weinberg N, Iancovici O, Roy S, Simhaev L, Da'adoosh B (2020) A novel specific PERK activator reduces toxicity and extends survival in Huntington's disease models. *Sci Rep* 10(1):6875. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63899-4>
101. Ilieva EV, Ayala V, Jové M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M (2007) Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130(12):3111–3123. <https://doi.org/10.1093/brain/awm190>
102. Parameswaran J, Zhang N, Braems E, Tilahun K, Pant DC, Yin K, Asress S, Heeren K, Banerjee A, Davis E (2023) Antisense, but not sense, repeat expanded RNAs activate PKR/eIF2 α -dependent ISR in C9ORF72 FTD/ALS. *Elife* 12:e85902. <https://doi.org/10.7554/eLife.85902.sa2>
103. Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Kiffin R, Martinez G, Cuervo AM, Brown RH, Glimcher LH (2009) XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Gen Devel* 23(19):2294–2306. <https://doi.org/10.1101/gad.1830709>
104. Cheng W, Wang S, Mestre AA, Fu C, Makarem A, Xian F, Hayes LR, Lopez-Gonzalez R, Drenner K, Jiang J (2018) C9ORF72 GGGGCC repeat-associated non-AUG translation is upregulated by stress through eIF2 α phosphorylation. *Nat Commun* 9(1):51. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02495-z>
105. Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guégan C, Nagai M, Xu Z, Sosunov AA, McKhann GM, Przedborski S (2006) Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(15):6025–6030. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509227103>
106. Sun S, Sun Y, Ling S-C, Ferraiuolo L, McAlonis-Downes M, Zou Y, Drenner K, Wang Y, Ditsworth D, Tokunaga S (2015) Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant SOD1-mediated ALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(50):E6993–E7002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520639112>
107. Oh YK, Shin KS, Yuan J, Kang SJ (2008) Superoxide dismutase 1 mutants related to amyotrophic lateral sclerosis induce endoplasmic stress in neuro2a cells. *J Neurochem* 104(4):993–1005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05053.x>
108. Kim H-J, Raphael AR, LaDow ES, McGurk L, Weber RA, Trojanowski JQ, Lee VM, Finkbeiner S, Gitler AD, Bonini NM (2014) Therapeutic modulation of eIF2 α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat Genet* 46(2):152–160. <https://doi.org/10.1038/ng.2853>
109. Wang L, Popko B, Roos RP (2011) The unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 20(5):1008–1015. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq546>
110. Matus S, Lopez E, Valenzuela V, Nassif M, Hetz C (2013) Functional contribution of the transcription factor ATF4 to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 8(7):e66672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066672>
111. Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, Sigurdardottir A, Bertolotti A (2015) Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* 348(6231):239–242. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4484>
112. Wang L, Popko B, Tixier E, Roos RP (2014) Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 71:317–324. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.010>

113. Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12(5):627–636. <https://doi.org/10.1038/nn.2297>
114. Medinas DB, González JV, Falcon P, Hetz C (2017) Fine-tuning ER stress signal transducers to treat amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci* 10:216. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00216>
115. Marlin E, Valencia M, Peregrín N, Ferrero R, Nicolás MJ, Vinuesa-Gavilanes R, Pineda-Lucena A, Artieda J, Arrasate M, Aragón T (2024) Pharmacological inhibition of the integrated stress response accelerates disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Br J Pharmacol* 181(3):495–508. <https://doi.org/10.1111/bph.16260>
116. Ní Fhlathartaigh M, McMahon J, Reynolds R, Connolly D, Higgins E, Counihan T, FitzGerald U (2013) Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol Commun* 1:1–15. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-37>
117. Mháille AN, McQuaid S, Windebank A, Cunnea P, McMahon J, Samali A, FitzGerald U (2008) Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related signaling pathway molecules in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(3):200–211. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318165b239>
118. McMahon J, McQuaid S, Reynolds R, FitzGerald U (2012) Increased expression of ER stress-and hypoxia-associated molecules in grey matter lesions in multiple sclerosis. *Mult Sclerosis J* 18(10):1437–1447. <https://doi.org/10.1177/1352458512438455>
119. Cunnea P, Mháille AN, McQuaid S, Farrell M, McMahon J, FitzGerald U (2011) Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis. *Mult Sclerosis J* 17(7):808–818. <https://doi.org/10.1177/1352458511399114>
120. Pernin F, Luo JXX, Cui Q-L, Blain M, Fernandes MG, Yaqubi M, Srouf M, Hall J, Dudley R, Jamann H (2022) Diverse injury responses of human oligodendrocyte to mediators implicated in multiple sclerosis. *Brain* 145(12):4320–4333. <https://doi.org/10.1093/brain/awac075>
121. Huang H, Miao L, Liang F, Liu X, Xu L, Teng X, Wang Q, Ridder WH, Shindler KS, Sun Y (2017) Neuroprotection by eIF2 α -CHOP inhibition and XBP-1 activation in EAE/optic neuritis. *Cell Death Dis* 8(7):e2936. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.329>
122. Yousuf MS, Samtleben S, Lamothe SM, Friedman TN, Catuneanu A, Thorburn K, Desai M, Tenorio G, Schenk GJ, Ballanyi K, Kurata HT, Simmen T, Kerr BJ (2020) Endoplasmic reticulum stress in the dorsal root ganglia regulates large-conductance potassium channels and contributes to pain in a model of multiple sclerosis. *FASEB J* 34(9):12577–12598. <https://doi.org/10.1096/fj.202001163R>
123. Lin W, Harding HP, Ron D, Popko B (2005) Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon- γ . *J Cell Biol* 169(4):603–612. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502086>
124. Lin W, Kunkler PE, Harding HP, Ron D, Kraig RP, Popko B (2008) Enhanced integrated stress response promotes myelinating oligodendrocyte survival in response to interferon- γ . *Am J Pathol* 173(5):1508–1517. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080449>
125. Chen Y, Podojil JR, Kunjamma RB, Jones J, Weiner M, Lin W, Miller SD, Popko B (2019) Sephin1, which prolongs the integrated stress response, is a promising therapeutic for multiple sclerosis. *Brain* 142(2):344–361. <https://doi.org/10.1093/brain/awy322>
126. Lin W, Bailey SL, Ho H, Harding HP, Ron D, Miller SD, Popko B (2007) The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. *J Clin Invest* 117(2):448–456. <https://doi.org/10.1172/JCI29571>
127. Lin W, Lin Y, Li J, Fenstermaker AG, Way SW, Clayton B, Jamison S, Harding HP, Ron D, Popko B (2013) Oligodendrocyte-specific activation of PERK signaling protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 33(14):5980–5991. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1636-12.2013>
128. Hussien Y, Cavener DR, Popko B (2014) Genetic inactivation of PERK signaling in mouse oligodendrocytes: normal developmental myelination with increased susceptibility to inflammatory demyelination. *Glia* 62(5):680–691. <https://doi.org/10.1002/glia.22634>
129. Lin Y, Huang G, Jamison S, Li J, Harding HP, Ron D, Lin W (2014) PERK Activation Preserves the Viability and Function of Remyelinating Oligodendrocytes in Immune-Mediated Demyelinating Diseases. *Am J Pathol* 184(2):507–519. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.009>
130. Lin W, Kemper A, Dupree JL, Harding HP, Ron D, Popko B (2006) Interferon- γ inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain* 129(5):1306–1318. <https://doi.org/10.1093/brain/awl044>
131. Way SW, Podojil JR, Clayton BL, Zaremba A, Collins TL, Kunjamma RB, Robinson AP, Brugarolas P, Miller RH, Miller SD (2015) Pharmaceutical integrated stress response enhancement protects oligodendrocytes and provides a potential multiple sclerosis therapeutic. *Nat Commun* 6(1):6532. <https://doi.org/10.1038/ncomms7532>
132. Zhao J, Zhao G, Lang J, Sun B, Feng S, Li D, Sun G (2024) EXPRESS: Astragaloside IV ameliorated neuroinflammation and improved neurological functions in mice exposed to traumatic brain injury by modulating the PERK-eIF2 α -ATF4 signaling pathway. *J Invest Med* 10815589241261293. <https://doi.org/10.1177/10815589241261293>
133. Petrov T, Underwood BD, Braun B, Alousi SS, Rafols JA (2001) Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2 α are paralleled by suppression of pro-

- tein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *J Neurotrauma* 18(8):799–812.
<https://doi.org/10.1089/089771501316919166>
134. Tan H-P, Guo Q, Hua G, Chen J-X, Liang J-C (2018) Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates secondary injury after traumatic brain injury. *Neur Regener Res* 13(5):827–836.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.232477>
 135. Dash PK, Hylin MJ, Hood KN, Orsi SA, Zhao J, Redell JB, Tsvetkov AS, Moore AN (2015) Inhibition of eukaryotic initiation factor 2 alpha phosphatase reduces tissue damage and improves learning and memory after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 32(20):1608–1620.
<https://doi.org/10.1089/neu.2014.3772>
 136. Sun D, Wang J, Liu X, Fan Y, Yang M, Zhang J (2020) Dexmedetomidine attenuates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal function after traumatic brain injury in mice. *Brain Res* 1732:146682.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146682>
 137. Begum G, Yan HQ, Li L, Singh A, Dixon CE, Sun D (2014) Docosahexaenoic acid reduces ER stress and abnormal protein accumulation and improves neuronal function following traumatic brain injury. *J Neurosci* 34(10):3743–3755.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2872-13.2014>
 138. Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Turner RC, Huber JD, Rosen CL (2017) Endoplasmic reticulum stress modulation as a target for ameliorating effects of blast induced traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 34(S1):S62–S70.
<https://doi.org/10.1089/neu.2016.4680>
 139. Liu S, Jin R, Xiao AY, Chen R, Li J, Zhong W, Feng X, Li G (2019) Induction of neuronal PI3K γ contributes to endoplasmic reticulum stress and long-term functional impairment in a murine model of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 16(4):1320–1334.
<https://doi.org/10.1007/s13311-019-00748-x>
 140. Hood KN, Zhao J, Redell JB, Hylin MJ, Harris B, Perez A, Moore AN, Dash PK (2018) Endoplasmic reticulum stress contributes to the loss of newborn hippocampal neurons after traumatic brain injury. *J Neurosci* 38(9):2372–2384.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1756-17.2018>
 141. Wang CF, Zhao CC, He Y, Li ZY, Liu WL, Huang XJ, Deng YF, Li WP (2019) Mild hypothermia reduces endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal functions after severe traumatic brain injury. *Brain Behav* 9(4):e01248.
<https://doi.org/10.1002/brb3.1248>
 142. Wang Z-f, Gao C, Chen W, Gao Y, Wang H-c, Meng Y, Luo C-l, Zhang M-y, Chen G, Chen X-p (2019) Salubrinol offers neuroprotection through suppressing endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis in a mouse traumatic brain injury model. *Neurobiol Learn Mem* 161:12–25.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.03.002>
 143. Underwood BD (2001) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha and release of cytochrome c following traumatic brain injury in the rat. Wayne State University.
 144. Chen X, Mi L, Gu G, Gao X, Gao X, Shi M, Chai Y, Chen F, Yang W, Zhang J (2022) Dysfunctional endoplasmic reticulum-mitochondrion coupling is associated with endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and neurological deficits in a rodent model of severe head injury. *J Neurotrauma* 39(7-8):560–576.
<https://doi.org/10.1089/neu.2021.0347>
 145. Wu M-Y, Gao F, Tang J-F, Shen J-C, Gao R, Dang B-Q, Chen G (2021) Possible mechanisms of the PERK pathway on neuronal apoptosis in a rat model of surgical brain injury. *Am J Transl Res* 13(2):732.
 146. Sun D, Gu G, Wang J, Chai Y, Fan Y, Yang M, Xu X, Gao W, Li F, Yin D (2017) Administration of tauroursodeoxycholic acid attenuates early brain injury via Akt pathway activation. *Front Cell Neurosci* 11:193.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00193>
 147. Liu H, He S, Li C, Wang J, Zou Q, Liao Y, Chen R (2022) Tetrandrine alleviates inflammation and neuron apoptosis in experimental traumatic brain injury by regulating the IRE1 α /JNK/CHOP signal pathway. *Brain Behav* 12(12):e2786.
<https://doi.org/10.1002/brb3.2786>
 148. Li L, Luo Q, Shang B, Yang X, Zhang Y, Pan Q, Wu N, Tang W, Du D, Sun X (2022) Selective activation of cannabinoid receptor-2 reduces white matter injury via PERK signaling in a rat model of traumatic brain injury. *Exper Neurol* 347:113899.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113899>
 149. Deng C, Yi R, Fei M, Li T, Han Y, Wang H (2021) Naringenin attenuates endoplasmic reticulum stress, reduces apoptosis, and improves functional recovery in experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 1769:147591.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147591>
 150. Faulkner MB, Rizk M, Bazzi Z, Dysko RC, Zhang Z (2023) Sex-Specific Effects of Buprenorphine on Endoplasmic Reticulum Stress, Abnormal Protein Accumulation, and Cell Loss After Pediatric Mild Traumatic Brain Injury in Mice. *Neurotrauma Rep* 4(1):573–585.
<https://doi.org/10.1089/neur.2023.0051>
 151. Chang L, Liu X, Chen J, Liu H, Wang G, Wang G, Liao X, Shen X (2022) Attenuation of activated eIF2 α signaling by ISRIB treatment after spinal cord injury improves locomotor function. *J Mol Neurosci* 1–13.
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01920-9>
 152. Logsdon AF, Turner RC, Lucke-Wold BP, Robson MJ, Naser ZJ, Smith KE, Matsumoto RR, Huber JD, Rosen CL (2014) Altering endoplasmic reticulum stress in a model of blast-induced traumatic brain injury controls cellular fate and ameliorates neuropsychiatric symptoms. *Front Cell Neurosci* 8:421.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00421>
 153. Ling Y, Ramalingam M, Lv X, Niu D, Zeng Y, Qiu Y, Si Y, Guo T, Ni Y, Zhang J (2024) Human neural stem cell secretome relieves endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal functions after traumatic brain injury in a rat model. *J Mol Histol* 1–20.
<https://doi.org/10.1007/s10735-024-10192-7>
 154. Li L, Tan H-P, Liu C-Y, Yu L-T, Wei D-N, Zhang Z-C, Lu K, Zhao K-S, Maegle M, Cai D-Z (2019) Polydatin prevents the induction of secondary brain injury after traumatic

- brain injury by protecting neuronal mitochondria. *Neur Reg Res* 14(9):1573–1582.
https://doi.org/10.4103/1673-5374.255972
155. Wang F, Zhang C, Zhang Q, Li J, Xue Y, He X, Li F (2023) Lithium ameliorates spinal cord injury through endoplasmic reticulum stress-regulated autophagy and alleviated apoptosis through IRE1 and PERK/eIF2 α signaling pathways. *J Neurorestoratol* 11(4):100081.
https://doi.org/10.1016/j.jnrt.2023.100081
 156. Lucke-Wold BP, Turner RC, Logsdon AF, Nguyen L, Bailes JE, Lee JM, Robson MJ, Omalu BI, Huber JD, Rosen CL (2016) Endoplasmic reticulum stress implicated in chronic traumatic encephalopathy. *J Neurosurg* 124(3):687–702.
https://doi.org/10.3171/2015.3.JNS141802
 157. Kwon SK, Ahn M, Song H-J, Kang SK, Jung S-B, Harsha N, Jee S, Moon JY, Suh K-S, Do Lee S. (2015) Nafamostat mesilate attenuates transient focal ischemia/reperfusion-induced brain injury via the inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Brain Res* 1627:12–20.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.013
 158. Huang T, Zhao J, Guo D, Pang H, Zhao Y, Song J (2018) Curcumin mitigates axonal injury and neuronal cell apoptosis through the PERK/Nrf2 signaling pathway following diffuse axonal injury. *Neuroreport* 29(8):661–677.
https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001015
 159. Rubovitch V, Barak S, Rachmany L, Goldstein RB, Zilberstein Y, Pick CG (2015) The neuroprotective effect of salubrinal in a mouse model of traumatic brain injury. *Neuromol Med* 17:58–70.
https://doi.org/10.1007/s12017-015-8340-3
 160. Saraswat Ohri S, Forston MD, Myers SA, Brown BL, Andres KR, Howard RM, Gao Y, Liu Y, Cavener DR, Hetman M (2024) Oligodendrocyte-selective deletion of the eIF2 α kinase Perk/Eif2ak3 limits functional recovery after spinal cord injury. *Glia* 72(7):1259–1272.
https://doi.org/10.1002/glia.24525
 161. Sen T, Gupta R, Kaiser H, Sen N (2017) Activation of PERK elicits memory impairment through inactivation of CREB and downregulation of PSD95 after traumatic brain injury. *J Neurosci* 37(24):5900–5911.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2343-16.2017
 162. Huang T-c, Luo L, Jiang S-h, Chen C, He H-y, Liang C-f, Li W-s, Wang H, Zhu L, Wang K (2021) Targeting integrated stress response regulates microglial M1/M2 polarization and attenuates neuroinflammation following surgical brain injury in rat. *Cell Signal* 85:110048.
https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110048
 163. Zhou W, Liang Y, Liao X, Tong L, Du W, Fu W, Tian S, Deng Y, Jiang X (2024) ISRIB improves white matter injury following TBI by inhibiting NCOA4-mediated ferritinophagy. *Neurochem Intl* 177:105744.
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105744
 164. Krukowski K, Nolan A, Frias ES, Grue K, Becker M, Ureta G, Delgado L, Bernalles S, Sohal VS, Walter P (2020) Integrated stress response inhibitor reverses sex-dependent behavioral and cell-specific deficits after mild repetitive head trauma. *J Neurotrauma* 37(11):1370–1380.
https://doi.org/10.1089/neu.2019.6827
 165. Ilyin NP, Galstyan DS, Demin KA, Kalueff AV (2023) Behavioral, Genomic and Neurochemical Deficits Evoked by Neurotrauma in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *J Evol Biochem Physiol* 59(6):2179–2195.
https://doi.org/10.1134/S0022093023060224
 166. Bond S, Lopez-Lloreda C, Gannon PJ, Akay-Espinoza C, Jordan-Sciutto KL (2020) The integrated stress response and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α in neurodegeneration. *J Neuropathol Exper Neurol* 79(2):123–143.
https://doi.org/10.1093/jnen/nlzl29
 167. Korneeva NL (2022) Integrated stress response in neuronal pathology and in health. *Biochemistry (Moscow)* 87(Suppl 1):S111–S127.
https://doi.org/10.1134/S0006297922140103
 168. Romero-Ramírez L, Nieto-Sampedro M, Barreda-Manso MA (2017) Integrated stress response as a therapeutic target for CNS injuries. *BioMed Res Intl* 2017(1):6953156.
https://doi.org/10.1155/2017/6953156
 169. Rabouw HH, Langereis MA, Anand AA, Visser LJ, de Groot RJ, Walter P, van Kuppeveld FJ (2019) Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(6):2097–2102.
https://doi.org/10.1073/pnas.1815767116
 170. Sidrauski C, McGeachy AM, Ingolia NT, Walter P (2015) The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 α phosphorylation on translation and stress granule assembly. *Elife* 4:e05033.
https://doi.org/10.7554/eLife.05033.016
 171. Cnop M, Ladriere L, Hekerman P, Ortis F, Cardozo AK, Dogusan Z, Flamez D, Boyce M, Yuan J, Eizirik DL (2007) Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 α dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis. *J Biol Chem* 282(6):3989–3997.
https://doi.org/10.1074/jbc.M607627200
 172. Zadorozhnyi PV, Kiselev VV, Kharchenko AV (2022) In Silico ADME Profiling of Salubrinal and Its Analogues. *Fut Pharmacol*.
https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2020013
 173. Matsuoka M, Komoike Y (2015) Experimental evidence shows salubrinal, an eIF2 α dephosphorylation inhibitor, reduces xenotoxicant-induced cellular damage. *Intl J Mol Sci* 16(7):16275–16287.
https://doi.org/10.3390/ijms160716275
 174. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D (2005) A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307(5711):935–939.
https://doi.org/10.1126/science.1101902
 175. Jeon Y-J, Kim JH, Shin J-I, Jeong M, Cho J, Lee K (2016) Salubrinal-mediated upregulation of eIF2 α phosphorylation increases doxorubicin sensitivity in MCF-7/ADR cells. *Mol Cells* 39(2):129–135.
https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2243
 176. Cankara FN, Kuş MS, Günaydın C, Şafak S, Bilge SS, Özmen O, Tural E, Kortholt A (2022) The beneficial effect of

- salubrious on neuroinflammation and neuronal loss in intranigral LPS-induced hemi-Parkinson disease model in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 44(2):168–177. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.2023174>
177. Chen Y, Li B, Xu Y, Zhou T, Zhao C, Zhao J (2023) Sal003 alleviated intervertebral disc degeneration by inhibiting apoptosis and extracellular matrix degradation through suppressing endoplasmic reticulum stress pathway in rats. *Front Pharmacol* 14:1095307. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1095307>
 178. Fujita R, Ono Y (2016) eIF2 α , a potential target for stem cell-based therapies. *Stem Cell Invest* 3. <https://doi.org/10.21037/sci.2016.07.01>
 179. Lean G, Halloran M, Mariscal O, Jamet S, Lumb J-P, Crist C (2019) Ex vivo expansion of skeletal muscle stem cells with a novel small compound inhibitor of eIF2 α dephosphorylation. *bioRxiv*:567461. <https://doi.org/10.1101/567461>
 180. Wu Y, Zhang H, Wang Y, Zhang Y, Hong Z, Wang D (2024) Sephin1 enhances integrated stress response and autophagy to alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Biomed Pharmacother* 176:116869. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116869>
 181. Axten JM, Romeril SP, Shu A, Ralph J, Medina JR, Feng Y, Li WHH, Grant SW, Heerding DA, Minthorn E (2013) Discovery of GSK2656157: an optimized PERK inhibitor selected for preclinical development. *ACS Med Chem Lett* 4(10):964–968. <https://doi.org/10.1021/ml400228e>
 182. Krishnamoorthy J, Rajesh K, Mirzajani F, Kesoglidou P, Papadakis A, Koromilas AE (2014) Evidence for eIF2 α phosphorylation-independent effects of GSK2656157, a novel catalytic inhibitor of PERK with clinical implications. *Cell Cycle* 13(5):801–816. <https://doi.org/10.4161/cc.27726>
 183. Dhir N, Jain A, Sharma AR, Prakash A, Radotra BD, Medhi B (2023) PERK inhibitor, GSK2606414, ameliorates neuropathological damage, memory and motor functional impairments in cerebral ischemia via PERK/p-eIF2 α /ATF4/CHOP signaling. *Metab Brain Dis* 38(4):1177–1792. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01183-w>
 184. Axten JM (2017) Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) inhibitors: a patent review (2010–2015). *Exp Opin Ther Patents* 27(1):37–48. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1238072>
 185. Yu Z-Z, Xu B-Q, Wang Y-Y, Zhang P-W, Shu Y-B, Shi Z (2023) GSK2606414 Sensitizes ABCG2-Overexpressing Multidrug-Resistant Colorectal Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs. *Biomedicines* 11:113103. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113103>
 186. Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF (2016) Major depressive disorder. *Nat Revs Dis Primers* 2(1):1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>
 187. Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, Brizard B, El Hage W, Surget A, Belzung C (2021) Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci* 53(1):151–171. <https://doi.org/10.1111/ejn.14720>
 188. Bhatt S, Nagappa AN, Patil CR (2020) Role of oxidative stress in depression. *Drug Discov Today* 25(7):1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.05.001>
 189. Mao J, Hu Y, Ruan L, Ji Y, Lou Z (2019) Role of endoplasmic reticulum stress in depression. *Mol med Rep* 20(6):4774–4780. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10789>
 190. Yoshino Y, Dwivedi Y (2020) Elevated expression of unfolded protein response genes in the prefrontal cortex of depressed subjects: Effect of suicide. *J Affect Disord* 262:229–236. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.11.001>
 191. Munshi S, Alarbi A, Zheng H, Kuplicki R, Burrows K, Figueroa-Hall L, Victor T, Aupperle R, Khalsa S, Paulus M (2024) Increased expression of ER stress, inflammasome activation, and mitochondrial biogenesis-related genes in peripheral blood mononuclear cells in major depressive disorder. *Res Square* (in press). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3564760/v1>
 192. Tang M, Liu T, Shen Y, Wang L, Xue Y, Zhao T, Xie K, Gong Z, Yin T (2023) Potential antidepressant-like effects of N-3 polyunsaturated fatty acids through inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Psychopharmacology* 240(9):1877–1889. <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06377-9>
 193. Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman MM, Breen G, Byrne EM, Blackwood DH, Boomsma DI, Cichon S, Heath AC, Holsboer F, Lucae S, Madden PA, Martin NG, McGuffin P, Muglia P, Nothen MM, Penninx BP, Pergadia ML, Potash JB, Rietschel M, Lin D, Müller-Myhsok B, Shi J, Steinberg S, Grabe HJ, Lichtenstein P, Magnusson P, Perlis RH, Preisig M, Smoller JW, Stefansson K, Uher R, Kutalik Z, Tansey KE, Teumer A, Viktorin A, Barnes MR, Bettecken T, Binder EB, Breuer R, Castro VM, Churchill SE, Coryell WH, Craddock N, Craig IW, Czamara D, De Geus EJ, Degenhardt F, Farmer AE, Fava M, Frank J, Gainer VS, Gallagher PJ, Gordon SD, Goryachev S, Gross M, Guipponi M, Henders AK, Herms S, Hickie IB, Hoefels S, Hoogendijk W, Hottenga JJ, Iosifescu DV, Ising M, Jones I, Jones L, Jung-Ying T, Knowles JA, Kohane IS, Kohli MA, Korszun A, Landen M, Lawson WB, Lewis G, Macintyre D, Maier W, Mattheisen M, McGrath PJ, McIntosh A, McLean A, Middeldorp CM, Middleton L, Montgomery GM, Murphy SN, Nauck M, Nolen WA, Nyholt DR, O'Donovan M, Oskarsson H, Pedersen N, Schefner WA, Schulz A, Schulze TG, Shyn SI, Sigurdsson E, Slager SL, Smit JH, Stefansson H, Steffens M, Thorgeirsson T, Tozzi F, Treutlein J, Uhr M, van den Oord EJ, Van Grootheest G, Völzke H, Weiburg JB, Willemsen G, Zitman FG, Neale B, Daly M, Levinson DF, Sullivan PF (2013) A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 18(4):497–511. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.21>

194. Mei L, Gao Y, Chen M, Zhang X, Yue W, Zhang D, Yu H (2022) Overlapping common genetic architecture between major depressive disorders and anxiety and stress-related disorders. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 113:110450.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110450>
195. Lee PH, Anttila V, Won H, Feng Y-CA, Rosenthal J, Zhu Z, Tucker-Drob EM, Nivard MG, Grotzinger AD, Posthuma D (2019) Genomic relationships, novel loci, and pleiotropic mechanisms across eight psychiatric disorders. *Cell* 179(7):1469–1482.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.020>
196. Li M-X, Li Q, Sun X-J, Luo C, Li Y, Wang Y-N, Chen J, Gong C-Z, Li Y-J, Shi L-P (2019) Increased Homer1-mGluR5 mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors and glutamatergic dysregulation via activation of PERK-eIF2 α . *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 95:109682.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109682>
197. Liu K, Qu Y, Li B, Zeng N, Yao G, Wu X, Xu H, Yan C, Wu L (2024) GRP94 in cerebrospinal fluid may contribute to a potential biomarker of depression: Based on proteomics. *J Psychiatr Res* 169:328–340.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.11.028>
198. Karaağaç M, Ak M, Kurar E, Uguz F, Kutlu S (2023) Investigation of the effects of antidepressant treatment on hippocampus and hypothalamus endoplasmic reticulum stress in chronic mild stress induced depression in rats. *Turk J Clin Psychiatry* 26(4):238–247.
<https://doi.org/10.5505/kpd.2023.43410>
199. Xu XF, meng Shi M, ying Luo M, dan Liu D, ming Guo D, Ling C, Zhong XL, Xu Y, Cao WY (2022) Targeting perk mediated endoplasmic reticulum stress attenuates neuroinflammation and alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in male mice. *Intl Immunopharmacol* 111:109092.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109092>
200. Miquel-Rio L, Sarriés-Serrano U, Sancho-Alonso M, Florensa-Zanuy E, Paz V, Ruiz-Bronchal E, Manashirov S, Campa L, Pilar-Cuellar F, Bortolozzi A (2024) ER stress in mouse serotonin neurons triggers a depressive phenotype alleviated by ketamine targeting eIF2 α signaling. *Is-science* 27(5).
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109787>
201. Hosak L, Hosakova J (2015) The complex etiology of schizophrenia-general state of the art. *Neuroendocrinol Lett* 36(7):631–637.
202. McCutcheon RA, Marques TR, Howes OD (2020) Schizophrenia-an overview. *JAMA Psychiatry* 77(2):201–210.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.3360>
203. Qu M, Tang F, Wang L, Yan H, Han Y, Yan J, Yue W, Zhang D (2008) Associations of ATF4 gene polymorphisms with schizophrenia in male patients. *Am J Med Genet Part B: Neuropsychiatric Genet* 147(6):732–736.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30675>
204. Carter CJ (2007) eIF2B and oligodendrocyte survival: where nature and nurture meet in bipolar disorder and schizophrenia? *Schiz Bull* 33(6):1343–1353.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbm007>
205. Aryal S, Bonanno K, Song B, Mani D, Keshishian H, Carr SA, Sheng M, Dejanovic B (2023) Deep proteomics identifies shared molecular pathway alterations in synapses of patients with schizophrenia and bipolar disorder and mouse model. *Cell Rep* 42(5).
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112497>
206. Ifhar LS, Ene HM, Ben-Shachar D (2019) Impaired heme metabolism in schizophrenia-derived cell lines and in a rat model of the disorder: Possible involvement of mitochondrial complex I. *Eur Neuropsychopharmacol* 29(5):577–589.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.03.011>
207. Menéndez-Valle I, Cachán-Vega C, Boga JA, González-Blanco L, Antuña E, Potes Y, Caballero B, Vega-Naredo I, Saiz P, Bobes J (2023) Differential Cellular Interactome in Schizophrenia and Bipolar Disorder-Discriminatory Biomarker Role. *Antioxidants* 12(11):1948.
<https://doi.org/10.3390/antiox12111948>
208. Kabir Z, Che A, Fischer D, Rice R, Rizzo B, Byrne M, Glass M, De Marco Garcia N, Rajadhyaksha A (2017) Rescue of impaired sociability and anxiety-like behavior in adult cacna1c-deficient mice by pharmacologically targeting eIF2 α . *Mol Psychiatry* 22(8):1096–1109.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.124>
209. Wang X, Ye F, Wen Z, Guo Z, Yu C, Huang W-K, Rojas Ringeling F, Su Y, Zheng W, Zhou G (2021) Structural interaction between DISC1 and ATF4 underlying transcriptional and synaptic dysregulation in an iPSC model of mental disorders. *Mol Psychiatry* 26(4):1346–1360.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0485-2>
210. Trinh MA, Kaphzan H, Wek RC, Pierre P, Cavener DR, Klann E (2012) Brain-specific disruption of the eIF2 α kinase PERK decreases ATF4 expression and impairs behavioral flexibility. *Cell Rep* 1(6):676–688.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.010>
211. Kim P, Scott MR, Meador-Woodruff JH (2021) Dysregulation of the unfolded protein response (UPR) in the dorsolateral prefrontal cortex in elderly patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 26(4):1321–1331.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0537-7>
212. Anderson IM, Haddad PM, Scott J (2012) Bipol Disordr. *BMJ* 345.
<https://doi.org/10.1136/bmj.e8508>
213. Pfaffenseller B, Wollenhaupt-Aguiar B, Fries GR, Colpo GD, Burke RK, Bristot G, Ferrari P, Ceresér KMM, Rosa AR, Klamt F, Kapczinski F (2014) Impaired endoplasmic reticulum stress response in bipolar disorder: cellular evidence of illness progression. *Intl J Neuropsychopharmacol* 17(9):1453–1463.
<https://doi.org/10.1017/S1461145714000443>
214. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Toyota T, Yoshikawa T, Kato T (2009) Aberrant endoplasmic reticulum stress re-

- sponse in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Intl J Neuropsychopharmacol* 12(1):33–43.
<https://doi.org/10.1017/S1461145708009358>
215. *Bengesser SA, Reininghaus EZ, Lackner N, Birner A, Fellendorf FT, Platzer M, Kainzbauer N, Tropper B, Hörmanseder C, Queissner R, Kapfhammer H-P, Wallner-Liebmann SJ, Fuchs R, Petek E, Windpassinger C, Schnalzenberger M, Reininghaus B, Evert B, Waha A* (2018) Is the molecular clock ticking differently in bipolar disorder? Methylation analysis of the clock gene ARNTL. *World J Biol Psychiatry* 19 (Suppl. 2):S21S9.
<https://doi.org/10.1080/15622975.2016.1231421>
 216. *So J, Warsh JJ, Li PP* (2007) Impaired Endoplasmic Reticulum Stress Response in B-Lymphoblasts From Patients With Bipolar-I Disorder. *Biol Psychiatry* 62(2):141–147.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.10.014>
 217. *Ting Z* (2023) Druggable causal genes of bipolar disorder identified through Mendelian Randomization analysis offer a route to intervention in integrated stress response. *medRxiv:2023.12. 20.23300345*.
<https://doi.org/10.1101/2023.12.20.23300345>
 218. *Asaloo S, Jahromi G, Meftahi G, Sahraei H* (2015) Post-traumatic stress disorder (ptsd): Mechanisms and possible treatments. *Neurophysiology* 47:482–489.
<https://doi.org/10.1007/s11062-016-9559-9>
 219. *Wen L, Xiao B, Shi Y, Han F* (2017) PERK signalling pathway mediates single prolonged stress-induced dysfunction of medial prefrontal cortex neurons. *Apoptosis* 22:753–768.
<https://doi.org/10.1007/s10495-017-1371-5>
 220. *Wen L, Han F, Shi Y, Li X* (2016) Role of the endoplasmic reticulum pathway in the medial prefrontal cortex in post-traumatic stress disorder model rats. *J Mol Neurosci* 59:471–482.
<https://doi.org/10.1007/s12031-016-0755-2>
 221. *Koob GF, Volkow ND* (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35(1):217–238.
<https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
 222. *Jian M, Luo Y-X, Xue Y-X, Han Y, Shi H-S, Liu J-F, Yan W, Wu P, Meng S-Q, Deng J-H* (2014) eIF2 α dephosphorylation in basolateral amygdala mediates reconsolidation of drug memory. *J Neurosci* 34(30):10010–10021.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0934-14.2014>
 223. *Werner CT, Stefanik MT, Milovanovic M, Caccamise A, Wolf ME* (2018) Protein translation in the nucleus accumbens is dysregulated during cocaine withdrawal and required for expression of incubation of cocaine craving. *J Neurosci* 38(11):2683–2697.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2412-17.2018>
 224. *Huang W, Placzek AN, Viana Di Prisco G, Khatiwada S, Sidrauski C, Krnjević K, Walter P, Dani JA, Costa-Mattioli M* (2016) Translational control by eIF2 α phosphorylation regulates vulnerability to the synaptic and behavioral effects of cocaine. *Elife* 5:e12052.
<https://doi.org/10.7554/eLife.12052>
 225. *Placzek AN, Prisco GVD, Khatiwada S, Sgritta M, Huang W, Krnjević K, Kaufman RJ, Dani JA, Walter P, Costa-Mattioli M* (2016) eIF2 α -mediated translational control regulates the persistence of cocaine-induced LTP in midbrain dopamine neurons. *Elife* 5:e17517.
<https://doi.org/10.7554/eLife.17517.011>
 226. *Placzek AN, Molfese DL, Khatiwada S, Viana Di Prisco G, Huang W, Sidrauski C, Krnjević K, Amos CL, Ray R, Dani JA* (2016) Translational control of nicotine-evoked synaptic potentiation in mice and neuronal responses in human smokers by eIF2 α . *Elife* 5:e12056.
<https://doi.org/10.7554/eLife.12056.010>
 227. *Kauer JA* (2004) Learning mechanisms in addiction: synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. *Annu Rev Physiol* 66:447–475.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.112534>
 228. *Melas P, Qvist J, Deidda M, Upreti C, Wei Y, Sanna F, Fratta W, Scherma M, Fadda P, Kandel D* (2018) Cannabinoid modulation of eukaryotic initiation factors (eIF2 α and eIF2B1) and behavioral cross-sensitization to cocaine in adolescent rats. *Cell Rep* 22: 2909–2923.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.065>
 229. *Liu J, Yi S, Shi W, Zhang G, Wang S, Qi Q, Cong B, Li Y* (2021) The pathology of morphine-inhibited nerve repair and morphine-induced nerve damage is mediated via endoplasmic reticulum stress. *Front Neurosci* 15: 618190.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.618190>
 230. *Lin T-T, Qu J, Wang C-Y, Yang X, Hu F, Hu L, Wu X-F, Jiang C-Y, Liu W-T, Han Y* (2020) Rescue of HSP70 in spinal neurons alleviates opioids-induced hyperalgesia via the suppression of endoplasmic reticulum stress in rodents. *Front Cell Devel Biol* 8:269.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00269>
 231. *Biever A, Boubaker-Vitre J, Cutando L, Gracia-Rubio I, Costa-Mattioli M, Puighermanal E, Valjent E* (2017) Repeated exposure to D-amphetamine decreases global protein synthesis and regulates the translation of a subset of mRNAs in the striatum. *Front Mol Neurosci* 9:165.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00165>
 232. *Chen G, Yu G, Yong Z, Yan H, Su R, Wang H* (2021) A large dose of methamphetamine inhibits drug evoked synaptic plasticity via ER stress in the hippocampus. *Mol Med Rep* 23(4):1–.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11917>
 233. *Xue B, Fitzgerald CA, Jin D-Z, Mao L-M, Wang JQ* (2016) Amphetamine elevates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) in the rat forebrain via activating dopamine D1 and D2 receptors. *Brain Res* 1646:459–466.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.027>

ROLE OF THE INTEGRATED STRESS RESPONSE SYSTEM (ISR) IN NEUROPSYCHIATRIC PATHOLOGIES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

N. P. Ilyin^{a, b}, V. S. Nikitin^c, and A. V. Kalueff^{a, b, c, #}

^a*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^b*Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia*

^c*Neurobiology, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia*

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

The integrated stress response (ISR) is a mechanism of cellular response to various stress signals that is conserved in all eukaryotes, from yeast to humans. A central element of IOS is phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α). This process is regulated by four kinases: PERK, GCN2, HRI and PKR, each of which is activated by different stress conditions. The ISR plays a critical role in maintaining cell homeostasis and survival under stress, but chronic activation can lead to cell dysfunction and programmed cell death. Recent studies indicate that IOS is actively involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, amyotrophic lateral sclerosis and traumatic brain injury. At the same time, the contribution of IRS to mental pathologies such as depression, schizophrenia, bipolar disorder, post-traumatic stress disorder and addiction remains poorly understood. This article reviews current data on the role of IRS in the pathogenesis of these disorders, and also discusses the possibilities of pharmacological modulation of IOS pathways in the pathological contexts.

Keywords: integrated stress response, neuropsychiatric disorders, depression, schizophrenia, addiction, eIF2 α , ATF4

ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОПОЭЗА ГИБЕРНИРУЮЩИХ СУСЛИКОВ *UROCITELLUS UNDULATUS*

© 2024 г. К. И. Лизоркина*, Г. Е. Аксенова, В. Н. Афанасьев, П. О. Теплова, Н. М. Захарова

Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская область, Россия

*e-mail: lizorkina_kseniia@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2024 г.

После доработки 31.10.2024 г.

Принята к публикации 03.11.2024 г.

Проведены исследования морфофункциональных особенностей костного мозга бедренной и плечевой костей у длиннохвостых сусликов летом, осенью, во время торпора и в периоды кратковременных пробуждений зимой (зимняя эутермия). Гистологический анализ показал увеличение количества и размера адипоцитов в костном мозге у животных в состоянии торпора, с частичным замещением миелоидной ткани на жировую. Несмотря на больший объем костного мозга в бедренной кости, в нем обнаружено значительно меньше ядерных клеток, чем в плечевой кости, но существенно больше эритроидных островков, особенно во время спячки. У торпидных сусликов происходит замещение дисковидных эритроцитов в крови на атипичные формы эритроцитов (овальные, макроциты, мишеневидные), количество которых значительно уменьшается в зимний эутермный период. Уровень содержания ретикулоцитов возрастает в период спячки двукратно по сравнению с летом. Полученные результаты обсуждаются в контексте поддержания высокого уровня кислорода в крови во время торпора и адаптации эритропоэза к условиям длительной гипотермии.

Ключевые слова: длиннохвостый суслик, гибернация, гипотермия, костный мозг, эритропоэз, насыщение кислородом крови

DOI: 10.31857/S0044452924070026, **EDN:** KKEALF

ВВЕДЕНИЕ

У гетеротермных животных эволюционно выработалось множество физиологических приспособлений, позволяющих пережить им экстремальные воздействия внешней среды путем обратимого снижения метаболизма, температуры тела, частоты сердечных сокращений, дыхательных движений и рядом других изменений [1]. Так, во время торпора у животных наблюдается снижение уровней лейкоцитов и тромбоцитов почти на 90%, которые быстро восстанавливаются во время кратковременных пробуждений до летних значений [2–4]. При этом эритроцитарные показатели в гибернационный период остаются практически на одном уровне с летом [3, 5], но физиологические свойства эритроцитов отличаются в зависимости от сезона [6–9].

Производство эритроцитов, или эритропоэз, представляет собой строго регулируемый процесс, при котором новые эритроциты непрерывно вырабатываются в нише костного мозга (КМ) [10]. Последний этап процесса созревания эритроцитов происходит в кровотоке, после выхода туда ретику-

лоцитов, или преждевременных эритроцитов. Эритроциты подвергаются многочисленным и часто жестко регулируемым процессам, направленным на перестройку их структуры, начиная с потери сложной системы органелл и последующего приобретения типичной двояковогнутой формы [11]. После созревания эритроциты приобретают способность деформироваться [12] и используют это для прохождения через самые узкие кровеносные капилляры [11, 13]. Несмотря на снижение скорости кровотока, ткани сусликов не страдают как от гипоксии во время торпора [14–17], так и от окислительного стресса во время пробуждения, поскольку антиоксидантная система защиты в эритроцитах препятствует этому [7]. Остается открытым вопрос: сохраняются ли такими же стабильными, как эритроцитарные показатели [2, 3], показатели содержания кислорода в крови сусликов *Urocitellus undulatus*, находящихся в разных функциональных состояниях, и каким образом функционирует чувствительный к кислороду эритропоэз, в особенности, в торпидный период в условиях обнаруженного нами ранее снижения пролиферации ядерных клеток в костном мозге [18].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на длиннохвостых сусликах *Urocitellus undulatus* обоего пола следующих групп: “лето” (бодрствующие активные животные в летний период, контроль, температура в области сердца 38°C, июнь-июль, $n = 26$); “осень” (предгибернационный период, температура в области сердца 36–37 °C, октябрь, $n = 9$); “торпор/оцепенение” (гипотермия, температура в области сердца 0.5–5°C, декабрь-февраль, $n = 27$); “зимняя эутермия” (ЗЭ) (пробужденные на 5–6 день торпора, взятие материала через 10–12 ч после пробуждения, температура в области сердца 35–37°C, декабрь-февраль, $n = 26$).

Сусликов отлавливали в конце августа в местах их естественного обитания (долина реки Лена, Якутия) и доставляли в лабораторию ИБК РАН (Пушино, Московская область). До конца октября животных содержали в индивидуальных клетках в специально приспособленных неотапливаемых помещениях с соблюдением естественного фотопериода, при достаточном количестве пищи (зерно, семена подсолнечника, корнеплоды) и гнездового материала (*ad libitum*). Затем клетки с сусликами переносили в темное помещение с температурой 0–2°C до окончания периода гибернации (апрель).

Для мониторинга баутов в период спячки часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики (20 × 20 × 25 см), в дно которых был установлен термистор (чувствительность, 0.2 °C). Во время спячки температура гнезда находилась в пределах 1–2°C. Для провокации пробуждения животных извлекали из ящика в середине баута спячки (5–6 сутки гипотермии) и переносили в помещение с температурой воздуха 20 ± 1 °C. Активных животных (летних, осенних и эутермных зимних) перед забором материала подвергали легкому наркозу (Zoletil, Virbac, Франция, 4 мг/кг, внутримышечно). Температуру сердечной мышцы у всех групп животных точно измеряли датчиком RET-3 (Physitemp, USA, ± 0.1 °C) сразу после вскрытия грудной клетки [19].

Забор крови, измерение содержания кислорода, гематокрита и лактата в крови. Забор крови (смешанной, содержащей артериальную и венозную) проводили с 10.00 до 11.00 ч незамедлительно после декапитации животных. Кровь собирали в пластиковую микропробирку (0.2 мл) с гепарином лития. Анализ содержания кислорода и гематокрита проводили не более, чем через 5 минут после забора крови на анализаторе газов и химического состава крови i15 Vet EDAN (Edan Instruments, Китай), с использованием тест-картриджей BG-8 и калибровочного устройства CP50 для i15 Vet (Китай).

Для измерения лактата кровь отбирали в стерильную пластмассовую пробирку и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Содержание лактата определяли в сыворотке крови без следов гемолиза на ве-

теринарном автоматическом анализаторе iMagic-V7 (Shenzhen iCubio Biomedical Technology Co. Ltd., Китай). Показатели оценивали с помощью биохимического набора реагентов для ветеринарии ДиаВетТест (ООО Диакон-Вет, Россия).

Исследования клеточного цикла костного мозга. Красный костный мозг (КМ) из диафизов кости плеча (КМП) и кости бедра (КМБ) извлекали на льду. Клеточную суспензию готовили в среде Хенкса без ионов кальция (Thermo Fisher Scientific, США). Фиксацию проводили добавлением холодного 96% этанола при встряхивании (1:1 по объему) и выдерживали при –20°C не менее суток. Окрашивали ДНК-специфичным флуоресцентным красителем Hoechst-33258 (SERVA, Германия) (1 мкг/мл в 0.1 М трис–HCl-буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М NaCl) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Распределение клеток по фазам митотического цикла определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytoflex S (Beckman Coulter, США) с помощью программы CytExpert.

Подсчет ядерных клеток костного мозга проводили в камере Горяева. Навеску ткани суспендировали в 400–500 объемах 4%-й уксусной кислоты.

Приготовление мазков крови, микроскопия ретикулоцитов. Мазки крови готовили по общепринятой методике сразу после декапитации животных. Для микроскопии ретикулоцитов отбирали 100 мкл крови в пробирку (0.5 мл) с раствором бриллиантового крезильного синего (АБРИС+, Россия) и окрашивали в течение 30 мин. После чего отбирали 2–3 мкл полученной смеси, делали мазок и высушивали на воздухе.

Микроскопия эритроцитов. Для микроскопии эритроцитов наносили 2–3 мкл крови на стекло, делали мазок, высушивали на воздухе, после чего окрашивали рабочим раствором Дифф-квик (АБРИС+, Россия). Микроскопирование окрашенных препаратов производили с помощью иммерсионной системы не менее, чем на 1000 эритроцитов.

Гистологический анализ. Забор органов проводили сразу после декапитации животных. Кость очищали от остатков мягких тканей и удаляли эпифизы, после чего из диафиза выдавливали костный мозг в пробирку объемом 15 мл при помощи шприца с нейтральным формалином. Затем делали проводку изопропанол-парафин и получали срезы на микротоме Leica RM 2245 (Leica, Германия). После депарафинизации стекла со срезами стандартно окрашивали гематоксилином и эозином. Изображение препаратов получали с широкопольного прямого микроскопа Leica DM 6000 B (Leica, Германия) на базе сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН.

Статистический анализ. Статистический анализ был выполнен с помощью программ Statistica 10.0.1011 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 9.4.1.681 (GraphPad Software Inc., США). Данные

представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) и в виде диаграмм размаха (box plot). Анализ вида распределения данных проводили с помощью Shapiro-Wilk's test. Однофакторный дисперсионный анализ измерений ANOVA (One-way ANOVA) применяли при подсчете процента ретикулоцитов в крови. Для дальнейшего попарного сравнения использовали апостериорный тест Тьюки (Tukey's test). Достоверность различий во всех остальных экспериментах оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (Two-way ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки (Tukey's test).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В таблице 1 представлены показатели содержания кислорода крови, который, во время торпора

вырос в 1.1 раза по сравнению с летними значениями, а во время зимней эутермии значительно снизился по сравнению с летом и торпором в 1.2 и в 1.3 раза соответственно. При измерении лактата в сыворотке крови торпидных животных было обнаружено его существенное снижение (в 8 раз по сравнению с летом). После пробуждения уровень лактата в крови восстановился лишь наполовину. Уровень гематокрита в торпоре повысился в 1.2 раз относительно лета и не восстановился после пробуждения.

Гистологический анализ костного мозга сусликов (рис. 1) выявил увеличение количества и размера адипоцитов как в плечевой, так и бедренной костях, начиная с осеннего периода подготовки к спячке, прогрессирующее во время торпора и зимней эутермии. При этом в КМБ осенью и в большей

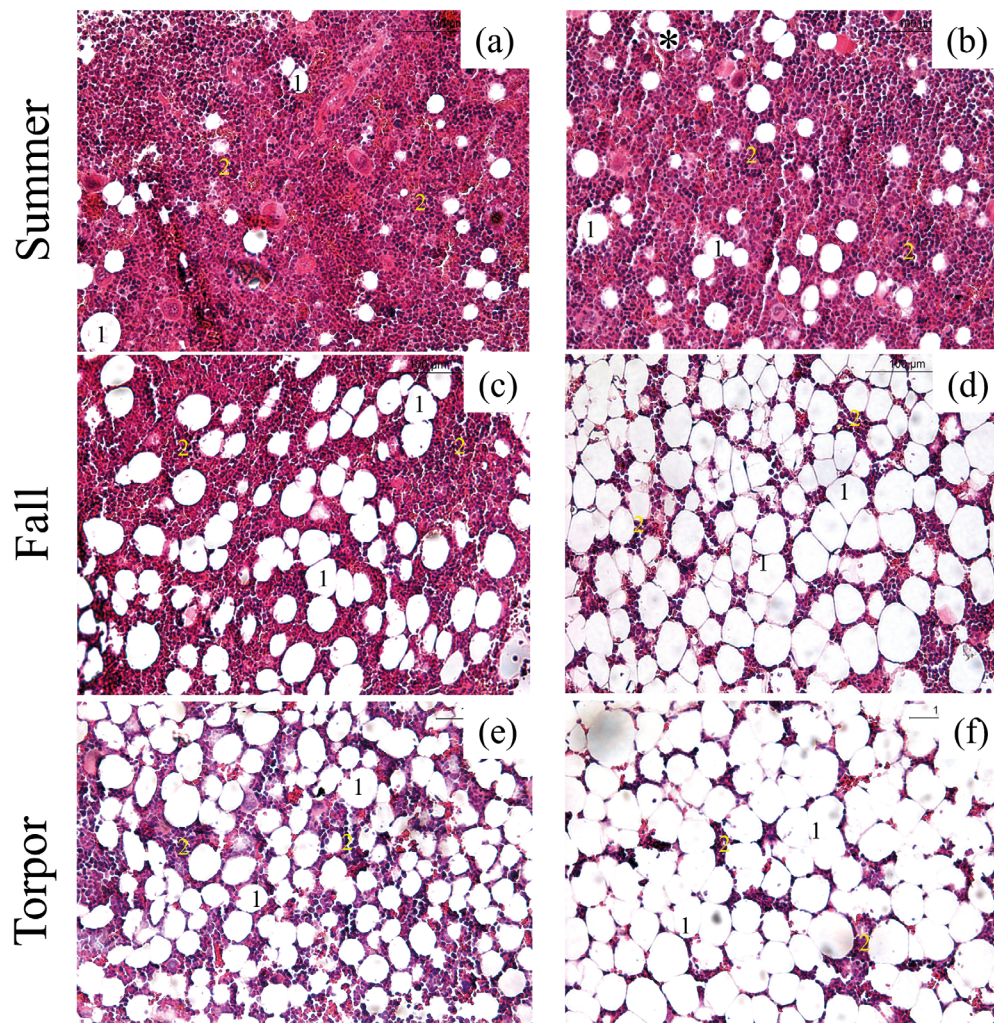


Рис. 1. Микрофотографии препаратов костного мозга длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* в активном летнем, осеннем и торпидном состоянии. Окраска гематоксилин – эозин. (a), (b) – летние животные, (c), (d) – осенние, (e), (f) – торпидные. (a), (c), (e) – костный мозг из плеча, (b), (d), (f) – костный мозг из бедра. Адипоциты отмечены цифрой 1, эритроидные островки цифрой 2. Световая микроскопия.

Таблица 1. Сатурация, содержание лактата и гематокрита в крови сусликов

Группа	Сатурация, %	Лактат, лакт/ммоль	Гематокрит, %
Лето	94±1.7	7.1±0.4	43.8±1.3
Торпор	99±0.1	0.9±0.1*	49±1*
Зимняя эутермия	79±2.6*#	3.9±0.3*#	46±0.7#

Значения представлены как $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * – статистически значимые различия в торпоре и во время зимней эутермии по сравнению с летом ($p < 0.05$). # – статистически значимые различия между группами “зимняя эутермия” и “торпор” ($p < 0.05$). ($n = 10$ для каждой группы).

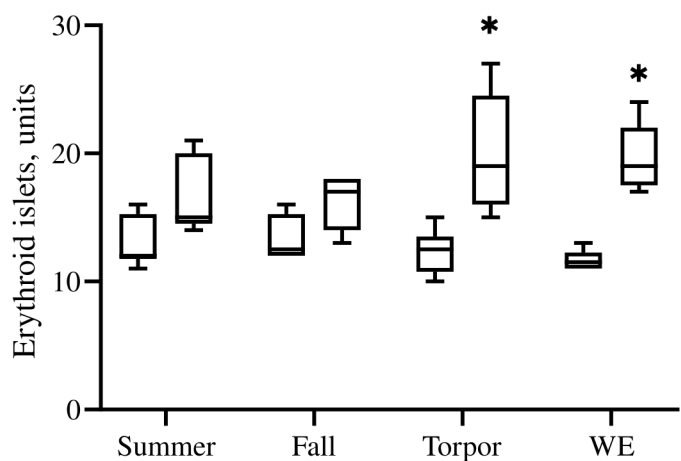


Рис. 2. Количество эритроидных островков в КМ обеих костей в активном летнем, осеннем, торпидном и зимнем эутермном (WE) состоянии сусликов. Светлые столбцы – КМП, темные столбцы – КМБ. Подсчет осуществляли в поле зрения (400х400 мкм, $n = 9$ для каждой группы) с помощью некоммерческого программного обеспечения ImageJ. * – статистически значимые различия между группами относительно одного и того же сезона ($p < 0.05$).

степени в торпоре происходило частичное замещение миелоидной ткани жировой, сохраняющееся во время ЗЭ.

Сравнение количества эритроидных островков (ЭО) показало достоверную разницу между их количеством в КМП и КМБ. Осенью, в торпидном состоянии и во время зимней эутермии в КМБ содержится в 1.4, 1.5 и в 1.7 раз больше ЭО, чем в КМП, соответственно. В летний период значимых различий не обнаружено (рис. 2).

Анализ адипоцитов в КМП показал достоверное увеличение их количества и размера в зимний период относительно лета (таб. 1). В КМБ наблюдалось заметное увеличение размера адипоцитов в торпидном состоянии по сравнению с контрольными значениями, которое сохранялось и во время ЗЭ. При этом, несмотря на увеличение количества адипоцитов во время торпора в 1.5 раз, в период ЗЭ отмечалось их достоверное снижение (в 1.2 раза), что все равно превышало летние показатели.

Ранее, при подсчете количества ядерных клеток в S-фазе клеточного цикла в КМ плечевой кости мы обнаружили достоверное снижение их пролиферации в торпидный период, с последующим восстановлением до уровня контрольных значений после пробуждения (рис. 3а) [18]. В бедренной же кости достоверных отличий в исследуемых состояниях животных не обнаружено (рис. 3б).

При подсчете общего количества ядерных клеток в КМ (рис. 4), было выявлено что в КМБ в исследуемые периоды содержится значительно меньше клеток на грамм ткани, чем в КМП. Так летом, их меньше в 1.9 раз, в торпидный период в 1.7, а в зимнем эутермном состоянии в 2.1 раза. В свою очередь, наблюдается снижение количества ядерных клеток в самом КМБ в торпоре и в ЗЭ состоянии по сравнению с летом.

На препаратах мазков крови в летний период обнаружена обычная форма эритроцитов (дискоциты) (рис. 5а), и различий по размеру, интенсивности окраски или наличию включений нет. У сусликов в состоянии торпора (рис. 5б) в большом количестве отчетливо видны эритроциты атипичной формы – овальные, каплевидные и мишеневидные. При этом изменений в интенсивности

Таблица 2. Количество и размер адипоцитов в костном мозге обеих костей сусликов в разных состояниях

Группа	Количество адипоцитов в плече, шт	Размер адипоцитов в плече, мкм ²	Количество адипоцитов в бедре, шт	Размер адипоцитов в бедре, мкм ²
Лето	40±1.5	19584±1610	68±1.9	16090±787
Торпор	45±1.6*	26005±2558*	100±1.2*	23447±1962*
Зимняя эутермия	72±1.4*#	34700±2822#	82±1.4*#	34841±2728*#

Подсчет осуществляли в поле зрения (400×400 мкм, $n = 9$ для каждой группы) с помощью некоммерческого программного обеспечения ImageJ. Значения представлены как $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * – $p < 0.05$ между экспериментальными группами по сравнению с контрольной группой “лето”, # – $p < 0.05$ между группами “торпор” и “зимняя эутермия”.

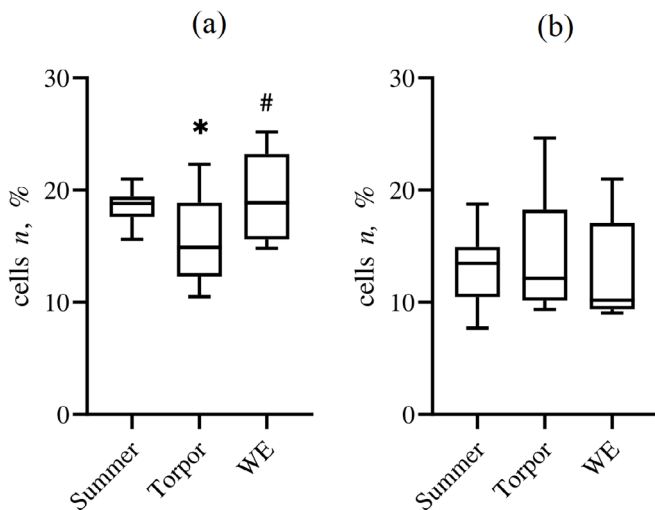


Рис. 3. Процентное содержание ядерных клеток в S-фазе клеточного цикла в костном мозге (а) — плечевой кости по [1] и (б) — в бедренной кости сусликов в активном летнем, торпидном и зимнем эутермном состоянии ($n = 11$ лето, $n = 12$ торпор, $n = 11$ ЗЭ). * — $p < 0.05$ между экспериментальными группами по сравнению с контрольной группой “лето”, # — $p < 0.05$ между группами “торпор” и “зимняя эутермия”.

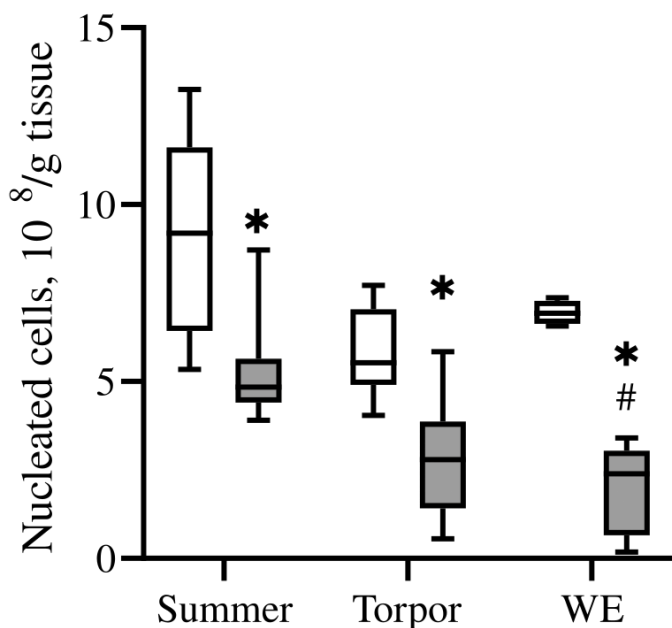


Рис. 4. Изменения количества ядерных клеток $10^8/\text{г}$ ткани костного мозга длиннохвостых сусликов в плечевой (светлые столбцы) и бедренной кости (темные столбцы) в активном летнем, торпидном и зимнем эутермном (WE) состоянии ($n = 7$ для каждого состояния) * — статистически значимые различия между группами в одном и том же состоянии ($p < 0.05$). # — статистически значимые различия внутри группы от одного источника (бедренная кость) относительно лета ($p < 0.05$).

окраски и наличию включений также не выявлено. В зимний эутермный период (рис.5с) количество эритроцитов атипичной формы существенно снижается, но не исчезают полностью.

При сравнении содержания ретикулоцитов в крови (рис. 6), обнаружено их достоверное увеличение относительно летних показателей как в торпидном состоянии (в 2.1 раза), так и в период зимней эутермии (в 2 раза).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее на сусликах, сурках, летучих мышах и медведях показано, что у гетеротермных животных во время спячки не наблюдается тканевая гипоксия, не смотря на значительное снижение скорости кровотока [14–17]. Авторы объясняют это подавлением метаболизма, повышенной антиоксидантной активностью, снижением активности ионных каналов и высоким уровнем кетоновых тел. Полученные нами результаты также демонстрируют высокий уровень содержания кислорода в крови у сусликов в торпидном состоянии, сопровождающийся ростом гематокрита и снижением уровня лактата (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии кислородного голодания. В наших экспериментах показано, что в состоянии зимней эутермии (ЗЭ) происходит увеличение лактата что, может быть обусловлено диффузией кислорода из кровотока в ткани, где во время торпора активизируется компенсаторный механизм, за счет повышения митохондриальной активности и снижения потребности организма в АТФ [20–22].

На фоне увеличения содержания кислорода в период торпора также повышается гематокрит в крови (табл. 1) как и у торпидных летучих мышей (*Myotis lucifugus*), и золотистых сусликов (*Callospermophilus lateralis*) [23, 24]. Такой рост отношения объема эритроцитов к объему крови, скорее всего, связан с тем, что в этот период увеличивается вязкость крови за счет уменьшения объема плазмы [25]. При этом последующее снижение гематокрита в состоянии зимней эутермии может указывать на то, что при выходе из спячки происходит обратный процесс — снижается вязкость крови и увеличивается объем плазмы, за счет выхода жидкости из тканей в кровяное русло [26].

Кажется очевидным, что поддержание высокого уровня кислорода в крови может быть связано с поддержанием относительно постоянного уровня эритроцитов в крови [1, 3, 5]. Однако тогда возникает вопрос, как при подавлении уровня пролиферации ядерных клеток не происходит снижения количества эритроцитов (рис. 3а). Мы предположили, что это объясняется увеличением количества эритроидных островков (ЭО), продуцирующих эритроциты в костном мозге. С этой целью был исследован не только костный мозг из плечевой кости, в котором ранее нами было выявлено снижение уровня пролиферации [18], но и костный мозг из бедрен-

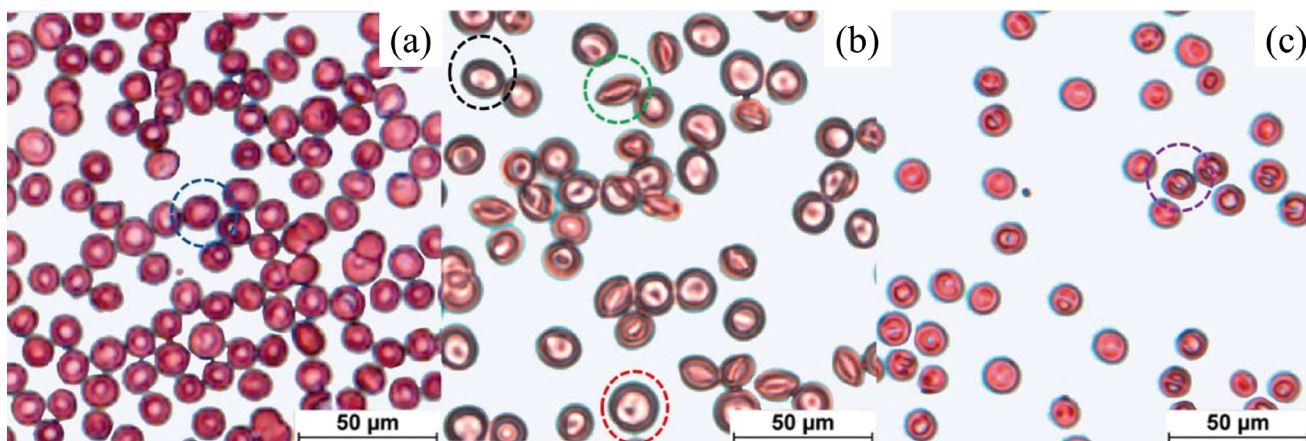


Рис. 5. Микрофотографии препаратов мазков крови длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus*. Окраска Дифф-Квик. а – летние животные ($n = 6$), б – животные в состоянии торпора ($n = 7$), с – зимние эутермные животные ($n = 5$). Обозначение – нормальные эритроциты (синий пунктир), серповидные эритроциты (зеленый пунктир), овальные эритроциты (черный пунктир), макроциты (красный пунктир), мишеневидные эритроциты (фиолетовый пунктир).

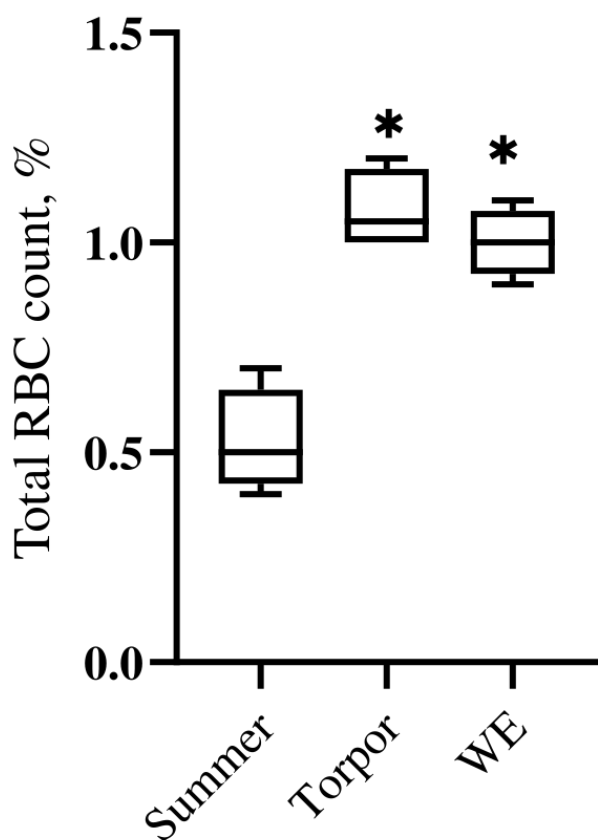


Рис. 6. Сезонные изменения количества ретикулоцитов относительно общего содержания эритроцитов в периферической крови сусликов *Urocitellus undulatus* ($n=6$ для каждого исследуемого состояния) * – статистически значимые различия между группами ($p < 0.05$).

ной кости, которая является часто используемым источником КМ у млекопитающих в основном из-за большого объема ткани [27]. Отличий между

торпидным и зимнем эутермном состоянием по результатам гистологического анализа не обнаружено (не представлено). При исследовании гистологических препаратов КМП (рис. 1а, с) достоверного роста ЭО в зимний период нами обнаружено не было (рис. 2), в то же время в КМБ напротив было выявлено значимое увеличение количества ЭО (рис. 2). Возникает закономерный вопрос, в чем физиологический смысл таких различий?

Гистологический анализ КМ показал, что в торпидный период и в состоянии зимней эутермии в КМБ сусликов также, как и в КМП происходит увеличение количества и размера адипоцитов, но в КМБ они собираются группами, частично замещая миелоидную ткань (рис. 1 б, 1с, 1д; рис. 2). И если в КМП в осенний период только начинается замещение миелоидной ткани на жировую, то в структуре КМБ жировая ткань в это время уже преобладает. Возможно, потребность в накоплении адипоцитов, особенно в КМБ происходит в связи с накоплением энергетических ресурсов, необходимых как для переживания торпидного периода так и периодического пробуждения [27], поскольку в области задних конечностей отсутствует важный энергетический источник – бурый жир, обеспечивающий несократительный термогенез во время таких пробуждений. По-видимому, из-за увеличения объема жировой ткани в целом, количество ядерных клеток в КМБ намного меньше по сравнению с КМП (рис. 4).

Возникает вопрос, как эритроциты обеспечивают организм необходимым уровнем кислорода в условиях сужающихся во время спячки сосудов [6]. Эритроциты живут месяцами и являются достаточно стабильными [28]. К тому же они лишены способности к синтезу белка *de novo* (из-за отсутствия ядер и органелл) [5], а потому любые изменения

нормоцитов имеют особое значение. Спурриер и Доу [29] предположили, что у тринадцатиполосного суслика (*Citellus tridecemlineatus*) в период спячки эритроциты, продуцируемые костным мозгом, претерпевают процесс так называемого “folded-over” или условного “сворачивания”, для проникновения через суженные сосуды, чтобы в торпоре обеспечить ткани кислородом. Затем они “разворачиваются” и продолжают циркулировать в кровотоке [29]. Авторы, проводившие исследование на малых сусликах (*Spermophilus pygmaeus*), считают, что происходит частичная замена нормоцитов на эритроциты меньших размеров, в частности эхиноциты, что может свидетельствовать также об ускорении гемолиза эритроцитов, например, весной [6]. В наших экспериментах в мазках крови торпидного суслика мы обнаружили заметное увеличение атипичных форм эритроцитов, а именно частичную замену нормоцитов на овалоциты, макроциты и мишеневидные формы эритроцитов (рис. 5). При этом наблюдается увеличение ширины распределения эритроцитов и концентрации гемоглобина в клетке при снижении объема эритроцита в торпоре, тогда как в состоянии зимней активности, всего спустя несколько часов, все эритроцитарные показатели, за исключением ширины распределения эритроцитов возвращаются к летним параметрам [3]. В циркулирующей крови в период торпора только часть эритроцитов находится в измененной форме, а оставшиеся клетки остаются в форме нормоцитов. При анализе препаратов мазков во время ЗЭ (рис. 5с) можно увидеть, что эритроциты атипичной формы встречаются реже, чем во время торпора. Вероятно, при повышении температуры во время пробуждения эритроциты “разворачиваются” и принимают форму нормоцита. Отсутствие изменений в количестве эритроцитов на протяжении всего периода спячки, возможно, связано с тем, что в это время образуются новые эритроциты и удаляются старые, прошедшие цикл “сворачивание-разворачивание”. так как сворачиваться они способны всего один раз [29]. Скорее всего данный процесс претерпевает не каждый эритроцит, так как уровень пролиферативной активности тогда должен был значительно возрастать, что не наблюдалось в наших экспериментах (рис. 3).

Мы обнаружили также значительное увеличение количества ретикулоцитов в крови в торпоре (рис. 6) и их уровень после пробуждения не изменялся. Так как уровень пролиферации в КМБ в период торпора (рис. 3) и гены, необходимые для производства эритроцитов, сохраняются на летнем уровне экспрессии [27], а уровень, например, синтеза лейкоцитов в костном мозге снижается [30], мы предполагаем, что во время торпора в КМ преобладает продукция именно эритроцитов, а не пред-

шественников других клеток. В зимнюю эутермию количество ретикулоцитов достоверно не снижается, поскольку необходимо постоянное активное обновление эритроцитарных клеток, а как уже сказано сворачиваться они способны всего один раз [29], а число баутов (циклов засыпаний- пробуждений) во время спячки в десятки раз больше [14].

Так как в торпоре в костном мозге бедренной кости наблюдается увеличение количества эритроидных островков, и уровень экспрессии генов, необходимых для производства эритроцитов не меняется [31], то возможно костный мозг из бедренной кости берет на себя основную роль по обновлению эритроцитарного состава в зимний период, что опять-таки объясняет высокое содержание ретикулоцитов в крови, которые, скорее всего, заменяют те эритроциты, которые прошли цикл “сворачивание- разворачивание” и, чей срок жизни, по-видимому, меньше, чем у эритроцитов, не подвергающихся морфологическим изменениям.

Таким образом, мы предполагаем, что высокий уровень содержания кислорода в торпидном состоянии обеспечивается стабильным уровнем эритроцитов, который поддерживается главным образом костным мозгом из бедренной кости за счет увеличения количества эритроидных островков в миелоидной ткани, а также повышением уровня ретикулоцитов в крови и способностью эритроцитов складываться, чтобы переносить кислород в условиях суженных сосудов, брадикардии, гипотонии и замедленной скорости кровотока.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с руководящими принципами, установленными Директивой Европейского Совета 2010/63/EU и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12 августа 1977 г. N 755 "О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных". На проведение экспериментов с сусликами получено разрешение комиссии по биоэтике Института биофизики клетки РАН Пущинского научного центра биологических исследований Российской академии наук, протокол 4/062019 от 13.06.2019 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме Государственного задания “Механизмы природного и искусственного гипобиоза”, № 075-00609-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.М.З., Л.К.И.), сбор данных (Л.К.И., Г.Е.А.), обработка данных (Л.К.И., Т.П.О., Г.Е.А., В.Н.А), написание и редактирование манускрипта (Л.К.И., Н.М.З.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования Сектора Оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (<https://www.pbcra.ru/services/tskp/>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giroud S, Yamaguchi Y, Terrien J, Henning RH (2024) Editorial: Torpor and hibernation: metabolic and physiological paradigms. *Front Physiol* 15:1441872. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1441872>
2. Kuznetsova EV, Feoktistova NY, Naidenko SV, Surov AV, Tikhonova NB, Kozlovskii JE (2016) Seasonal changes in blood cells and biochemical parameters in the Mongolian hamster (*Allocricetulus curtatus*). *Biol Bull Russ Acad Sci* 43(4):344–349. <https://doi.org/10.1134/S1062359016040087>
3. Teplova PO, Komelina NP, Yegorov AY, Lizorkina KI, Zakharova NM (2024) Adaptive Blood Cell Variability in the Annual Life Cycle of the Ground Squirrel *Urocyon undulatus*. *J Evol Biochem Phys* 60(2):443–452. <https://doi.org/10.1134/S0022093024020017>
4. Tøien Ø, Drew KL, Chao ML, Rice ME (2001) Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(2):R572–83. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R572>
5. Gehrke S, Rice S, Stefanoni D, Wilkerson RB, Nemkov T, Reisz JA, Hansen KC, Lucas A, Cabrales P, Drew K, D'Alessandro A (2019) Red Blood Cell Metabolic Responses to Torpor and Arousal in the Hibernator Arctic Ground Squirrel. *J Proteome Res* 18(4):1827–1841. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00018>
6. Katiukhin LN, Chalabov SI, Bekshokov KS, Pokhmelnova MS, Klichkhanov NK, Nikitina ER (2023) Seasonal changes in blood rheology in little ground squirrels. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol* 339(5):474–486. <https://doi.org/10.1002/jez.2693>
7. Klichkhanov NK, Nikitina ER, Shihamirova ZM, Astaeva MD, Chalabov SI, Krivchenko AI (2021) Erythrocytes of Little Ground Squirrels Undergo Reversible Oxidative Stress During Arousal From Hibernation. *Front Physiol* 12:730657. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730657>
8. Lomako VV, Shilo AV, Kovalenko IF, Babichuk GA (2015) Erythrocytes of hetero- and homoiothermal animals in natural and artificial hypothermia. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 51(1):52–59
9. Repina SV, Repin NV (2008) Peculiarities of RBCs resistance to acid hemolysis in hibernating mammals. *Bioelectrochemistry* 73(2):106–109. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.009>
10. Dzierzak E, Philipsen S (2013) Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(4):a011601. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
11. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L, Fens MHAM, Schiffelers RM, Bartels M, van Wijk R (2019) Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Front Physiol* 10:945. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
12. 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>
13. Viallat A, Abkarian M (2014) Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *Int J Lab Hematol* 36(3):237–243. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12233>
14. Drew KL, Harris MB, LaManna JC, Smith MA, Zhu XW, Ma YL (2004) Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *J Exp Biol* 207(Pt 18):3155–3162. <https://doi.org/10.1242/jeb.01114>
15. Ma YL, Zhu X, Rivera PM, Tøien Ø, Barnes BM, LaManna JC, Smith MA, Drew KL (2005) Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(5):R1297–306. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00260.2005>
16. Ramirez J-M, Folkow LP, Blix AS (2007) Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu Rev Physiol* 69:113–143. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.163111>
17. Uzenbaeva LB, Belkin VV, Ilyukha VA, Kizhina AG, Yakimova AE (2015) Profiles and morphology of peripheral blood cells in three bat species of Karelia during hibernation. *J Evol Biochem Phys* 51(4):342–348. <https://doi.org/10.1134/S0022093015040109>
18. Aksyonova GE, Logvinovich OS, Afanasyev VN, Lizorkina KI (2023) Cell cycle parameters and ornithine decarboxylase activity in the red bone marrow of hibernating ground squirrels *Urocyon undulatus*. *Biofizika* 68(5):964–972. <https://doi.org/10.31857/S0006302923050174>
19. Zakharova NM, Tarahovsky YS, Khrenov MO (2024) A Comparative Study of the Temperature Coefficient Q10 in Hibernating Ground Squirrels *Urocyon undulatus* and Cooled Rats of Different Ages. *J Evol Biochem Phys* 60 1437–1446. <https://doi.org/10.1134/S0022093024040148>
20. Heim AB, Chung D, Florant GL, Chicco AJ (2017) Tissue-specific seasonal changes in mitochondrial function of a mammalian hibernator. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 313(2):R180–R190. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00427.2016>
21. Janotka M, Ostadal P (2021) Biochemical markers for clinical monitoring of tissue perfusion. *Mol Cell Biochem* 476(3):1313–1326. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04019-8>
22. Бурых ЭА, Сороко СИ (2014) Компенсаторная роль системы кровообращения при острой гипоксиче-

- ской гипоксии у человека. Экол чел 7:30–36. [Burykh EA, Soroko SI (2014) Compensatory role of the circulatory system in acute hypoxic hypoxia in humans. Hum Ecol 7: 30– 36 (In Russ)].
23. Maginniss LA, Milsom WK (1994) Effects of hibernation on blood oxygen transport in the golden-mantled ground squirrel. *Respir Physiol* 95(2):195–208.
[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0034-5687(94)90116-3)
 24. Warnecke L, Turner JM, Bollinger TK, Misra V, Cryan PM, Blehert DS, Wibbelt G, Willis CKR (2013) Pathophysiology of white-nose syndrome in bats: a mechanistic model linking wing damage to mortality. *Biol Lett* 9(4):20130177.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0177>
 25. Vrij EL de, Henning RH (2015) How hibernation and hypothermia help to improve anticoagulant control. *Temperature (Austin)* 2(1):44–46.
<https://doi.org/10.4161/23328940.2014.967595>
 26. Hu H-X, Du F-Y, Fu W-W, Jiang S-F, Cao J, Xu S-H, Wang H-P, Chang H, Goswami N, Gao Y-F (2017) A dramatic blood plasticity in hibernating and 14-day hindlimb unloading Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*). *J Comp Physiol B* 187(5-6):869–879.
<https://doi.org/10.1007/s00360-017-1092-7>
 27. Ануфриев АИ (2008) Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии. Новосибирск: Из-во СО РАН. 158 с. [Anufriev AI (2008) Mechanisms of Hibernation of Small Mammals of Yakutia (Sib. Otd. Ross. Akad. Nauk, Novosibirsk. (In Russ)].
 28. Corrons JLV, Casafont LB, Frasnado EF (2021) Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Ann Hematol* 100(10):2425–2433.
<https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>.
 29. Spurrier WA, Dawe AR (1973) Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 44(2):267–282.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(73\)90479-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(73)90479-9)
 30. Yasuma Y, McCarron RM, Spatz M, Hallenbeck JM (1997) Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Am J Physiol* 273(6):R1861–9.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1861>
 31. Cooper ST, Sell SS, Fahrenkrog M, Wilkinson K, Howard DR, Bergen H, Cruz E, Cash SE, Andrews MT, Hampton M (2016) Effects of hibernation on bone marrow transcriptome in thirteen-lined ground squirrels. *Physiol Genomics* 48(7):513–525.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00120.2015>

FEATURES OF ERYTHROPOIESIS OF HIBERNATING GROUND SQUIRRELS *UROCITELLUS UNDULATUS*

K. I. Lizorkina*, G. E. Aksenova, V. N. Afanasyev, P. O. Teplova, and N. M. Zakharova

Institute of Cell Biophysics RAS - separate subdivision of Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Centre 'Pushchino Scientific Centre for Biological Research RAS', Pushchino, Moscow Region, Russia

**e-mail: lizorkina_kseniia@mail.ru*

The morphofunctional features of the bone marrow of the femur and humerus in long-tailed ground squirrels were studied in summer, fall, during torpor and during periods of short-term awakenings in winter (winter euthermia). Histological analysis showed an increase in the number and size of adipocytes in the bone marrow in animals in the torpor state, with partial replacement of myeloid tissue by adipose tissue. Despite the greater volume of bone marrow in the femur, significantly fewer nuclear cells were found in the bone marrow than in the humerus, but significantly more erythroid islets were found, especially during hibernation. In torpid ground squirrels there is a replacement of disc-shaped erythrocytes in the blood by atypical forms of erythrocytes (oval, macrocytes, and michenoid), the number of which decreases significantly during the winter euthermal period. The level of reticulocyte content increases in the hibernation period twofold compared to summer. The results obtained are discussed in the context of maintaining high blood oxygen levels during torpor and adaptation of erythropoiesis to conditions of prolonged hypothermia.

Keywords: long-tailed ground squirrel, hibernation, hypothermia, bone marrow, erythropoiesis, blood oxygen saturation

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КУПФЕРА В ПЕЧЕНИ КРЫС SHR И WISTAR

© 2024 г. И. А. Никитина*, В. А. Разенкова, Д. Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**e-mail: inga06819@gmail.com*

Поступила в редакцию 10.09.2024 г.

После доработки 29.10.2024 г.

Принята к публикации 03.11.2024 г.

В исследовании были проанализированы структурные особенности резидентных макрофагов печени на фоне стойкой артериальной гипертензии, в сравнении с нормотензивным контролем. Для выявления резидентных макрофагов на образцах печени девятимесячных самцов крыс SHR и Wistar ($n = 14$) применяли иммуногистохимическую реакцию против белка Iba-1. Морфометрические параметры и характер пространственного распределения клеток Купфера оценивали с помощью программ математической обработки и анализа изображений ImageJ и GIMP. Показано, что клетки Купфера в образцах печени крыс линии SHR имеют преимущественно слабоотростчатую либо эллипсоидную форму, и не имеют определенной корреляции с расположением в печеночном ацинусе, в отличие от макрофагов группы Wistar. Статистически значимые различия обнаружены в характере распределения клеток Купфера: в группе SHR клетки в печеночном ацинусе распределены более равномерно по сравнению с клетками группы Wistar, наиболее выраженная плотность распределения которых фиксировалась в интермедиальной зоне ацинуса. Обнаруженные структурно-функциональные особенности резидентных макрофагов печени крыс SHR могут быть обусловлены функциональными нарушениями в печени на фоне стойкой артериальной гипертензии.

Ключевые слова: печень; макрофаги; клетки Купфера; Iba-1; артериальная гипертензия; портальная гипертензия

DOI: 10.31857/S0044452924070039, **EDN:** KKDGIO

ВВЕДЕНИЕ

Клетки Купфера — это резидентные макрофаги печени, располагающиеся между гепатоцитами и тесно контактирующие с эндотелиальными клетками синусоидных капилляров печени. Данные клетки входят в состав мононуклеарной фагоцитарной системы и составляют самый большой пул тканевых макрофагов в организме [1].

Резидентные макрофаги печени выполняют ряд функций, направленных на поддержание гомеостаза, таких как: фагоцитоз чужеродных частиц, поступающих из желудочно-кишечного тракта по системе портального кровообращения; регуляция иммунного ответа; участие в воспалительных и противовоспалительных реакциях организма; ремоделирование внеклеточного матрикса печени [2, 3]. В настоящее время мировое научное сообщество активно изучает влияние резидентных макрофагов на функции печени при различных патологиях человека и в условиях экспериментального моделирования патологий у животных. Так, становится известно, что клетки Купфера человека, благодаря регуляции активности Т-клеток, способствуют

антиметастатическим процессам в канцерогенезе [4, 5], а у крыс за счет контролируемой гибели эффекторных Т-клеток могут поддерживать толерантность к аллотрансплантам печени [6]. Кроме того, установлена роль клеток Купфера в развитии воспаления и фиброза печени при ВИЧ-инфекции у человека [7]. Инфицирование резидентных макрофагов печени ВИЧ-1 нарушает противовоспалительную регуляцию, что может приводить к воспалению тканей печени и фиброзу. Имеется информация об участии резидентных макрофагов печени в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени: при развитии неалкогольного стеатогепатита наблюдается дисфункция “самообновления” данных клеток [8, 9].

Тем не менее несмотря на обширные данные о физиологических характеристиках клеток Купфера, их функциональные и фенотипические особенности при артериальной гипертензии остаются недостаточно изученными.

Согласно оценкам, артериальная гипертензия наблюдается у 10–20% взрослого населения и является причиной 5.8% всех случаев смертности в мире

[10]. Патофизиологический механизм заболевания обусловлен дисфункцией множества физиологических систем организма [11] и включает активацию симпатической нервной системы, дисфункцию ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, активацию бета-адренорецепторов и усиление оксидативного стресса в тканях [10]. Результатом указанных изменений является развитие ряда патологических состояний: окклюзивный инфаркт миокарда, цереброваскулярные инсульты, аневризма аорты, хроническая почечная недостаточность, портальная и перипортальная гипертензия, жировая дистрофия и цирроз печени. В настоящее время в качестве экспериментальной модели для изучения влияния артериальной гипертензии на функционирование органов и систем организма активно используются спонтанно-гипертензивные крысы линии SHR. Генетические особенности данной линии обуславливают развитие системных гипертензивных изменений уже в возрасте 5–6 недель, а к половозрелому возрасту (8–12 неделям) патология приобретает стойкий характер [12].

Принимая во внимание необходимость получения дополнительных данных о возможных изменениях в клетках Купфера в условиях повышения артериального давления, а также удобство и эффективность изучения артериальной гипертензии на животных моделях линии SHR, цель настоящего исследования состояла в определении изменений популяции клеток Купфера в печени крыс линии SHR по сравнению с печенью нормотензивных крыс породы Wistar.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на образцах печени половозрелых (9 месяцев) самцов крыс породы Wistar ($n = 7$) с систолическим давлением менее 200 мм рт. ст. и крыс линии SHR ($n = 7$) с систолическим давлением, в среднем равным или превышающим 200 мм ртутного столба. Крысы были получены из питомников лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область, Россия) и “Пущино” (Московская область, Россия), содержались в виварии при комнатной температуре, в стандартных условиях, с свободным доступом к пище и воде. При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и “Правила надлежащей лабораторной практики” (приказ №199н от 01.04.2016 г. Минздрава России). Для исследования брали левую долю печени. Образцы печени фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [13] в течение 18–24 часов при комнатной температуре. Фиксирован-

ный материал заливали в парафин по стандартной методике. С парафиновых блоков на ротационном микротоме Microm HM 325 (ThermoScientific, США) изготавливали срезы толщиной 5 мкм, которые далее монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием (HistoBond®+M adhesive microscope slides, Marienfeld, Германия). Затем были проведены стандартные процедуры депарафинирования и регидратации. Для выявления резидентных макрофагов печени применяли моноклональные кроличьи антитела к Iba-1 (клон JM36-62, ET1705-78, HuaBio, Китай). В качестве вторичного реагента для первичных кроличьих антител использовали набор UltraVision Quanto HRP DAB Detection System (Thermo Fisher Scientific, США). Для данного варианта антител был проведен отрицательный контроль с использованием соответствующего набора вторичных реагентов и системы проявления HRP. Для постановки негативного контроля вместо раствора первичных антител срезы обрабатывали фосфатным буферным солевым раствором. С целью выявления соединительной ткани срезы обрабатывали раствором 2% водного анилинового синего (Unisource Chemicals Pvt. Ltd., Индия). Для оценки морфологии гепатоцитов использовали стандартную гистологическую методику обработки препаратов гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). После дегидратации в изопропанол и просветления в орто-ксилоле полученные препараты заключали в перманентную среду Richard-Allan Scientific Cytoseal 60 (США) и анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия). Фотографирование гистологических препаратов проводили с использованием фотокамеры Zeiss AxioCam 105 color (объективы Plan 10x/0.22; 40x/0.65; 100x/1.25) и программы ZEN 3 (ZEISS, Германия).

Морфометрический анализ полученных изображений проводили с помощью программы ImageJ2 в расширении FIJI [14]. Для каждого случая выбирали по 4 поля зрения. Перед анализом изображения бинаризовали с использованием фиксированного порога. Оценивали общую площадь, число и средний размер Iba-1-иммунопозитивных структур в рамке 331.39×248.54 мкм на увеличении ($\times 40$). При подсчете площади, числа и размера выявленных Iba-1-позитивных структур значения усредняли по 4 полям зрения для каждого случая. Также оценивали равномерность распределения Iba-1-иммунопозитивных структур на изображениях (при увеличении микроскопа $\times 10$) с использованием индекса Шеннона (P). Для его расчета каждое изображение разделяли на 24 равных участка с применением морфометрической сетки, нанесенной на изображения с использованием графического редактора GIMP [15]. Также оценивали

равномерность распределения Iba-1-иммунопозитивных структур на изображениях (при увеличении микроскопа $\times 10$) с помощью плагина SSIDC Cluster Indicator [16], основанного на алгоритме кластеризации DBSCAN. Минимальное расстояние между объектами для создания нового кластера составило 50 пикселей, а минимальная плотность кластеров — 8 объектов. Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные представляли в виде P-value (p -значение), медианы (Me) и интерквартильного размаха (IQR). Проверку на соответствие распределения нормальному закону проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка, для оценки различий применяли t -критерий Стьюдента для независимых выборок. Распределение считали соответствующим нормальному при $p > 0.05$. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования препаратов печени крыс линии SHR и Wistar было обнаружено множество Iba-1-иммунопозитивных структур, расположен-

ных вблизи и в составе стенок синусоидных капилляров долек печени, которые идентифицировали как клетки Купфера и их фрагменты, попавшие в плоскость среза. Иммуногистохимическая реакция на маркер Iba-1 в обеих группах была интенсивной и высокоселективной, неспецифический сигнал в результате реакции отсутствовал. Клетки Купфера в препаратах печени крыс Wistar обладают амебоидной формой и имеют по 1–4 толстых цитоплазматических отростка. Встречаются также одиночные безотростчатые клетки овальной формы (рис. 1). Iba-1 иммунопозитивные клетки располагаются повсеместно в срезе печени, формируя скопления повышенной плотности главным образом в интермедиальных зонах печеночного ацинуса (см. рис. 1). У крыс линии SHR клетки имеют преимущественно либо слабоотростчатую (от 1 до 3 коротких цитоплазматических отростка), либо эллипсоидную форму. Резидентные макрофаги печени, обладающие выраженной амебоидной формой, встречаются на препаратах реже. При этом, Iba-1-иммунопозитивные клетки печени у крыс SHR не формируют отчетливых скоплений, а располагаются преимущественно равномерно в поле зрения (рис. 1a).

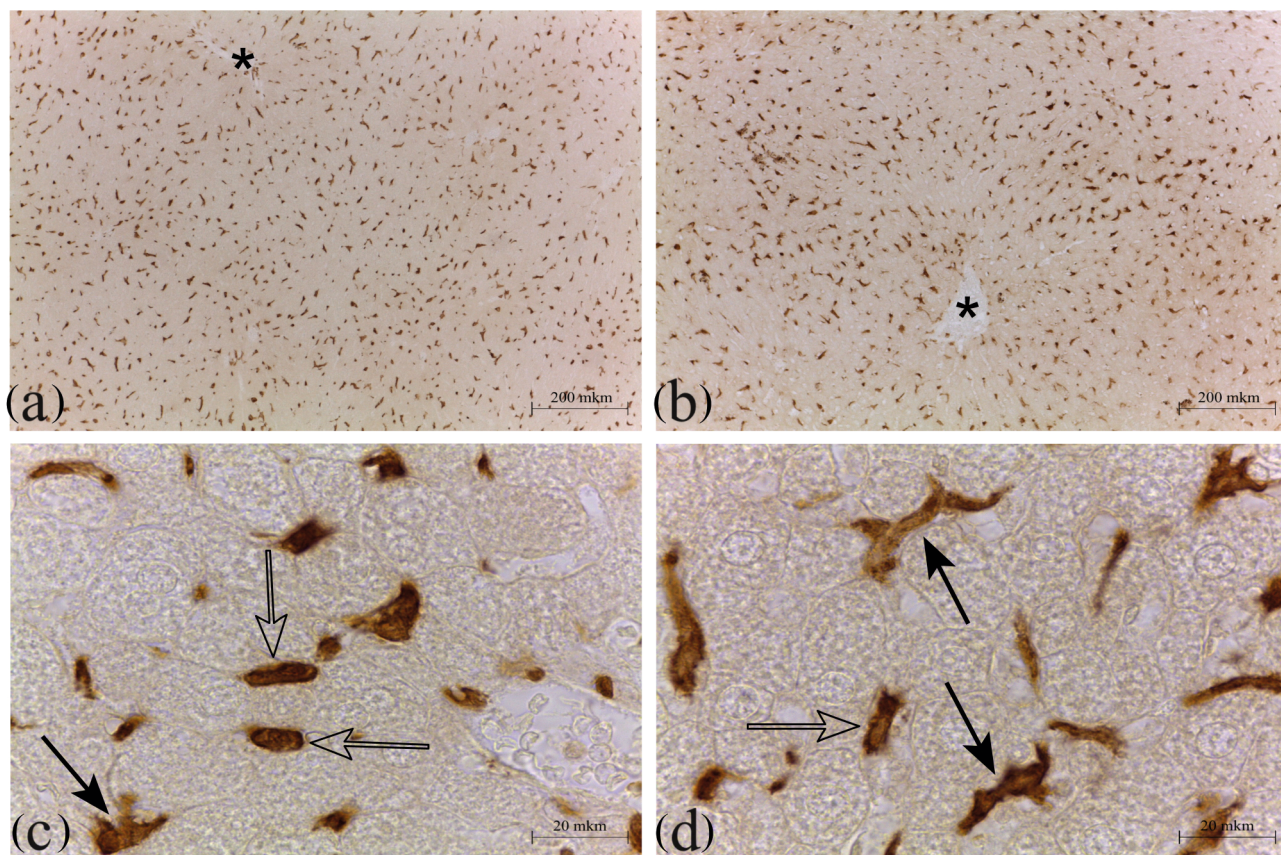


Рис. 1. Iba-1-иммунопозитивные структуры в препаратах печени: (a, c) — в печени крысы линии SHR, увеличение микроскопа $\times 10$ (a) и $\times 100$ (c); (b, d) — в печени крысы породы Wistar, увеличение микроскопа $\times 10$ (b) и $\times 100$ (d). Звездочка — центральная вена; закрашенная стрелка — клетки Купфера с выраженными цитоплазматическими отростками; прозрачная стрелка — клетки Купфера эллипсоидной формы. Объективы Plan 10x/0.22 (a; b); Plan 100x/1.25 (c; d).

Гистологическое исследование препаратов печени крыс SHR и Wistar, окрашенных анилиновым синим, а также гематоксилином и эозином (рис. 2), не выявило патологических изменений и морфологических различий в структуре соединительной ткани обеих групп. Небольшое количество гепатоцитов с липидными вакуолями в цитоплазме указывает на отсутствие жировой дистрофии печени в группах SHR и Wistar.

Морфометрический сравнительный анализ показал, что клетки Купфера спонтанно гипертензивных крыс имеют несколько меньший размер по сравнению с нормотензивными крысами Wistar, но их число выше (рис. 3b-c). Среднее число клеток и их фрагментов, выявляемых на одном поле зрения для группы SHR, составило 93.82 ± 1.77 ; для Wistar — 89.39 ± 3.47 ($p = 0.32$); средний размер клеток и их фрагментов на одном поле зрения для группы SHR было равно 50.56 ± 2.8 мкм², для группы Wistar —

54.24 ± 3.01 мкм² ($p = 0.19$). Средние площади выявленных Iba-1 позитивных структур для групп SHR и Wistar составили для SHR: 4725 ± 321 мкм²; для Wistar: 4844 ± 323 мкм² ($p = 0.81$). В процентном соотношении Iba-1 позитивные структуры заняли 5.7 % от общей площади поля зрения у крыс линии SHR и 5.9 % у крыс линии Wistar (рис. 3a).

Также была выполнена оценка равномерности распределения иммунопозитивных структур на изображениях с помощью информационного индекса Шеннона и алгоритма DBSCAN. Результаты оценки равномерности по Шеннону показали, что в группе SHR распределение иммунопозитивных структур было значительно более равномерным, в то время как в группе Wistar наблюдалась кластеризация (рис. 4, $p = 0.03$). Результаты оценки равномерности распределения клеточных структур с помощью алгоритма DBSCAN подтверждали полученные результаты ($p < 0.01$).

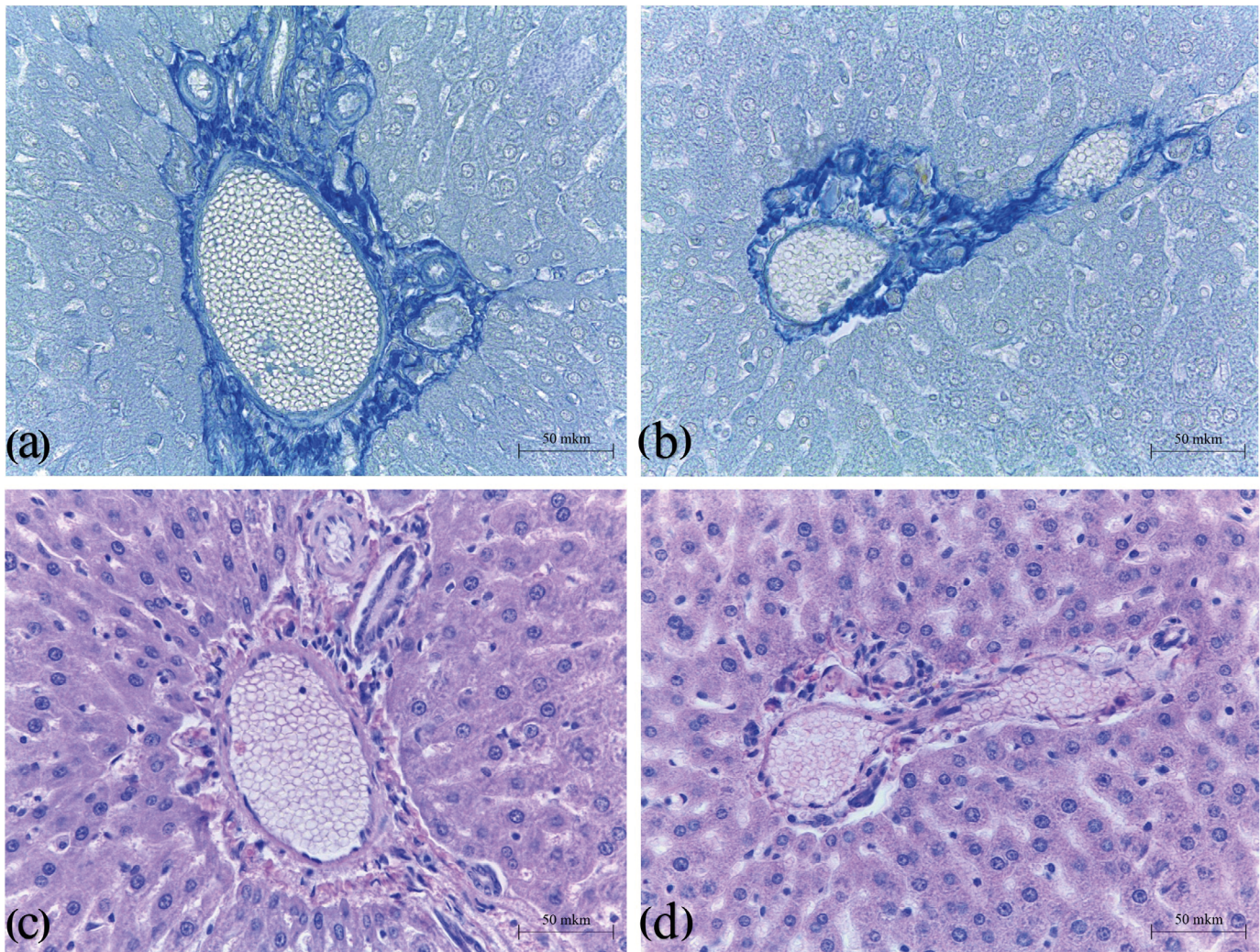


Рис. 2. Структура печеночных триад в препарате печени: (a, c) — в печени крысы линии SHR; (b; d) — в печени крысы породы Wistar. Гистологическое окрашивание препаратов анилиновым синим (a; b), гематоксилином и эозином (c; d). Объектив Plan 40x/0.65.

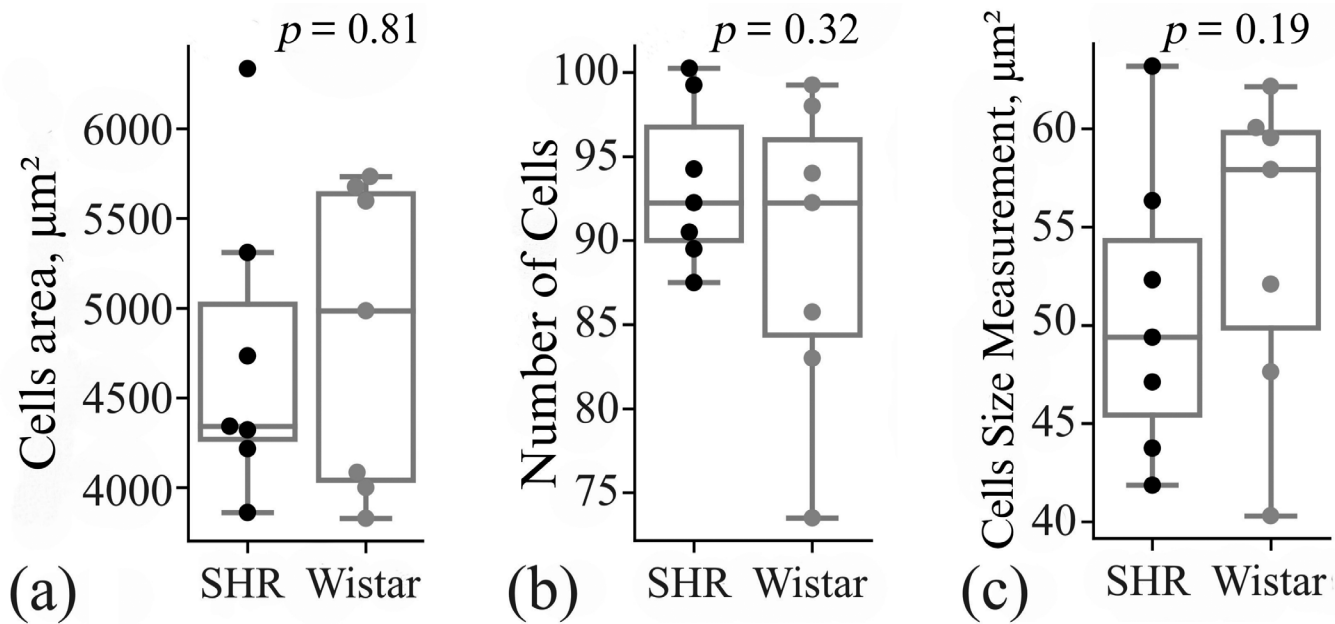


Рис. 3. Результат статистического сравнения Iba-1-иммунопозитивных структур двух групп (SHR $n = 7$; Wistar $n = 7$): (a) — общая площадь Iba-1-иммунопозитивных клеток; (b) — число выявленных структур в одном поле зрения; (c) — размер клеток Купфера и их фрагментов. Линия внутри бокс-плота отображает медиану (Me) распределения иммунопозитивных структур.

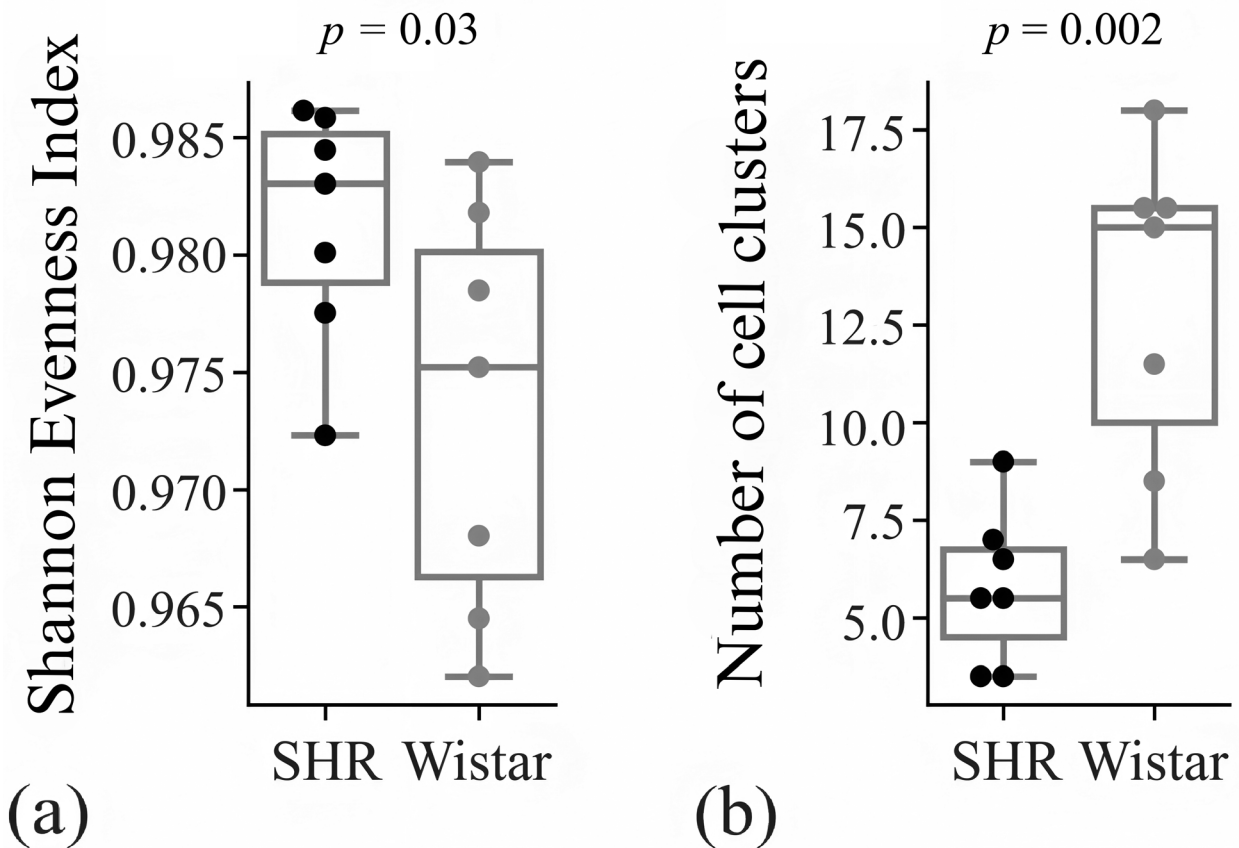


Рис. 4. Оценка равномерности распределения иммунопозитивных структур на изображениях: (a) — оценка равномерности распределения структур с помощью индекса Шеннона (P). Относительно более низкие значения индекса говорят о наличии кластеризации, высокие — о равномерности распределения структур; (b) — Число кластеризованных структур на изображениях. Алгоритм DBSCAN. Линия внутри бокс-плота отображает медиану (Me) распределения иммунопозитивных структур.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Морфологические характеристики и характер распределения (включая взаимное расположение) клеток Купфера в ткани печени обладают клиническим значением и служат биомаркерами патологических состояний [8, 17].

Одним из наиболее распространенных методов выявления резидентных макрофагов печени является иммуногистохимическая реакция к маркеру макрофагальных антигенов — CD68. Однако данный белок является ассоциированным с мембранами лизосом, что ограничивает его применимость, поскольку реакция на CD68 не предоставляет возможности исследователю точно оценить контуры клеток. Ранее нами был предложен метод иммуногистохимического выявления клеток Купфера с применением микроглиального кальций-связывающего белка Iba-1 [18], одними из основных преимуществ которого является выявление активированных макрофагов вне зависимости от их популяции и субпопуляции, а также равномерность распределения в цитоплазме клетки, что позволяет выявлять и оценивать морфологические характеристики макрофагов в различных тканях и органах [19]. Примененная методика иммуногистохимического выявления клеток Купфера [20] показала положительные результаты реакции на Iba-1, а также удовлетворительную сохранность тканей благодаря использованию в качестве фиксатора цинк-этанол-формальдегида [13] и исключению этапа теплового демаскирования в процессе постановки реакции. Результаты иммуногистохимической реакции на Iba-1 в препаратах печени обеих исследуемых групп позволили провести дальнейшее морфометрическое исследование клеток Купфера.

Морфологический анализ исследуемых случаев показал, что у крыс линии SHR клетки Купфера и их фрагменты имеют преимущественно малоотросчатые либо эллипсоидные формы, независимо от их зонального расположения в печеночном ацинусе. При визуальной оценке было выявлено отчетливое равномерное распределение клеток в поле зрения микроскопа. Альтернативная морфологическая картина наблюдается в группе Wistar: в перипортальных зонах печеночного ацинуса клетки имеют преимущественно амебоидную форму с выраженными цитоплазматическими отростками, тогда как в центральных областях клетки главным образом сохраняют эллипсоидную форму. При этом, визуально наблюдается существенное различие в плотности расположения структур в различных зонах печеночного ацинуса.

Проведение количественного анализа показало, что у крыс линии SHR Iba-1-иммуннопозитивные структуры имеют несколько меньшие размеры и большую численность по сравнению с клетками

в группе Wistar. Однако эти различия между двумя группами не достигают статистически значимой разницы.

Дальнейшее количественное исследование равномерности распределения Iba-1-позитивно окрашенных структур в исследуемых образцах печени установило, что в группе SHR распределение клеток Купфера и их фрагментов значительно более равномерное, чем в группе Wistar. В печени крыс Wistar резидентные макрофаги демонстрируют кластерное распределение структур, причем кластеры формируются преимущественно в интермедиальных (средних) зонах печеночных ацинусов. Полученные данные имеют статистически значимую разницу между группами, что установлено при использовании алгоритма кластеризации DBSCAN ($p < 0.01$), так и при оценке степени равномерности распределения клеток Купфера с помощью информационного индекса Шеннона ($p = 0.03$)

Алгоритм DBSCAN, позволяющий выявлять в поле зрения скопления иммунопозитивных объектов, является широко применяемым методом кластеризации данных [21, 22].

Зональное распределение клеток Купфера может быть обусловлено различиями метаболических зон в пределах печеночного ацинуса. В соответствии с особенностями кровообращения и формируемого ими градиента кислорода в ацинусе принято выделять три зоны [23]. Зона 1 (перипортальная, афферентная или пролиферативная) наиболее обеспечена кислородом и включает гепатоциты вблизи печеночной триады. Гепатоциты вокруг центральной вены формируют зону 3 с низким содержанием кислорода (перивенулярную). Между ними находится интермедиальная (промежуточная, средняя) зона 2, где возможен свободный обмен метаболитами между гепатоцитами и кровью, а потому происходит очистка смешанной крови от токсических веществ экзогенного и эндогенного происхождения [23; 24]. Учитывая ключевую роль клеток Купфера в иммунной регуляции печени, аккумуляция фагоцитов в интермедиальной зоне ацинуса в группе Wistar представляется естественной и физиологичной. Также литературные данные показывают, что клетки Купфера, обладающие повышенной фагоцитарной активностью [25] и способствующие поддержанию противовоспалительного статуса печени [26], отличаются более крупным размером и выраженными цитоплазматическими отростками [27, 28], что соотносится с результатами морфологического анализа в настоящем исследовании.

Отсутствие явных признаков фиброза и стеатоза печени в группе спонтанно гипертензивных крыс (SHR) в данном исследовании наряду с обнаруженными изменениями морфологии клеток Купфера и их пространственной организации позволяет пред-

положить, что наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены ранними стадиями сосудистых нарушений, ведущих к локальной гипоксии и изменению клеточного метаболизма.

Градиент кислорода крайне важен для энергетического обмена в клетках. В физиологическом состоянии этот градиент является основным фактором метаболической зонированности гепатоцитов [29]. Однако при нарушении микроциркуляции печени, например на фоне системной артериальной гипертензии, оксигенация клеток снижается, что приводит к ряду патологических изменений в печени (например, постепенное уменьшение fenestрации на поверхности эндотелиоцитов), тяжесть которых напрямую зависит от продолжительности кислородного голодания. Также по некоторым исследованиям в состоянии окислительного стресса и снижения концентрации внеклеточной АТФ отмечается снижение фагоцитарной активности макрофагов и изменение их поляризации в сторону провоспалительного фенотипа [30, 31]. Однако на данном этапе исследования остаётся неясным, как данные изменения могут отражаться непосредственно в морфологических характеристиках клеток Купфера. Вероятно, имеется корреляция между морфологией резидентных макрофагов печени и продолжительностью метаболической дисрегуляции клеток на фоне системной артериальной гипертензии.

Также отсутствие значимых различий в количественных показателях клеток Купфера и Iba-1-иммунопозитивного материала между группами может быть обусловлено возрастными особенностями исследуемых животных (9 месяцев), поскольку нарушения энергетического обмена и оксигенации клеток печени, связанные с дисфункцией гепатической сосудистой системы, имеют тенденцию к прогрессированию с течением времени.

Таким образом, проведенное исследование позволило оценить структурно-функциональные особенности резидентных макрофагов печени на фоне развития артериальной гипертензии. Преимущественно слабоотросчатая или эллипсоидная форма клеток Купфера у крыс SHR, не имеющая видимых корреляций с областью расположения в ацинусе печени и отсутствием зональной кластеризации в ткани, предположительно может объясняться нарушениями гемодинамики и энергетического обмена в ацинусе, что в свою очередь может коррелировать с отклонениями в иммунофенотипическом профиле клеток и низкой фагоцитарной активностью. Однако данные предположения требуют дальнейших исследований для лучшего понимания их причин и потенциального влияния на функции печени у различных линий крыс.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (заключение № 2/22 от 06.04.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет средств государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» № FGWG-2024-0015.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.Э.К.), сбор и обработка материалов (И.А.Н.), анализ литературы (И.А.Н., В.А.Р.), статистическая обработка (И.А.Н.), интерпретация результатов (И.А.Н., В.А.Р.), написание текста (И.А.Н., В.А.Р.), работа с иллюстрациями (И.А.Н.), редактирование рукописи (Д.Э.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett H, Troutman TD, Sakai M, Glass CK (2021) Epigenetic Regulation of Kupffer Cell Function in Health and Disease. *Front Immunol* 11: 609618. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609618>
2. Helmy KY, Katschke KJ, Gorgani NN, Kljavin NM, Elliott JM, Diehl L, Scales SJ, Ghilardi N, van Lookeren Campagne M (2006) CR1: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124(5):915–927. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.039>
3. Liu R, Scimeca M, Sun Q, Melino G, Mauriello A, Shao C, Shi Y, Piacentini M, Tisone G, Agostini M (2023) Harnessing metabolism of hepatic macrophages to aid liver regeneration. *Cell Death Dis* 14(8):1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06066-7>
4. Thomas SK, Wattenberg MM, Choi-Bose S, Uhlik M, Harrison B, Coho H, Cassella CR, Stone ML, Patel D, Markowitz K, Delman D, Chisamore M, Drees J, Bose N, Beatty GL (2023) Kupffer cells prevent pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis to the liver in mice. *Nat Commun* 14(1):6330. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41771-z>
5. Wen SW, Ager EI, Christophi C (2013) Bimodal role of Kupffer cells during colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Biology & Therapy* 14(7):606–613. <https://doi.org/10.4161/cbt.24593>
6. Chen Y, Liu Z, Liang S, Luan X, Long F, Chen J, Peng Y, Yan L, Gong J (2008) Role of Kupffer cells in the induction of tolerance of orthotopic liver transplantation in rats. *Liver Transpl* 14(6):823–836. <https://doi.org/10.1002/lt.21450>
7. Mosoian A, Zhang L, Hong F, Cunyat F, Rahman A, Bhalla R, Panchal A, Saiman Y, Fiel MI, Florman S, Roayaie S,

- Schwartz M, Branch A, Stevenson M, Bansal MB* (2017) Frontline Science: HIV infection of Kupffer cells results in an amplified proinflammatory response to LPS. *J Leukocyte Biol* 101(5):1083–1090. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0516-242R>
8. *Park S-J, Garcia Diaz J, Um E, Hahn YS* (2023) Major roles of kupffer cells and macrophages in NAFLD development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14:1150118. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1150118>
 9. *Tran S, Baba I, Poupel L, Dussaud S, Moreau M, Gélinaud A, Marcelin G, Magréau-Davy E, Ouhachi M, Lesnik P, Boissonnas A, Le Goff W, Clausen BE, Yvan-Charvet L, Sennlaub F, Huby T, Gautier EL* (2020) Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 53(3):627–640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>
 10. *Kućmierz J, Frąk W, Rysz J, Młynarska E, Franczyk B* (2021) Molecular Interactions of Arterial Hypertension in Its Target Organs. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22189669>
 11. *Touyz RM, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Neves KB, Eluwole O, Maseko MJ, Lucas-Herald A, Blaikie Z, Montezano AC, Feldman RD* (2022) Arterial Hypertension. In: *Comprehensive Pharmacology*. Elsevier, pp 469–487. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00192-4>
 12. *Sone H, Suzuki H, Takahashi A, Yamada N* (2001) Disease model: hyperinsulinemia and insulin resistance. Part A-targeted disruption of insulin signaling or glucose transport. *Trends Mol Med* 7:320–2
 13. *Grigorev IP, Korzhevskii DE* (2018) Current Technologies for Fixation of Biological Material for Immunohistochemical Analysis (Review). *Sovrem Tehnol Med* 10(2):156. <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>
 14. *Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 15. GIMP: GNU Image manipulation program. <https://www.gimp.org/>
 16. *Brocher J* (2023) biovoxxel/BioVoxxel-Toolbox: BioVoxxel Toolbox v2.6.0. biovoxxel/BioVoxxel-Toolbox. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5986129>
 17. *Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J* (2014) M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol* 96(3):382–392. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.04.003>
 18. *Nikitina IA, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskii DE* (2023) Visualisation of kupffer cells in the rat liver with poly- and monoclonal antibodies against microglial-specific protein Iba-1. *Medical Acad J* 23(1):85–94. <https://doi.org/10.17816/MAJ133649>
 19. *Zhang X, Wang L-P, Ziober A, Zhang PJ, Bagg A* (2021) Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1 (IBA1). *Am J Clin Pathol* 156(1):86–99. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa209>
 20. *Nikitina IA, Razenkova VA, Fedorova EA, Kirik OV, Korzhevskii DE* (2024) Technology of Combined Identification of Macrophages and Collagen Fibers in Liver Samples. *Sovrem Tehnol Med* 16(3):24. <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.3.03>
 21. *Kim J, Zhang C, Sperati C, Bagnasco S, Barman I* (2023) Non-Perturbative Identification and Subtyping of Amyloidosis in Human Kidney Tissue with Raman Spectroscopy and Machine Learning. *Biosensors* 13:466. <https://doi.org/10.3390/bios13040466>
 22. *Spoorthy D, Manne SR, Dhyani V, Swain S, Shahulhaameed S, Mishra S, Kaur I, Giri L, Jana S* (2019) Automatic Identification of Mixed Retinal Cells in Time-Lapse Fluorescent Microscopy Images using High-Dimensional DBSCAN. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2019:4783–4786. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2019.8857375>
 23. *Kietzmann T* (2017) Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol* 11:622–630. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>
 24. *Sasse D, Spornitz UM, Maly IP* (1992) Liver architecture. *Enzyme* 46(1–3):8–32. <https://doi.org/10.1159/000468776>
 25. *Sleyster EC, Knook DL* (1982) Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest* 47(5):484–490
 26. *Elchaninov A, Lokhonina A, Makarov A, Vishnyakova P, Kananykhina E, Nikitina M, Grinberg M, Bykov A, Char'yeva I, Bolshakova G, Fatkhudinov T* (2019) Phenotypic Polymorphism of Normal Rat Liver Kupffer Cells. *J Anat Histopathol* 8:35–39. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-3-35-39>
 27. *Zumerle S, Cali B, Munari F, Angioni R, Di Virgilio F, Molon B, Viola A* (2019) Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. *Cell Rep* 27(1):1–10.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.011>
 28. *Цыркунов ВМ, Андреев ВП, Кравчук РИ, Прокопчик НИ* (2017) Клиническая Цитология печени: клетки Купффера. *Журн Гродненск гос мед универс* 4:419–431. [Tsyrkunov VM, Andreyev VP, Kravchuk RI, Prokopchik NI (2017) Clinical Cytology of the Liver: Kupffer Cells. *J Grodno State Med Univ* 4:419–431. (In Russ)].
 29. *Cai J, Hu M, Chen Z, Ling Z* (2021) The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis. *J Transl Med* 19(1):186. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02854-x>
 30. *Tedesco S, Scattolini V, Albiero, Bortolozzi M, Avogaro, Cignarella, Fadini* (2019) Mitochondrial Calcium Uptake Is Instrumental to Alternative Macrophage Polarization and Phagocytic Activity. *Int J Mol Sci* 20:4966. <https://doi.org/10.3390/ijms20194966>
 31. *Zumerle S, Cali B, Munari F, Angioni R, Di Virgilio F, Molon B, Viola A* (2019) Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. *Cell Rep* 27(1):1–10.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.011>

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF KUPFFER CELLS IN THE LIVERS OF SHR AND WISTAR RATS

I. A. Nikitina[#], V. A. Razenkova, and D. E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

[#]*e-mail: inga06819@gmail.com*

In the present study, the structural features of resident liver macrophages were analyzed in the context of sustained arterial hypertension, compared to a normotensive control group. To identify resident macrophages in liver samples from nine-month-old male SHR and Wistar rats ($n = 14$), immunohistochemical staining against the Iba-1 protein was employed. Morphometric parameters and the spatial distribution patterns of Kupffer cells were assessed using the mathematical processing and image analysis software ImageJ and GIMP. It was shown that Kupffer cells in liver samples from SH rats predominantly exhibit a poorly branched or ellipsoidal shape and do not display a direct correlation with their location within the hepatic acinus, in contrast to macrophages from the Wistar group. Statistically significant differences were observed in the distribution patterns of Kupffer cells: in the SHR group, cells were distributed more uniformly within the hepatic acinus compared to those in the Wistar group, where the highest density of distribution was observed in the intermediary zone of the acinus. Identified structural and functional characteristics of resident liver macrophages in SH rats may be attributed to the functional disturbances in the liver associated with sustained arterial hypertension.

Keywords: liver; macrophages; Kupffer cells; Iba-1; arterial hypertension; portal hypertension

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ И ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ГЕМОЦИТОВ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

© 2024 г. А. А. Ткачук^{1,*}, Т. А. Кухарева¹, Е. С. Кладченко¹, А. Ю. Андреева^{1,2}

¹Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН,
г. Севастополь, Российская Федерация

²Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

* e-mail: tkachuk@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 20.09.2024 г.

После доработки 05.11.2024 г.

Принята к публикации 07.11.2024 г.

Двустворчатые моллюски как обитатели литоральной зоны Мирового океана подвержены колебаниями абиотических факторов окружающей среды. Резкие колебания параметров среды обитания сопровождаются развитием физиологической стресс-реакции в организме моллюсков, при этом изменения функционального состояния животных происходят за счет выброса нейромедиаторов в циркуляторное русло гемолимфы. Катехоламины являются ключевыми сигнальными молекулами в системе нейроэндокринной регуляции организма двустворчатых моллюсков и также участвуют в модуляции иммунного ответа в период физиологического стресса. Гемоциты, как центральное звено клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков имеют на поверхности клеточной мембраны адренорецепторы, что предполагает наличие функциональной взаимосвязи между внешним стрессом и клеточным иммунным ответом организма. В настоящей работе в условиях *in vitro* исследовано влияние адреналина в концентрациях 1 и 10 мкМ на фагоцитоз, способность к адгезии и агрегации гемоцитов средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Также изучено влияние адреналина на уровень спонтанной продукции активных форм кислорода и на изменения мембранного потенциала митохондрий клеток гемолимфы. Показано, что стимуляция гемоцитов мидий адреналином в концентрации 10 мкМ способствовала достоверному увеличению способности к фагоцитозу. Адреналин в концентрации 1 мкМ существенно увеличивал способность гемоцитов к адгезии на твердый субстрат. Также стимуляция клеток адреналином 10 мкМ в течение 30 минут приводила к росту мембранного потенциала митохондрий гемоцитов. Достоверных изменений в уровне спонтанной продукции активных форм кислорода в гемоцитах при воздействии адреналина не выявлено. Результаты настоящей работы свидетельствуют, что адреналин оказывает иммуномодулирующий эффект на гемоциты мидий и стимулирует их аэробный обмен.

Ключевые слова: средиземноморская мидия, гемоциты, адреналин, фагоцитоз, адгезия, активные формы кислорода, мембранный потенциал митохондрий

DOI: 10.31857/S0044452924070042, **EDN:** KKCDTR

ВВЕДЕНИЕ

Двустворчатые моллюски являются массовыми представителями прибрежной (в том числе, приливо-отливной) зоны Мирового океана, которая характеризуется наиболее нестабильными условиями существования [1]. Показано, что система нейроэндокринной регуляции функций организма составляет основу быстрой способности моллюсков адаптироваться к меняющимся условиям среды [2–3]. При этом нервная система двустворчатых моллюсков имеет примитивное строение в сравнении с позвоночными, так как функционально

дифференцированные органы отсутствуют [2]. Известно, что механизмы физиологического стресса у беспозвоночных животных высоко консервативны и, в целом, в значительной степени сходны с таковыми у млекопитающих [4]. Среди типичных реакций при стрессе, вызванном колебаниями условий среды обитания, а также воздействием токсикантов и биологических факторов, у двустворчатых моллюсков отмечается изменение состояния их иммунитета [5–9]. Иммунная система двустворчатых моллюсков, хотя и не имеет сложности адаптивно-го иммунитета позвоночных, обладает разнообраз-

ными механизмами врожденной неспецифической защиты, которые позволяют эффективно распознавать и уничтожать патогены различной природы [2]. Свободно циркулирующие клетки гемолимфы (гемоциты) играют ключевую роль в механизмах иммунного ответа моллюсков. Эффективность клеточного иммунного ответа гемоцитов оценивают по таким показателям как фагоцитоз, адгезия к твердому субстрату, продукция активных форм кислорода (АФК) и других цитотоксических молекул, инкапсуляция, индукция апоптоза в клетках инфекционных агентов [9].

Модуляция функций иммунитета двустворчатых моллюсков при стрессе осуществляется нейроэндокринной системой, в которой центральную роль играют катехоламины (Catecholamines, СА): норадреналин, адреналин и дофамин. СА высвобождаются в гемолимфу в ответ на острый стресс [2, 10–11]. Показано, что гемоциты двустворчатых моллюсков имеют на поверхности клеточной мембраны многочисленные рецепторы к СА, при этом воздействие норадреналина и адреналина реализуется путем связывания молекул нейромедиаторов с адренорецепторами, которые функционально близки к β -адренорецепторам позвоночных животных [10–12]. Установлено также, что помимо эффекторной функции в реализации реакций иммунитета, гемоциты двустворчатых моллюсков способны самостоятельно синтезировать СА [2, 10–11]. Ингибирующее воздействие норадреналина на различные иммунные реакции гемоцитов, включая внутриклеточную продукцию АФК, фагоцитоз, активность фенолоксидазы, бактериолитическую активность показано у гигантских устриц *Magallana (Crassostrea) gigas* (Thunberg, 1793), сиднейских устриц *Saccostrea glomerata* (A. Gould, 1850), гребешках Фаллеса *Chlamys farreri* (K. H. Jones & Preston, 1904) и других видов двустворчатых моллюсков [10–11, 13–15]. Некоторые исследователи выдвинули гипотезу, что норадреналин может модулировать активность антиоксидантной защиты и продукцию АФК в гемоцитах в ответ на окислительный стресс, хотя точный механизм этого процесса до конца не изучен [16–17]. Также установлено, что норадреналин и дофамин снижают адгезию гемоцитов к субстрату, угнетают процесс фагоцитоза и активность фенолоксидазы у других видов водных беспозвоночных, среди которых белые креветки *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), пресноводные гигантские креветки *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) и тигровые креветки *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) [18–21]. При этом, основная масса исследований сосредоточена на изучении регуляторной роли норадреналина и дофамина, тогда как исследования функций адреналина фрагментарны. В связи с этим, цель настоящей работы заключается в исследовании

влияния различных концентраций адреналина на маркерные показатели клеточного иммунитета (фагоцитоз, адгезия, агрегация, продукция АФК) и на мембранный потенциал митохондрий средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в условиях *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средиземноморские мидии *M. galloprovincialis* (размер: 84.7 ± 1.5 мм, масса: 31.2 ± 2.8 г, $n = 150$) были получены на марикультурной ферме в районе г. Севастополя (ООО “Марикультура”) в феврале 2024 г. Для адаптации к лабораторным условиям (концентрация кислорода $7\text{--}8$ мг·л⁻¹, pH = 8.2, температура $18\text{--}20$ °C) моллюсков размещали в пластиковых аквариумах емкостью 50–70 л, оборудованных системой аэрации и фильтрации воды в течение 1 недели. Мидии находились в состоянии функционального покоя. Далее из синуса заднего мускула-замыкателя раковины стерильным шприцем отбирали пробу гемолимфы (0.5–2.0 мл). Гемоциты трижды отмывали в стерильной морской воде на рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5430R (500 g, 5 мин, при $+ 10$ °C). По окончании отмывки клетки ресуспендировали в стерильной морской воде (концентрация клеток $2\text{--}4 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹). Для получения оптимальной концентрации клеток в суспензиях пробу гемолимфы объединяли из двух особей.

Стимуляция гемоцитов адреналином проводилась в условиях *in vitro*. Готовую суспензию клеток инкубировали с адреналином в финальной концентрации 1 и 10 мкМ в течение 30 минут при $+ 4$ °C в темноте. Далее пробы подготавливались к исследованию адгезии и фагоцитоза.

Анализ адгезии и агрегации гемоцитов проводили по адаптированной методике Aladaileh et al., 2008. На предметные стекла наносили по 30 мкл стимулированной адреналином суспензии гемоцитов и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре и дневной освещенности. Далее пробы фиксировали и окрашивали эозином в течение 2 минут и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus CX43 (Япония) в световом режиме. На каждом предметном стекле подсчитывали количество прикрепившихся клеток и агрегатов в десяти случайно выбранных полях зрения. Изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Данные представлены как средняя частота прикрепившихся и агрегированных гемоцитов на поле зрения $\pm$ стандартная ошибка [22].

Для определения фагоцитарной активности гемоцитов мидий к стимулированным адреналином суспензиям клеток гемолимфы добавляли зеленый флуоресцентный зимозан (Zymosan Green,

Molecular Probes Inc.) в соотношении 1:20 (число гемоцитов : число частиц зимозана) и инкубировали при 20 °C в темноте в течение 60 минут. Затем клетки отмывали 3 раза в стерильной морской воде на центрифуге при 500 g 5 мин для удаления свободного зимозана. Суспензии клеток наносили на предметное стекло и фотографировали на микроскопе Olympus CX 43 (Япония) во флуоресцентном режиме. Фагоцитарную активность (ФА) гемоцитов рассчитывали, как процент клеток, содержащих частицы зимозана. Фагоцитарный индекс (ФИ) определяли как среднее число частиц зимозана на один гемоцит. Объем выборки составил 10 проб на каждую экспериментальную группу, анализировали по 100 гемоцитов на пробу.

Изменения мембранного потенциала митохондрий гемоцитов и продукции АФК проводили методом проточной цитометрии. Анализ проводился спустя 5 и 30 минут инкубации клеток с адреналином в концентрациях 1 и 10 мкМ. Далее измеряли интенсивность флуоресценции клеток на канале FL1 (488 нм) проточного цитометра MACSQuant (Германия). Для анализа изменений мембранного потенциала митохондрий гемоцитов применялся краситель Rhodamine 123 (Rh123, Sigma) (время инкубации 30 минут при +4 °C в темноте), а способность клеток к спонтанной продукции АФК оценивали при помощи флуоресцентного зонда 2,7-диацетат дихлорофлуоресцеина (DCF-DA, Sigma) (время инкубации 30 минут при +4 °C в темноте).

Нормальность распределения данных проверяли при помощи теста Шапиро-Уилка. Распределение данных, полученных методами световой и

флуоресцентной микроскопии, было отличным от нормального, поэтому различия между группами проверяли при помощи непараметрического теста Крускала–Уоллиса, с последующим применением апостериорного анализа – теста Данна для множественных сравнений. Данные по проточной цитометрии анализировались двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA) с последующим применением критерия Даннета для анализа различий опытных групп от контроля (нестимулированные клетки). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Результаты считались статистически значимыми, если вероятность ошибки первого рода (p) была меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стимуляция гемоцитов мидий адреналином в концентрации 10 мкМ достоверно увеличивала их ФИ и ФА. ФИ увеличился на 30 % относительно контроля (рис. 1 b), а ФА на 20 % ($p \leq 0.05$, $n = 10$) (рис. 1 c). При этом адреналин в концентрации 1 мкМ не влиял на способность гемоцитов к фагоцитозу.

Адреналин в концентрации 1 мкМ достоверно стимулировал адгезию гемоцитов к предметным стеклам: число адгезированных гемоцитов в полях обзора увеличилось на 79 % по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0.05$, $n = 10$) (рис. 2b). При этом у гемоцитов, инкубированных с 10 мкМ адреналина способность к адгезии не отличалась от контроля. Также адреналин в обеих концентрациях

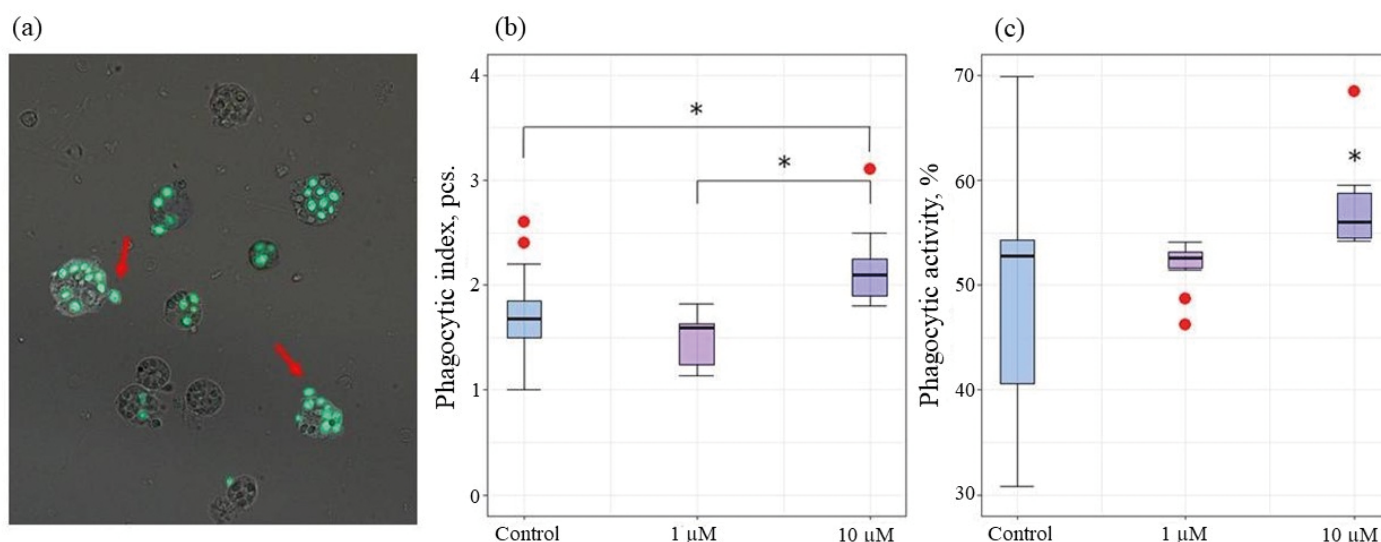


Рис. 1. Влияние адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) на интенсивность фагоцитоза гемоцитов средиземноморской мидии *M. galloprovincialis*. (a) – микрофотографии гемоцитов, содержащих частицы зеленого флуоресцентного зимозана (↑), фагоцитарный индекс (b) и фагоцитарная активность (c) клеток гемолимфы. * – достоверно относительно контроля при $p \leq 0.05$ ($n = 10$).

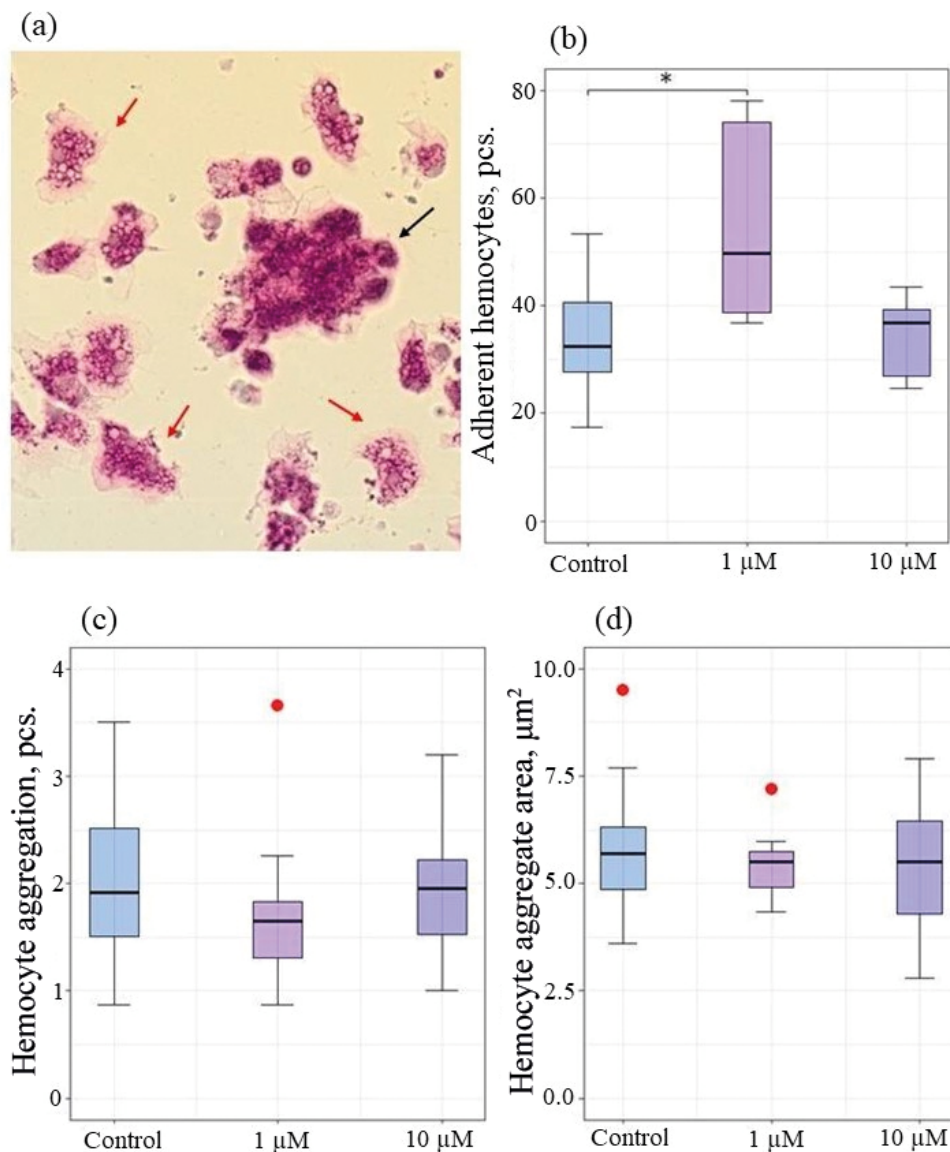


Рис. 2. Влияние адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) на адгезию и агрегацию клеток гемолимфы средиземноморских мидий *M. galloprovincialis*: (a) — микрофотография суспензии гемоцитов, активированных добавлением адреналина (b) — число адгезированных гемоцитов, (c) — число агрегатов гемоцитов; (d) — площадь агрегатов гемоцитов. ↓ — адгезированные гемоциты; ↓ — агрегаты. * — достоверно относительно контроля при $p \leq 0.05$ ($n = 10$).

не влиял на агрегацию гемоцитов: число и площадь агрегатов клеток в полях обзора не менялась.

Адреналин в различных концентрациях достоверно не влиял на внутриклеточную концентрацию АФК в гемоцитах в течение периода эксперимента (5 мин, 30 мин) (рис. 3).

Мембранный потенциал митохондрий гемоцитов возрастал при инкубации с адреналином (рис. 4), достоверные различия с контролем отмечались спустя 30 минут воздействия адреналина в концентрации 10 мкМ. Показатели флуоресценции Rh123 выросли на 25 % относительно контроля ($p \leq 0.05$, $n = 10$) (рис. 4 б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что СА играют важную роль в регуляции иммунных функций гемоцитов [2, 10, 23]. Исследования по количественному определению содержания СА в органах и тканях различных видов двусторчатых моллюсков (в частности, *Patinopesten yessoensis* (Jay, 1857), *M. gigas*, *C. farreri* и *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), как правило, свидетельствуют о более высоком содержании дофамина и норадреналина в ганглиях, гонадах, жабрах и гемолимфе, тогда как концентрации адреналина, существенно, в ряде случаев на порядок, ниже [24–26]. Так-

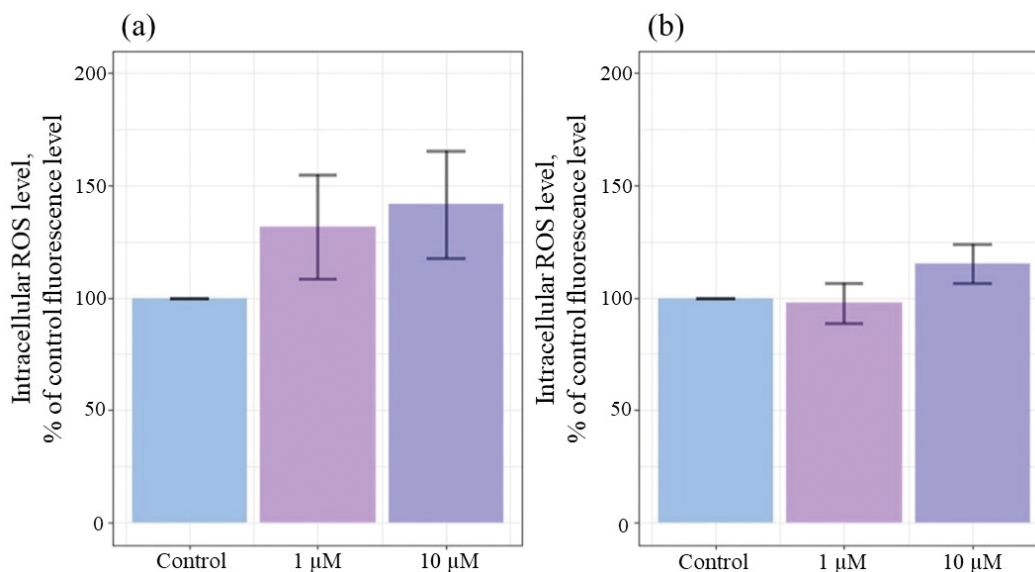


Рис. 3. Содержание активных форм кислорода в гемоцитах мидии при влиянии адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) в течение 5 мин (а) и 30 мин (б).

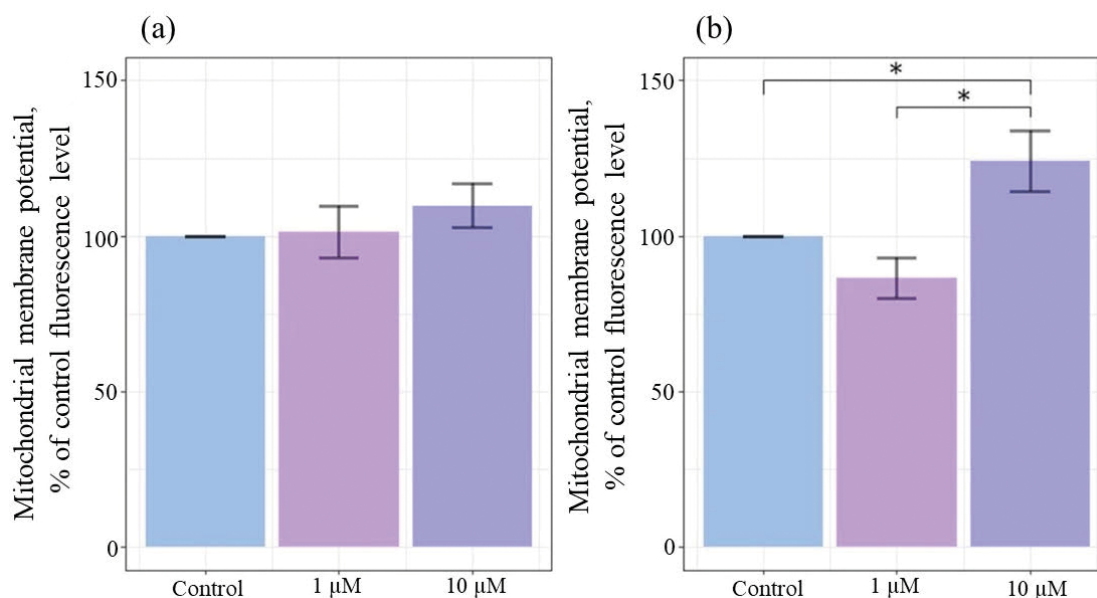


Рис. 4. Изменение мембранного потенциала митохондрий гемоцитов мидий при влиянии адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) в течение 5 мин (а) и 30 мин (б). * — достоверно относительно контроля при $p \leq 0.05$ ($n = 10$)

же показано, что адреналин, норадреналин и дофамин синтезируются и выделяются гемоцитами при стимуляции липополисахаридами бактерий, факторами роста тромбоцитов, трансформирующим фактором роста (TGF- β 1) и др. веществами [3, 27]. При этом определение концентраций СА в органах, тканях и жидкостях организма двустворчатых моллюсков не позволяет в полной мере определить их функциональную роль. В особенности это касается адреналина, который быстро метаболизируется в организме (в течение 25–30 мин) вследствие чего

его детектируемая концентрация зачастую ниже предела измерения [3, 27–28]. Таким образом, для определения физиологических эффектов воздействия СА на клетки двустворчатых моллюсков наиболее целесообразно применение экспериментальной стимуляции *in vitro*.

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что адреналин оказывал существенное воздействие на маркерные показатели клеточного иммунитета мидий. Наибольшая концентрация адреналина (10 мкМ) способствовала росту ФА и ФИ гемоци-

тов. Также установлено, что адреналин в минимальной концентрации (1 мкМ) достоверно стимулировал адгезию гемоцитов к субстрату. Таким образом, инкубация с адреналином оказывает иммуномодулирующий эффект на гемоциты мидий. Вместе с тем, не все исследованные показатели клеточного иммунного ответа реагировали на стимуляцию адреналином. Так, уровень спонтанной продукции АФК достоверно не отличался от контроля. При этом, влияние норадреналина на показатели клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков зачастую отличается. Воздействие норадреналина *in vitro* ингибировало ФА, способность гемоцитов к адгезии к твердому субстрату и продукцию АФК у таких видов как гигантская устрица *M. gigas*, сиднейская каменная устрица *S. glomerata*, жемчужная устрица Акоя *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) [10–11, 22, 29–30]. Очевидно, что система нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы обладает существенной сложностью организации, поскольку различные типы нейромедиаторов способны специфически влиять на иммунные функции двустворчатых моллюсков. Кроме того, экзогенное или эндогенное (в отношении гемоцитов) происхождение СА, вероятно, также может влиять на характер наблюдаемых изменений показателей иммунного ответа [2]. Интерес вызывает и сам внутриклеточный путь регуляции ФА и способности гемоцитов к адгезии, поскольку оба процесса тесно связаны со свойствами клеточной мембраны и цитоскелета [31]. Известно, что адреналин способен влиять на различные механические свойства эритроцитов позвоночных, такие как деформируемость, жесткость и устойчивость к осмотическому шоку (кривая осмотической стойкости) [32–34]. У двустворчатых моллюсков осмотическая стойкость гемоцитов, напротив, не менялась при воздействии адреналина, хотя реакция регуляторного снижения объема в ответ на гипоосмотический стресс полностью останавливалась [35]. Эти результаты, а также достоверное увеличение числа адгезированных гемоцитов позволяют предположить, что в основе наблюдаемых изменений интенсивности фагоцитоза может быть регуляция свойств клеточной мембраны гемоцитов, однако, данное предположение требует дальнейших исследований.

Помимо влияния на маркерные показатели клеточного иммунитета, стимуляция гемоцитов мидий адреналином приводила к росту в них величины мембранного потенциала митохондрий. При этом достоверный рост отмечался спустя 30 мин воздействия при наибольшей концентрации адреналина (10 мкМ) тогда как кратковременный период воздействия и низкая концентрация вещества не приводили к достоверным изменениям интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных Rh123. Как правило, рост величины мембранного потенциала

митохондрий связан с усилением аэробного обмена в клетках и является общепринятым индикатором интенсивности клеточного дыхания [36–37]. Следовательно, можно предположить, что адреналин стимулирует аэробный метаболизм в гемоцитах мидий. Стимулирующее действие адреналина на клеточный метаболизм, в частности, углеводный обмен, широко исследовано на клеточных моделях позвоночных животных, включая клетки иммунной системы. Так воздействие адреналина на макрофаги крыс в течение 40 мин усиливало потребление глюкозы, а также продукцию в них перекиси водорода. Причем образование последней, по предположению авторов, было опосредовано митохондриями [38]. Также, в изолированных гепатоцитах речной миноги (*Lampetra fluviatilis* (Linnaeus, 1758)) и кардиомиоцитах крыс отмечено увеличение мембранного потенциала митохондрий и модуляция активности ферментов дыхательной цепи при стимуляции адреналином [39–40]. Таким образом, стимулирующее воздействие адреналина на интенсивность клеточного аэробного обмена показано на различных типах клеток у представителей как высших, так и низших позвоночных, что предполагает высокий консерватизм наблюдаемой функциональной связи. Результаты настоящей работы, в свою очередь, свидетельствуют о том, что механизмы воздействия адреналина на активность митохондрий присутствуют и у двустворчатых моллюсков.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе установлено, что клеточные иммунные реакции гемоцитов мидий чувствительны к воздействию адреналина. Показано усиление ФИ, ФА и увеличение адгезии гемоцитов к твердой поверхности, а также выявлено, что нарастание интенсивности клеточных иммунных реакций сопровождается ростом величины мембранного потенциала митохондрий. Последнее предполагает возможность нейроэндокринной регуляции интенсивности аэробного метаболизма у гемоцитов двустворчатых моллюсков, аналогично иммунцитам позвоночных (макрофаги).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям локального этического комитета ФИЦ ИнБЮМ, протокол № 1(6)/24 от 12.03.2024 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания 124030100090-4 (FNNZ-2024-0035) “Механизмы функционирования иммунной системы двустворчатых

моллюсков и физиологические основы ее адаптации к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам окружающей среды” (определение адгезии и агрегации гемоцитов к субстрату, анализ фагоцитоза и спонтанной продукции клетками АФК), а также Государственного задания № 075-00264-24-00 “Механизмы адаптации человека и животных к экстремальным воздействиям природного и антропогенного характера” (анализ изменений величины мембранного потенциала митохондрий гемоцитов).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.Ю.А), сбор данных (А.А.Т., Т.А.К.), обработка данных (А.А.Т., Т.А.К., А.Ю.А., Е.С.К.), написание и редактирование рукописи (А.Ю.А., А.А.Т., Т.А.К., Е.С.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lange X, Klingbeil K, Burchard H (2020) Inversions of estuarine circulation are frequent in a weakly tidal estuary with variable wind forcing and seaward salinity fluctuations. *J Geophysical Res: Oceans* 125: e2019JC015789. <https://doi.org/10.1029/2019JC015789>
2. Liu Z, Li M, Yi Q, Wang L, Song L (2018) The neuroendocrine-immune regulation in response to environmental stress in marine bivalves. *Front Physiol* 9: 1456. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01456>
3. Fabbri E, Balbi T, Canesi L (2024) Neuroendocrine functions of monoamines in invertebrates: Focus on bivalve molluscs. *Mol Cell Endocrinol* 112215. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112215>
4. Adamo SA (2012) The effects of the stress response on immune function in invertebrates: an evolutionary perspective on an ancient connection. *Horm Behav* 62: 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012>
5. Amorim VE, Gonçalves O, Capela R, Fernández-Boo S, Oliveira M, Dolbeth M, Arenas F, Cardoso PG (2020) Immunological and oxidative stress responses of the bivalve *Scrobicularia plana* to distinct patterns of heatwaves. *Fish Shellfish Immunol* 106: 1067–1077. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.024>
6. Sendra M, Sparaventi E, Novoa B, Figueras A (2021) An overview of the internalization and effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves. *Sci Total Environment* 753: 142024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142024>
7. Andreyeva AY, Kladchenko ES, Gostyukhina OL (2022) Effect of hypoxia on immune system of bivalve molluscs. *Marine Biol* 173: 3–16. <https://doi.org/10.21072/mbj.2022.07.3.01>
8. Tan K, Sun Y, Zhang H, Zheng H (2023) Effects of harmful algal blooms on the physiological, immunity and resistance to environmental stress of bivalves: Special focus on paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. *Aquaculture* 563: 739000. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739000>
9. De la Ballina NR, Maresca F, Cao A, Villalba A (2022) Bivalve haemocyte subpopulations: a review. *Front Immunol* 13: 826255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255>
10. Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001) Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via β -adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*. *Develop Comp Immunol* 25: 285–289. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(00)00067-7)
11. Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001) Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a β -adrenergic receptor–cAMP signaling pathway. *Gen Comparat Endocrinol* 122: 252–259. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7643>
12. Massarsky A, Trudeau VL, Moon TW (2011) β -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human β -blockers on aquatic organisms. *J Exp Zool Part A: Ecol Gen Physiol* 315: 251–265. <https://doi.org/10.1002/jez.672>
13. Lacoste A, Malham SK, Gélébart F, Cueff A, Poulet SA (2002) Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 26: 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00067-2)
14. Jiang Q, Zhou Z, Wang L, Yang C, Wang J, Wu T, Song L (2014) Mutual modulation between norepinephrine and nitric oxide in haemocytes during the mollusc immune response. *Scie Rep* 4: 6963. <https://doi.org/10.1038/srep06963>
15. Liao Q, Lei F, Zhang N, Miao J, Tong R, Li Y, Pan L (2024) The immunotoxicity mechanism of hemocytes in *Chlamys farreri* incubated with noradrenaline and benzo [a] pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide alone or in combination. *Fish Shellfish Immunol* 144: 109278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109278>
16. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res International* 2014: 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
17. Álvarez-Diduk R, Galano A (2015) Adrenaline and noradrenaline: protectors against oxidative stress or molecular targets? *J Physic Chem B* 119: 3479–3491. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00052>
18. Cheng W, Chieu HT, Ho MC, Chen JC (2006) Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 21: 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.003>
19. Chang CC, Wu ZR, Kuo CM, Cheng W (2007) Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 23: 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.001>

20. Chang CC, Hung MD, Cheng W (2011) Norepinephrine depresses the immunity and disease-resistance ability via $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -adrenergic receptors of *Macrobrachium rosenbergii*. Develop Compar Immunol 35: 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.020>
21. Li JT, Lee PP, Chen OC, Cheng W, Kuo CM (2005) Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immunol 19: 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.003>
22. Aladaileh S, Mohammad MG, Ferrari B, Nair SV, Raftos DA (2008) In vitro effects of noradrenaline on Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mol Integrat Physiol 151: 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.08.028>
23. Barcia R, Ramos-Martínez JI (2011) Stress-based modulation of the immune response in molluscan hemocytes: a two-receptor model. Invertebrat Survival J 8: 56–58.
24. Osada M, Matsutani T, Nomura T (1987) Implication of catecholamines during spawning in marine bivalve molluscs. International journal of invertebrate reproduction and development 12: 241–251. <https://doi.org/10.1080/01688170.1987.10510324>
25. Osada M, Nomura T (1989) Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Comp Biochem Physiol Part C: Comp Pharmacol 93: 171–173. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90029-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90029-7)
26. Chen M, Yang H, Xu B, Wang F, Liu B (2008) Catecholaminergic responses to environmental stress in the hemolymph of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. J Exp Zool Part A: Ecol Gen Physiol 309: 289–296. <https://doi.org/10.1002/jez.458>
27. Cao A, Ramos-Martínez JI, Barcia R (2007) In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk., treatment with corticotropin or growth factors conditions catecholamine release. Internat Immunopharmacol 7: 1395–1402. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.07.008>
28. Canesi L, Miglioli A, Balbi T, Fabbri E (2022) Physiological roles of serotonin in bivalves: possible interference by environmental chemicals resulting in neuroendocrine disruption. Front Endocrinol 13: 792589. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.792589>
29. Chen H, Wang L, Zhou Z, Hou Z, Liu Z, Wang W, Gao D, Gao Q, Wang M, Song, L (2015) The comprehensive immunomodulation of NeurimmiRs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas* after acetylcholine and norepinephrine stimulation. BMC Genomics 16: 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2150-8>
30. Kuchel RP, Raftos DA (2011) In vitro effects of noradrenaline on Akoya pearl oyster (*Pinctada imbricata*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol 31: 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.025>
31. Freeman SA, Grinstein S (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. Immunol Rev 262: 193–215. <https://doi.org/10.1111/imr.12212>
32. Volodchenko AI, Tsirkin VI, Kostyaev AA (2014) The mechanism of change in the rate of agglutination of human erythrocytes under the influence of adrenaline. Hum Physiol 40: 171–178. <https://doi.org/10.1134/S0362119714010198>
33. Andreyeva AY, Kladchenko ES, Sudnitsyna JS, Krivchenko AI, Mindukshev IV, Gambaryan S (2021) Protein kinase A activity and NO are involved in the regulation of crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cell osmotic fragility. Fish Physiol Biochem 47: 1105–1117. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00971-4>
34. Chelebueva ES, Kladchenko ES, Mindukshev IV, Gambaryan S, Andreyeva AY (2024) ROS formation, mitochondrial potential and osmotic stability of the lamprey red blood cells: effect of adrenergic stimulation and hypoosmotic stress. Fish Physiol Biochem 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01342-5>
35. Ткачук АА, Кладченко ЕС, Андреева АЮ (2023) Роль бета-адренорецепторов и аденилатциклазы в процессе адаптации гемоцитов средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*) к гипоосмотическому стрессу. Биоразнообраз устойчив разв 8: 52–61. [Ткачук АА, Кладченко ЕС, Андреева АЮ (2023) The role of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase in the process of adaptation of hemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) to hypoosmotic stress. Biodivers Sustainable Devel 8: 52–61. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.04>
36. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. (2013) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Mitochondrion 13: 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
37. Koch RE, Buchanan KL, Casagrande S, Crino O, Dowling DK, Hill GE, Hood WR, McKenzie M, Mariette MM, Noble DWA, Pavlova A, Seebacher F, Sunnucks P, Udino E, White CR, Salin K, Stier A (2021) Integrating mitochondrial aerobic metabolism into ecology and evolution. Trends Ecol Evol 36: 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.006>
38. Fernando L, Rosa BC, Safi DA, Cury Y, Curi R (1992) Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages. Biochem Pharmacol 44: 2235–2241. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90352-J](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90352-J)
39. Konovalova SA, Zubatkina IS, Savina MV (2010) The influence of estradiol, epinephrine and cAMP on mitochondria energization and intracellular free Ca^{2+} concentration in lamprey hepatocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1797: 126–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.375>
40. Tapbergenov SO, Sovetov BS, Smailova ZK (2022) Adrenergic receptors in the mechanism of regulation of mitochondrial and cytoplasmic enzymes of cardiomyocytes by catecholamines. Bull Exp Biol Med 173: 330–334. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05544-w>

EFFECT OF ADRENALINE ON MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND INDICATORS OF THE CELLULAR IMMUNITY OF HEMOCYTES OF THE MEDITERRANEAN MUSSEL (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

A. A. Tkachuk^{a, #}, T. A. Kukhareva^a, E. S. Kladchenko^a, and A. Yu. Andreyeva^{a, b}

^aA. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

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

[#]e-mail: tkachuk@ibss-ras.ru

Bivalves as inhabitants of the littoral zone of the World Ocean are subjected to fluctuations in abiotic environmental factors. Sharp fluctuations in environmental parameters are accompanied by the development of a physiological stress reaction in the organism of mollusks, while changes in their functional state occur due to the release of neurotransmitters into the hemolymph. Catecholamines are key signaling molecules in the system of neuroendocrine regulation of bivalve mollusks and also are involved in the modulation of the immune response during physiological stress. Hemocytes, as the central effector of the cellular immunity of bivalve mollusks, have adrenoreceptors on the surface of the cell membrane, which suggests the presence of a functional relationship between external stress and the cellular immune response. In the present work, the effect of adrenaline at concentrations of 1 and 10 μ M on phagocytosis, adhesion and aggregation capacity of hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) was investigated *in vitro*. The effect of adrenaline on the level of spontaneous production of reactive oxygen species and on changes in the mitochondrial membrane potential of hemocytes was also studied. It was shown that stimulation of mussel hemocytes with adrenaline at a concentration of 10 μ M contributed to a reliable increase in the ability to phagocytosis. Adrenaline at a concentration of 1 μ M significantly increased the ability of hemocytes to adhere to a solid substrate. Also, stimulation of cells with adrenaline at 10 μ M for 30 minutes led to an increase in the membrane potential of hemocyte mitochondria. No reliable changes in the level of spontaneous production of active forms of oxygen in hemocytes under the influence of adrenaline were detected. The results of this work indicate that adrenaline has an immunomodulatory effect on mussel hemocytes and stimulates their aerobic metabolism.

Keywords: Mediterranean mussel, hemocytes, adrenaline, phagocytosis, adhesion, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ ДЕЙСТВИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ЖЕЛУДОЧКОВ В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫС, СОДЕРЖАЩИХСЯ НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ/ВЫСОКОСАХАРОЗНОЙ ДИЕТЕ

© 2024 г. И. В. Кубасов, А. В. Степанов*, Ю. А. Филиппов, О. Ю. Карнишкина, А. А. Панов, М. Г. Добрецов

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

* e-mail: botanik2407@gmail.com

Поступила в редакцию 30.09.2024 г.

После доработки 25.10.2024 г.

Принята к публикации 07.11.2024 г.

Крысы, содержащиеся на высокожировой/высокосахарозной диете (ВЖСД) в течение 10–12 недель, демонстрировали развитие гипергликемии и признаки висцерального ожирения. Субэпикардальные миоциты левого желудочка (ЛЖ) сердец этих крыс отличались от контроля существенно увеличенной фракцией внеклеточных потенциалов действия (вПД) сердца, характеризующихся выраженной фазой следовой гиперполяризации (СГ) и ускоренным спадом вПД. Локальная доставка в зону регистрации вПД апамина (блокатора Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов низкой проводимости (IK_{Ca} , SK-каналы) в концентрации 500 нМ в составе раствора внутри пипетки сопровождалась подавлением фазы СГ и продолжением спада вПД. Полученные данные предполагают, что потребление ВЖСД ведет к увеличению экспрессии и/или активности SK-каналов и, как результат, к развитию СГ и укорочению вПД эпикардальных кардиомиоцитов ЛЖ сердца крыс.

Ключевые слова: крыса, кардиомиоцит, высокожировая/высокосахарозная диета, кардиомиопатия, внеклеточный потенциал действия, SK-каналы

DOI: 10.31857/S0044452924070056, **EDN:** KKCCFH

ВВЕДЕНИЕ

Изменения в электровозбудимой мембране кардиомиоцитов лежат в основе процессов ремоделирования электрогенеза при системных сердечных заболеваниях различной этиологии, в том числе и при ряде хронических метаболических расстройств, таких как сахарный диабет (СД). В наших исследованиях с использованием метода внеклеточной регистрации ПД (вПД) микроэлектродами с малым диаметром кончика (2–5 мкм), позволяющим регистрировать активности как поверхностной мембраны, так и мембраны t-трубочек кардиомиоцитов в составе изолированного сердца, было показано, что в стрептозотоциновой модели сахарного диабета 1-го типа (СТЗ-СД1) большинство вПД кардиомиоцитов желудочков сердца, в отличие от контроля, сопровождается выраженной фазой следовой гиперполяризации (СГ) [1]. При дальнейшем рассмотрении вопроса природы этой фазы было установлено, что значительная роль в ее формировании принадлежит апамин-чувствительным Ca^{2+} -активируемым K^{+} -каналам низкой проводимости (IK_{Ca} , SK-каналы) [2]. Функциональное значение этих изменений в миокарде при развитии

СД1 остается неясным. Однако другим не менее важным и малоизученным вопросом являются изменения в электрогенезе поверхностной мембраны и в t-трубочках кардиомиоцитов при развитии наиболее распространенных в современном обществе метаболических заболеваний и расстройств с высокой степенью риска развития сердечно-сосудистых заболеваний – СД второго типа (СД2) и преддиабета 2 типа / метаболического синдрома (МС). Так, СД2 составляет не менее 90% от всех диагностированных случаев СД. Также высока и встречаемость лиц из группы риска развития СД2 – людей с МС [3–5]. Существует множество определений МС, однако, как правило, все они включают нарушения метаболизма глюкозы (преддиабет), липидного обмена, ожирение и гипертензию [5–7].

Учитывая вышесказанное, целью данной работы было исследовать наличие изменений в профилях вПД различных отделов мембраны кардиомиоцитов субэпикарда желудочков изолированного сердца крыс с МС с использованием метода внеклеточной регистрации и возможное участие в этих изменениях SK-каналов. Для индукции МС использовали хорошо апробированную другими исследовательскими

группами модель содержания крыс на высокожировой/высокосахарозной диете (ВЖСД) [7–10].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар весом 260–410 г и возрастом 3–4 месяца. Всего в работе было использовано 10 контрольных и 9 крыс на ВЖСД. Крыс содержали в виварии ИЭФБ РАН в индивидуальных клетках. Животные контрольной группы (К) имели на протяжении всего эксперимента (10–12 недель) свободный доступ к питьевой воде и сухому корму (ЛБК-120, Тосненский комбикормовый завод, Россия; 2,7 ккал/г). Крысам ВЖСД-группы, помимо питьевой воды и сухого корма, был предоставлен доступ к поилкам со сладкой водой, подслащенной сахаром (30% сахара; 3,7 ккал/г сахара), а также кормушкам со свиным жиром (Baytler, Уфа; 8,9 ккал/г). Вес крыс и потребляемое количество воды, подслащенной воды, корма и жира измерялись на протяжении 10 недель эксперимента с интервалом в 2–3 дня. Кроме того, в конце эксперимента после 15 часов голодания проводился тест на толерантность к глюкозе (ГТТ). В ГТТ измеряли уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены неанестезированных крыс, до и на 15, 30, 60 и 120 минутах после внутривенного введения животному 2 г/кг глюкозы (глюкометр “One Touch Ultra”, США). В терминальных экспериментах (10–12 недель диеты) был определен уровень случайной глюкозы, и затем животные были наркотизированы введением смеси золетила (40 мг/кг веса животного; Virbac, Франция) и ксиланита (10 мг/кг веса животного; Нита-Фарм, Россия) с последующими определением масс тела и абдоминального жира и изоляцией сердца для электрофизиологических экспериментов.

Электрофизиологические исследования проводились на изолированных сердцах крыс в условиях сохраненного синусового ритма при постоянной перфузии сердца аэрируемым физиологическим раствором по методу Лангендорфа: сердце извлекалось и помещалось на установку для ретроградной перфузии, совмещенную с системой для микроэлектродной регистрации [11]. Перфузионный раствор представлял собой аэрированный карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2) раствор Тироде со следующим составом (в мМ): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 5,6 глюкоза; pH 7.4. Эксперименты проводили с подогревом перфузирующего раствора до 36–37°C (in-line heater TC-324C, Wagner Instruments, USA). Скорость перфузии коронарной системы сердца составляла 5–7 мл/мин. В таких условиях изолированные сердца поддерживали устойчивый электрогенез в течение 2–3 часов. Изготовление микроэлектродов (патч-пипеток) с диаметром кончика 5 мкм производили с использованием пуллера (P-1000, Sutter Instruments, USA)

из трубочек боросиликатного стекла с наружным диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм (BF150-86-10, Sutter Instruments, USA). Микроэлектроды заполняли раствором Тироде (РТ) или, в части экспериментов, раствором Тироде с добавлением селективного блокатора SK-каналов апамина (Tocris, США) в концентрации 500 нМ (РТА) [12]. Сопротивление кончика заполненных микроэлектродов составляло около 2 МОм. Сократительная активность сердца блокировалась добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы 2,3-бутандион монооксида (BDM, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 30 мМ. Микроэлектрод, заполненный РТ или РТА, подводили к произвольно выбранным участкам поверхности ЛЖ исследуемых сердец контрольной и экспериментальной групп при помощи микроманипулятора Sensapex (Финляндия). При образовании устойчивого контакта кончика микроэлектрода с поверхностью кардиомиоцита регистрировались авторитмические (частота в диапазоне 0.3–0.5 Гц, рис. 1а) систолические вПД субэпикардиальных миоцитов, которые усиливались с помощью усилителя AM-1500 (National Instruments, США) и оцифровывались с частотой 10 кГц с использованием аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments, США). В среднем в каждом эксперименте с использованием микроэлектродов, заполненных РТ, выполнялась непрерывная регистрация от 10–15 мест отведения вПД в течение 1–2 минут в каждом из участков регистрации. В 3–4 контрольных и экспериментальных сердцах последние 2–4 из этих регистраций проводились с использованием микроэлектродов, заполненных РТА, и длились не менее 30 минут, необходимых для полного развития блокирующего эффекта апамина в точке регистрации. Оцифрованные сигналы анализировались с помощью программного пакета WinWCP 5 (SIPBS, Великобритания). Сигналы разделялись на две группы: вПД1, характеризующиеся наличием одного негативного пика (P1; рис. 1б), и вПД2, характеризующиеся наличием двух негативных пиков (P1 и P2) или одним негативным пиком с выраженным изломом на его спаде (рис. 1с). Примерно 35% вПД1 и вПД2 завершались позитивной фазой СГ (after-hyperpolarization, АНР; рис. 1б–с, штриховые линии). Перед анализом сигналы были нормированы к амплитуде первого пика вПД (P1), после чего для вПД1 измеряли T_{90} (время спада на 90% от абсолютной амплитуды негативного пика) и $A_{АНР}$ (относительная пиковая амплитуда позитивной фазы СГ). Для вПД2 измеряли T_{90} (время спада на 90% от абсолютной амплитуды первого негативного пика сигнала), $A_{АНР}$ и $A_{P2/P1}$ (относительная амплитуда 2-го пика вПД2; в долях от амплитуды первого негативного пика сигнала). Если сигнал не имел выраженной фазы СГ, амплитуда этой фазы

считалась равной нулю (рис.1b-с, сплошные линии). Измеренные величины были усреднены для всех вПД1 и вПД2, зарегистрированных в каждом исследованном сердце, и затем использованы для сравнения между К- и ВЖСД-группами животных. Перед сравнением распределения данных проверяли на нормальность (тест Шапиро-Уилка) и в соответствии с результатами этой проверки различия между значениями в контрольной и экспериментальной группах оценивали как достоверные при $p < 0.05$, используя соответствующий параметрический или непараметрический тест. Для выявления потенциальных внутригрупповых взаимоотношений между измеренными параметрами использовался линейный регрессионный анализ. Статистический анализ данных проводился с использованием программы GraphPad Prism 9.0, (GraphPad Software, США). Представленные в тексте результаты приведены в виде средних значений величин с их стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики контрольных и ВЖСД-крыс. На начало эксперимента контрольные и ВЖСД-крысы не отличались по весу (325 ± 11 и 323 ± 10 г.) ни по уровню случайной глюкозы (6.2 ± 0.2 и 6.1 ± 0.1 мМ). На протяжении 10 недель эксперимента крысы со свободным доступом к подслащенной воде и жиру потребляли существенно меньше сухого корма, чем контрольные животные (3.4 ± 0.3 и 6.8 ± 0.5 г/день/100 г веса крысы), но статистически значимо больше калорий (28.3 ± 0.8 и 18.3 ± 1.3 г/день/100 г веса крысы). Характеристики животных, измеренные в конце эксперимента (10 – 12 недель диеты) представлены в таблице 1.

Характеристики вПД кардиомиоцитов контрольных крыс. На рис. 1 представлены фрагменты не-

Таблица 1. Характеристики животных на конец эксперимента

Параметр (единица измерения)	Контрольная группа (10 крыс)	ВЖСД группа (9 крыс)
Прирост в весе (г за 10 недель)	73 ± 7	95 ± 11
Глюкоза натощак (мМ)	5.3 ± 0.2	$6.4 \pm 0.2^*$
Случайная глюкоза (мМ)	6.1 ± 0.2	$6.9 \pm 0.1^{\#}$
ГТТ, площадь под кривой (мМ*мин)	1216 ± 73	1383 ± 122
Абдоминальный жир, г/100 г веса тела	0.82 ± 0.08	$1.79 \pm 0.24^*$

* – t -критерий Стьюдента, $p < 0.05$; # – U -критерий Манна – Уитни, $p < 0.05$

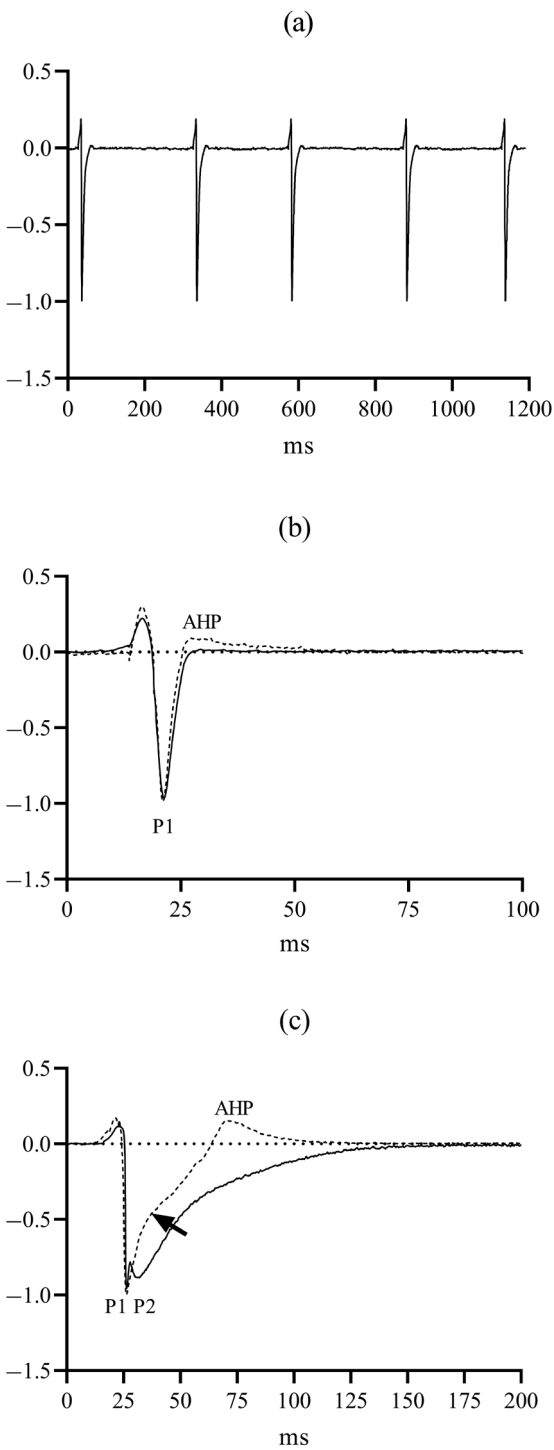


Рис. 1. Репрезентативные примеры непрерывной записи авторитмических вПД1 (а) и примеры индивидуальных профилей нормализованных вПД1 (b) и вПД2 (с) кардиомиоцитов сердец контрольных крыс. Профили индивидуальных вПД были нормализованы к величине их первого негативного пика (P1). P2 – метка второго негативного пика вПД2. Штриховыми линиями представлены примеры сигналов, сопровождающихся фазой СГ (afterhyperpolarization, AHP). Обратите внимание, что вПД2, указанный штриховой линией, хотя и не имеет отчетливого второго негативного пика, характеризуется выраженным изломом на спаде своего единственного негативного пика (стрелка) и, поэтому тоже классифицирован, как вПД2.

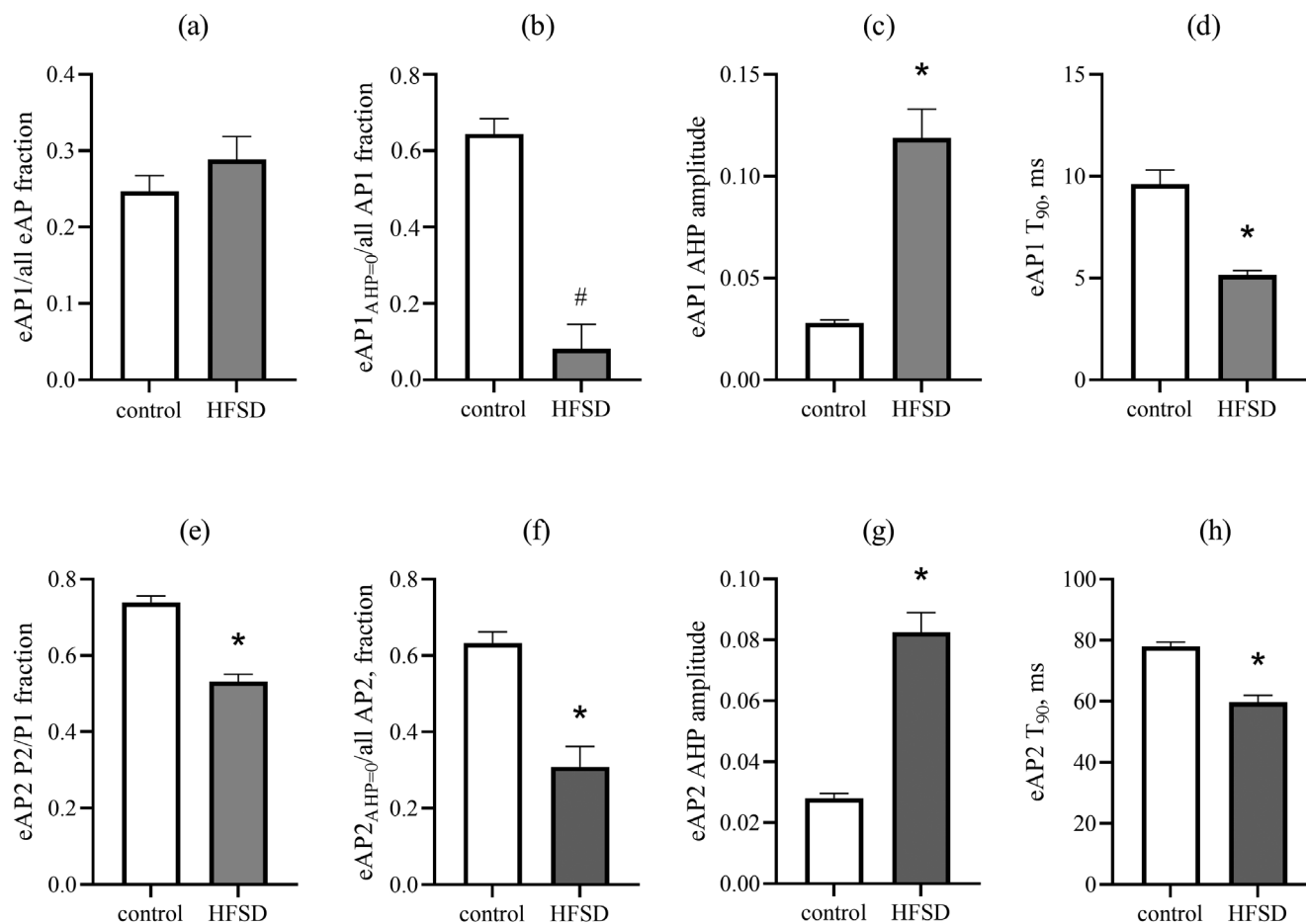


Рис. 2. Усредненные характеристики вПД субэпикарда ЛЖ сердец контрольных (10 сердец, белые столбцы) и ВЖСД (9 сердец, серые столбцы) крыс. (а) – Доля вПД1 (eAP1) по отношению к всем зарегистрированным вПД. (б) – Доля вПД1 без СГ (eAP1_{AHP=0}) по отношению ко всем зарегистрированным вПД1. (с) – Амплитуда СГ вПД1. (д) – T₉₀ вПД1. (е) – соотношение P2/P1 в вПД2 (eAP2). (ф) – Доля вПД2 без СГ (eAP2_{AHP=0}) по отношению ко всем зарегистрированным вПД2. (г) – Амплитуда СГ вПД2. (h) – T₉₀ вПД2. * – *t*-критерий Стьюдента, $p < 0.05$; # – *U*-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$

прерывной записи типичных авторитмических вПД1 субэпикардиальных кардиомиоцитов (а) и примеры развернутых во времени профилей вПД1 и вПД2 (б, с) зарегистрированных в разных участках сердца контрольной крысы. В среднем вПД1 встречались относительно редко ($26 \pm 2.0\%$; 10 сердец). Остальные примерно 75% зарегистрированных сигналов были классифицированы как вПД2. Средние значения T₉₀ вПД1 и вПД2 в ЛЖ контрольных крыс составляли 9.6 ± 0.7 мс и 78.0 ± 1.4 мс соответственно. Примерно 35% как вПД1, так и вПД2 ($35.6 \pm 4\%$ вПД1 и $36.7 \pm 3\%$ вПД2) завершались отчетливо выраженной фазой СГ. Относительные амплитуды этой фазы, как и частота встречаемости СГ, не различались между типами вПД ($2.8 \pm 1\%$ для вПД1 и $2.8 \pm 1\%$ для вПД2). Хотя пиковая амплитуда СГ составляла всего несколько процентов от амплитуды первого негативного пика вПД, эта величина достоверно отличалась от нуля или ба-

зовой линии сигнала. Относительная амплитуда 2-го пика вПД2 контрольных крыс $A_{P2/P1}$ составляла 0.74 ± 0.02 .

Характеристики вПД кардиомиоцитов ВЖСД-крыс. У крыс, содержащихся на ВЖСД, наблюдалось существенное ремоделирование профилей вПД (рис. 2).

Хотя частота встречаемости вПД1 (и, соответственно, частота встречаемости вПД2) не отличалась между контрольными и ВЖСД сердцами (рис. 2а), доля вПД1 без СГ была достоверно снижена (рис. 2б), амплитуда СГ вПД1 достоверно увеличена (рис. 2с) и длительность вПД1 достоверно укорочена (рис. 2д) в сердцах ВЖСД-животных по сравнению с аналогичными параметрами контрольных крыс. Что касается вПД2 сигналов, по сравнению с контролем, в ВЖСД-группе амплитуда второго негативного пика была снижена (рис. 2е) и, как и у вПД1, доля вПД2 без СГ была достоверно

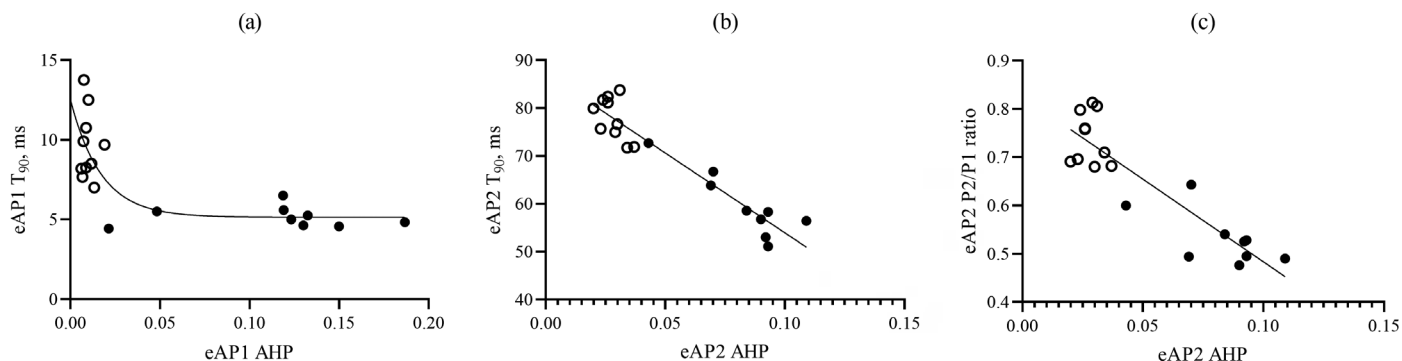


Рис. 3. Взаимоотношения характеристик вПД субэпикарда ЛЖ индивидуальных сердец контрольных (белые символы, $n = 10$) и ВЖСД (черные символы, $n = 9$) крыс. Каждый символ представляет среднюю по всем вПД1 ($n = 4 - 12$) или вПД2 ($n = 14 - 46$) регистрациям данного типа сигнала, осуществленным в данном сердце. (а) — Взаимоотношение между пиковой амплитудой СГ вПД1 (eAP1 ANP) и T_{90} вПД1 (eAP1 T_{90}) сигналов. Линия — примерная линия соответствия. (б) — Взаимоотношение между пиковой амплитудой СГ вПД2 (eAP2 ANP) и T_{90} вПД2 (eAP2 T_{90}) сигналов. Линия — результат регрессионного анализа всех данных (контроль и ВЖСД). Параметры линии регрессии: $y = -333.4 \cdot x + 87.28$; $R^2 = 0.903$. (с) — Взаимоотношение между пиковой амплитудой СГ и P2/P1 (eAP2 P2/P1 ratio) вПД2 сигналов. Линия — результат регрессионного анализа всех данных (контроль и ВЖСД). Параметры линии регрессии: $y = -3.427 \cdot x + 0.8259$; $R^2 = 0.801$.

ниже (рис. 2f), амплитуда СГ достоверно увеличена (рис. 2g) и длительность вПД2 достоверно снижена (рис. 2h).

Результаты регрессионного анализа данных. Регрессионный анализ не выявил строгой связи между амплитудой СГ и T_{90} во всех вПД1 (рис. 3а). Однако выраженные линейные отношения были выявлены между пиковой амплитудой СГ и T_{90} , а также между пиковой амплитудой СГ и величиной соотношения P2/P1 во всех вПД2 регистрациях (рис. 3б, с).

Однако корреляций между параметрами вПД1/вПД2 с другими измеренными характеристиками (глюкоза натошак, случайная глюкозы, площадь ГТТ, масса абдоминального жира) показано не было (данные не приведены).

Влияние локальной доставки апамина на профили вПД. Поскольку в наших предыдущих исследованиях было показано, что при СТЗ-СД1 появление фазы СГ связано с увеличением экспрессии/активности SK-каналов [2], нами было предпринято исследование влияния апамина на кардиомиоциты ЛЖ контрольных и ВЖСД крыс.

Из графиков, представленных на рисунке 4, видно, что длительная (30 мин) регистрация вПД с использованием микропипетки, заполненной РТА, не была связана с существенными изменениями профилей вПД, в которых фаза СГ не была выражена в начале регистрации (рис. 4а, б). Однако профили вПД1 и вПД2, исходно характеризующиеся наличием фазы СГ, демонстрировали прогрессивное подавление этой фазы вплоть до полного ее исчезновения к 30-й минуте регистрации (рис. 4с, д).

Более того, подавление СГ апамином при регистрации (разница между амплитудой СГ в начале и

на 30-й минуте регистрации) линейно зависело от исходной амплитуды СГ как для вПД1, так и для вПД2 сигналов (рис 5а, б). Причем параметры линейной регрессии были очень схожи для этих двух типов сигналов: для вПД1 — $y = -0,8115 \cdot x + 0,001224$ ($R^2 = 0.952$) и для вПД2 — $y = -0,8101 \cdot x - 0,0002779$ ($R^2 = 0.902$).

Применение апамина не приводило к достоверным изменениям параметров вПД в группе контрольных животных (4 крысы). Величина T_{90} вПД1 и относительная амплитуда СГ на начало регистрации (11.19 ± 0.23 мс и 0.7 ± 0.1 % соответственно) и после 30-минутной аппликации апамина (11.47 ± 0.94 мс и 0.4 ± 0.1 % соответственно) достоверно не различались (парный t-критерий Стьюдента, $p > 0.05$). Аналогичные результаты были получены и для вПД2: T_{90} вПД2, относительная амплитуда СГ и отношение P2/P1 на начало (81.98 ± 4.20 мс, 1.2 ± 0.7 % и 0.76 ± 0.11 соответственно) и после 30-минутной аппликации апамина (82.33 ± 3.68 мс, 0.3 ± 0.1 % и 0.71 ± 0.02 соответственно) также достоверно не различались (парный t-критерий Стьюдента, $p > 0.05$).

В среднем в пределах ВЖСД-группы локальная доставка апамина к месту регистрации в течение 30 минут вела к увеличению T_{90} вПД1 на 54% (рис. 6а) и уменьшению относительной амплитуды СГ на 81% (рис. 6б). В тех же экспериментах T_{90} вПД2 также возрастала на 22% (рис. 6с), амплитуда СГ снижалась на 85% (рис. 6д) и соотношение P2/P1 увеличивалось на 42% (от 0.52 ± 0.04 до 0.74 ± 0.04 ; парный t-критерий Стьюдента, $p < 0.05$). Однако анализ индивидуальных измерений, наподобие того, что был приведен на рисунке 5, не выявил суще-

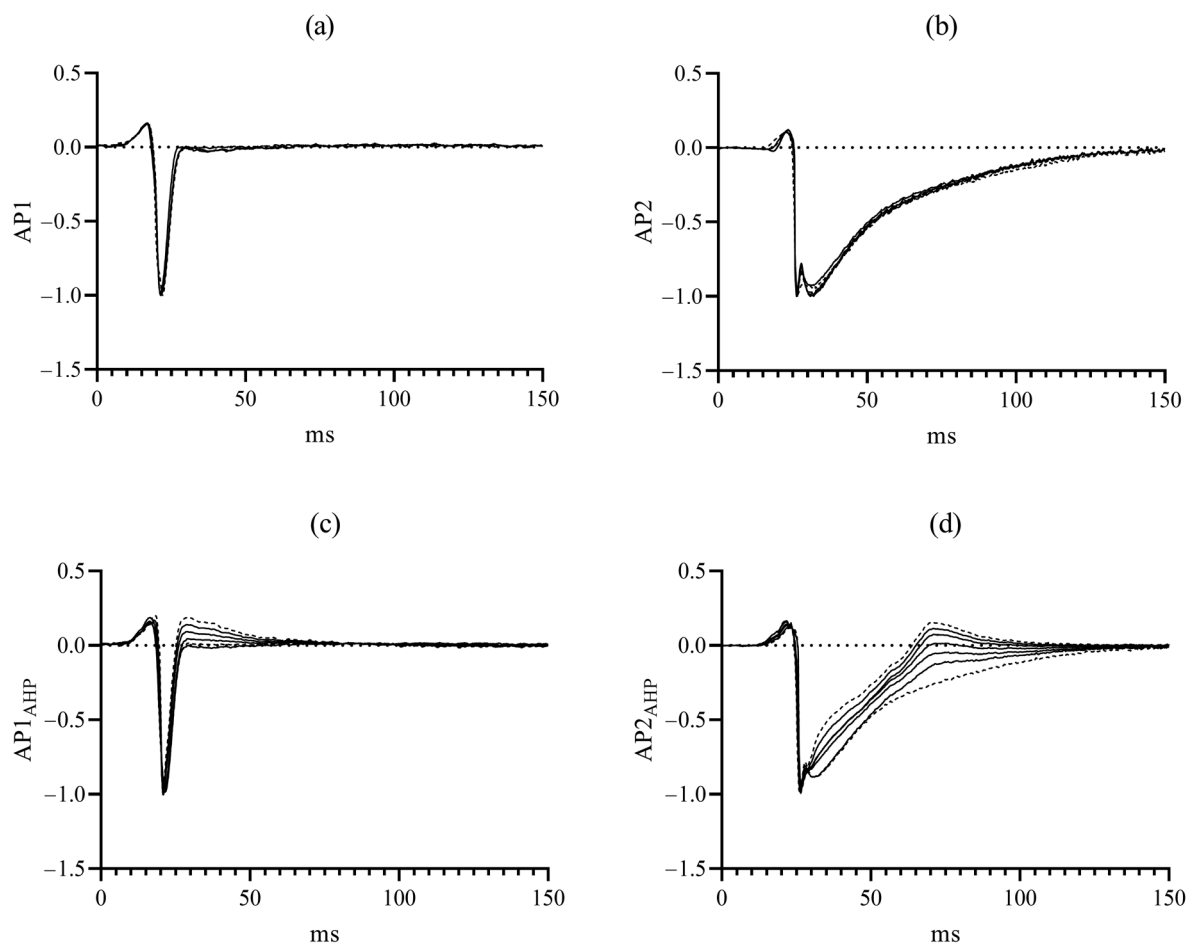


Рис. 4. Примеры изменений профилей нормализованных вПД1 и вПД2, без СГ (а, б) и с выраженной СГ (с, д) во время непрерывной регистрации с использованием микропипетки, содержащей апамин. На каждом из графиков интервал между показанными треками вПД 5-10 мин. Треки сигналов, зарегистрированных сразу после первого контакта пипетки с миоцитом и через 30 мин регистрации, показаны штриховыми линиями.

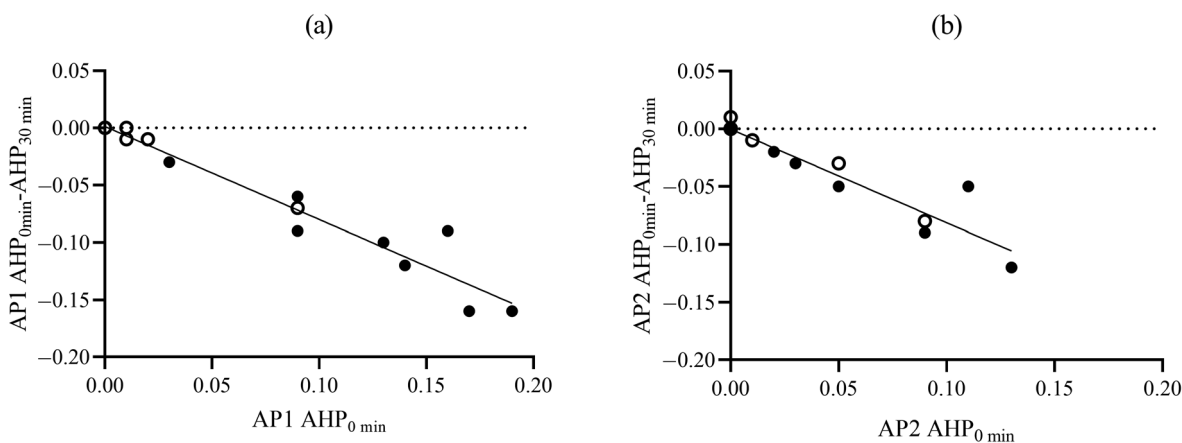


Рис. 5. Подавление СГ вПД1 (а) и вПД2 (б) в течение 30-минутной регистрации микропипеткой с РТА в зависимости от исходной амплитуды СГ регистрируемого сигнала. На рисунках каждый символ представляет индивидуальную регистрацию от кардиомиоцита ЛЖ сердец контрольных (белые символы; (а) – 3 крысы, 9 измерений; (б) – 4 крысы, 12 измерений) или ВЖСД (черные символы; (а) – 3 крысы, 8 измерений; (б) – 4 крысы, 9 измерений) крыс. Сплошные линии – линии регрессии, рассчитанные для всех (контрольных и ВЖСД) данных, представленных на рисунке. Параметры регрессионных линий представлены в тексте.

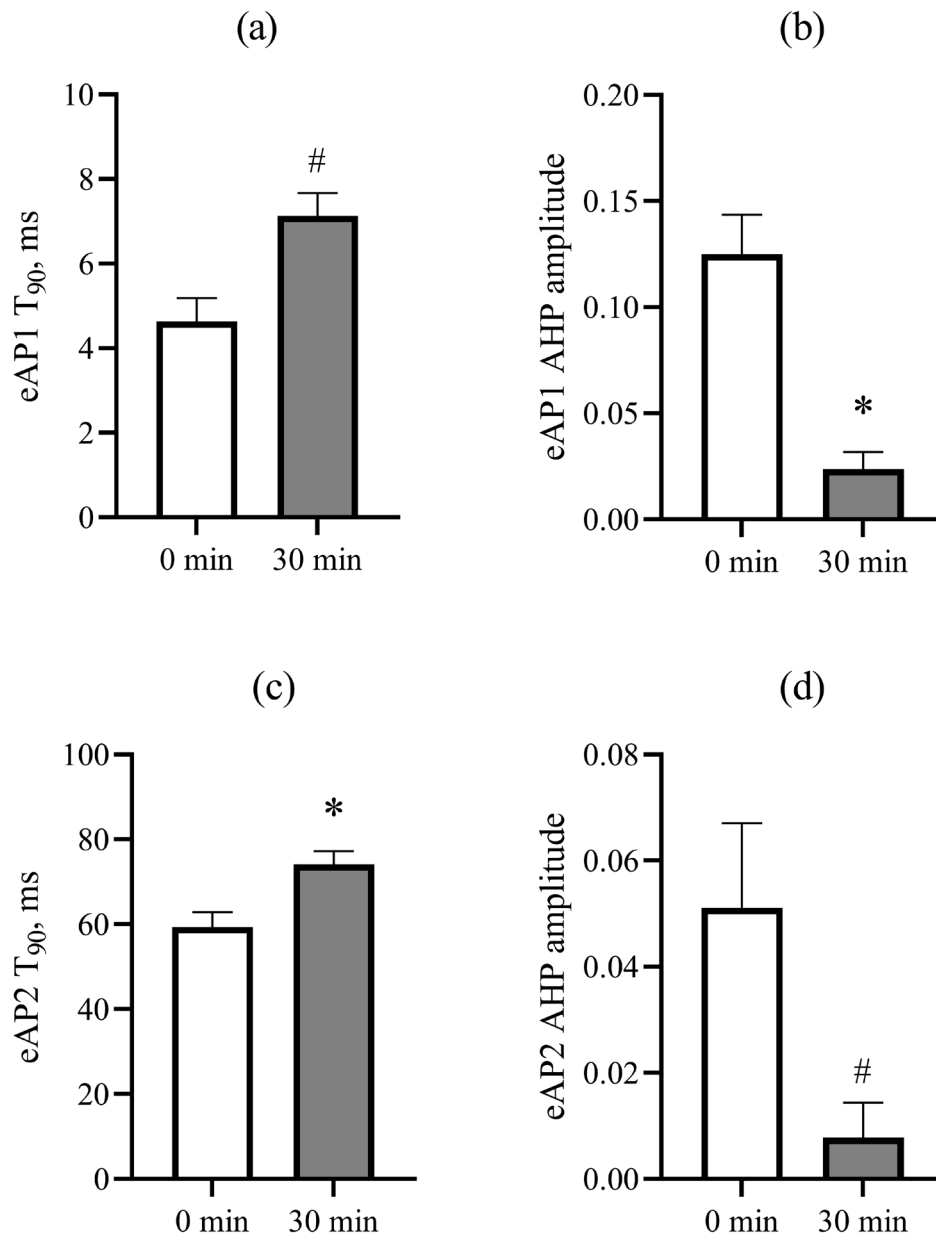


Рис. 6. Параметры ВПД1 и ВПД2 ВЖСД-крыс в начале регистрации и через 30 минут после начала аппликации амина: (а) – T_{90} ВПД1; (б) – амплитуда СГ ВПД1; (с) – T_{90} ВПД2; (д) – амплитуда СГ ВПД2. (а, б) – 3 крысы, 8 измерений; (с, д) – 4 крысы, 9 измерений). * – парный t-критерий Стьюдента, $p < 0.05$; # – парный критерий Уилкоксона, $p < 0.05$.

ственных взаимосвязей между эффектом амина на СГ и T_{90} или величины R2/P1 регистрируемых ВПД1 или ВПД2 (данные не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СД2 и годами предшествующие ему МС и нарушения в метаболизме глюкозы являются наиболее распространенными в мире метаболическими расстройствами и известными факторами риска

аритмии, кардиомиопатии и развития сердечной недостаточности (СН) [13]. Патогенез сердечных осложнений СД2, МС и преддиабета не до конца ясен [13, 14].

Насколько нам известно, данная работа представляет собой первое исследование электрогенеза кардиомиоцитов ЛЖ сердца ВЖСД крыс с помощью внеклеточной регистрации ПД с использованием электродов с узким кончиком. Основным результатом наших исследований является наблю-

дение увеличения размера фазы СГ вПД и увеличение частоты встречаемости вПД с СГ после 10-12 недель ВЖСД. Кроме того, наши данные однозначно указывают на активность SK-каналов как на причину появления/усиления фазы следовой гиперполяризации вПД.

ВЖСД — хорошо апробированная другими исследовательскими группами модель преддиабета/метаболического синдрома [7–10]. Из исследованных в нашей работе характеристик (таблица 1), увеличение уровня глюкозы натощак и случайной глюкозы, а также накопление абдоминального жира однозначно указывают на развитие нарушений в метаболизме глюкозы и жиров у ВЖСД-крыс, что является признаками МС [7].

Как и ранее [11, 15], в этой работе в субэпикардиальных кардиомиоцитах было идентифицировано два основных типа вПД. Ранее были представлены аргументы в пользу того, что вПД1 регистрируется в тех случаях, когда кончик регистрирующего микроэлектрода (при условии его малого размера) оказался помещенным в зону клетки свободную от выходов t-трубочек, характеризующуюся высокой плотностью натриевых каналов (первый и единственный негативный пик) и низкой плотностью кальциевых каналов (отсутствие признаков второго негативного пика). В то же время, наличие под электродом выходов t-трубочек и доступа к Т-системе кардиомиоцита, мембрана которой насыщена Ca^{2+} -каналами, является условием регистрации вПД2 (сигнала с двумя негативными пиками или выраженным изломом на спаде первого пика) [11, 15]. Питание ВЖСД не сопровождалось изменением соотношения вПД1 и вПД2 (рис. 2а), большинство регистрируемых сигналов относилось к классу вПД2, что согласуется с большей вероятностью случайного позиционирования кончика микроэлектрода в участке мембраны с выходом одной или нескольких t-трубочек на поверхность кардиомиоцита и предполагает, что Т-система кардиомиоцитов ВЖСД-крыс не претерпевает существенных структурных изменений. Последнее наблюдение резко контрастирует с тем, что мы наблюдали ранее в экспериментах с сердцами крыс с СТЗ-СД1, где доля вПД2 снижалась [2]. Возможно, это было связано с нарушением регулярности Т-системы кардиомиоцитов при развитии СД1 [16], которое, по всей видимости, не наблюдалось в нашей модели МС. Однако это предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

Как и в нашем предыдущем исследовании на модели СТЗ-СД1 [2], основным эффект ВЖСД на вПД в данном исследовании состоял в увеличении позднего выходящего тока, определяющего амплитуду фазы СГ и, соответственно, профили вПД

(рис. 2). Так, длительность спада и соотношение негативных пиков вПД2 демонстрировало линейную зависимость от амплитуды СГ (рис. 3). В экспериментах с локальной доставкой апамина, блокатора SK-каналов, к сайтам регистрации вПД без СГ (рис. 1, 4а, б) не наблюдались изменения формы сигнала на протяжении 30 минут непрерывной регистрации. Однако при регистрации вПД с СГ в подобных условиях (рис. 4с, д) наблюдались прогрессивные снижение амплитуды СГ и продление спада вПД. Более того, изменение в амплитуде СГ в экспериментах с апамином линейно зависели от исходной амплитуды СГ как для вПД1, так и для вПД2 (рис. 5а, б). Вместе эти данные указывают на SK-каналы как источник тока, определяющего фазу СГ. Несмотря на тесную функциональную взаимосвязь SK-каналов с кальциевыми каналами L-типа и, соответственно связь SK-каналов с Т-системой [17], наши данные (сходство линий регрессии, описывающих зависимости подавления СГ на 30-й минуте регистрации вПД1 и вПД2 от исходной амплитуды СГ (рис. 5а, б) указывают на возможное присутствие данных каналов на поверхностной мембране кардиомиоцитов.

Тем не менее, вопрос о роли увеличения активности/экспрессии SK-каналов в кардиомиоцитах желудочков сердца при СД остается открытым. Насколько нам известно, роль сердечных SK-каналов была исследована только в одной работе на мышинной модели СТЗ-СД1 [18] и в двух работах, использующих крысиные модели СД2 [19, 20]. Однако все эти исследования были ограничены анализом SK-каналов предсердий, в которых активность этих каналов была подавлена. Полученные нами данные предполагают увеличение активности/экспрессии SK-каналов как при СД1 [2], так и при МС (данное исследование), однако эти изменения были диаметрально противоположны имеющимся данным для предсердий. Возможно, это увеличение активности, как было недавно показано в исследованиях сердца кролика, играет защитную функцию, увеличивая реполяризационный резерв клеток миокарда [21]. Хотя в более ранних исследованиях увеличение активности SK-каналов в кардиомиоцитах эпикарда желудочков сердца крыс с острым инфарктом миокарда приводило к развитию желудочковой аритмии сердца [22].

Изменение длительности ПД может быть причиной возникновения аритмий. SK-каналы в норме активируются во время систолической фазы сердечного цикла, когда концентрация Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцита увеличивается. Патологическое удлинение ПД приводит к более значительному повышению концентрации Ca^{2+} и усиливает активацию SK-каналов [23], что помогает сокра-

тить длительность ПД [24]. Этот механизм представляет собой систему отрицательной обратной связи и помогает предотвратить чрезмерное удлинение ПД. Кроме того, спонтанный выброс Ca^{2+} саркоплазматического ретикулума также может активировать SK-каналы [25]. Это ослабляет постдеполяризацию, вызванную спонтанными кальциевыми волнами. Таким образом, повышение активности SK-каналов при сердечных патологиях может иметь антиаритмический эффект [24].

Важно отметить, что применяемый в наших экспериментах BDM может модулировать некоторые ионные токи [26, 27]. Вероятность возможного влияния BDM обсуждалась в нашей ранее опубликованной статье [28]. Если кратко, в проведенных экспериментах BDM добавлялся во все растворы (РТ и РТА), поэтому описанные изменения профилей ВПД в группе ВЖСД-крыс по сравнению с контролем вряд ли могут быть отнесены к неспецифическим эффектам BDM.

В заключение, представленные здесь данные позволяют предположить, что ВЖСД ассоциируется с увеличением активности/экспрессии SK-каналов в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крысы. Подтверждение этого предположения, а также изучение механизмов и выявление функционального значения предполагаемых изменений требует дальнейших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в строгом соответствии с правилами, разработанными и утвержденными локальным этическим комитетом ИЭФБ РАН (Протокол № 1-23/2023 от 24.01.2023), а также согласно правилам и требованиям, предусмотренным директивой 1986 г. Европейского парламента (European Communities Council Directive, 1986) и изложенным в “Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00260).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов, анализ данных и написание манускрипта (И.В.К. и М.Г.Д.), экспериментальная работа (И.В.К., Ю.А.Ф., А.В.С., А.А.П., О.Ю.К.), окончательное редактирование и под-

готовка манускрипта к подаче (И.В.К., Ю.А.Ф., О.Ю.К., А.В.С. и М.Г.Д.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kubasov IV, Chistyakova OV, Sukhov IB, Panov AA, Dobretsov MG (2020) Functional changes in the T-system of cardiomyocytes of the isolated rat heart during development of streptozotocin-induced diabetes. *Russ J Physiol* 106:1266–1277. <https://doi.org/10.31857/s0869813920100052>
2. Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG (2021) Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes. *J Evol Biochem Physiol* 57:1511–1521. <https://doi.org/10.1134/s0022093021060272>
3. Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Sazonova DV, Mokrysheva NG (2023) Diabetes Mellitus in the Russian Federation: Dynamics of Epidemiological Indicators According To the Federal Register of Diabetes Mellitus for the Period 2010–2022. *Diabetes Mellit* 26:104–123. <https://doi.org/10.14341/DM13035>
4. American Diabetes Association (2023) Standards of Care in Diabetes. *Diabetes Care* 46:S1–S291
5. Saklayen MG (2018) The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 20:1–8. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
6. Dobrowolski P, Prejbisz A, Kuryłowicz A, Baska A, Burchardt P, Chlebus K, Dzida G, Jankowski P, Jaroszewicz J, Jaworski P, Kamiński K, Kapłon-Cieślicka A, Kłoczek M, Kukla M, Mamcarz A, Mastalerz-Migas A, Narkiewicz K, Ostrowska L, Śliż D, Tarnowski W, Wolf J, Wyleżoł M, Zdrojewski T, Banach M, Januszewicz A, Bogdański P (2022) Metabolic syndrome – a new definition and management guidelines. *Arch Med Sci* 18:1133–1156. <https://doi.org/10.5114/aoms/152921>
7. Rodríguez-Correa E, González-Pérez I, Clavel-Pérez PI, Contreras-Vargas Y, Carvajal K (2020) Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes* 10:. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>
8. Peris-Sampedro F, Mounib M, Schéle E, Edvardsson CE, Stoltenberg I, Adan RAH, Dickson SL (2019) Impact of Free-Choice Diets High in Fat and Different Sugars on Metabolic Outcome and Anxiety-Like Behavior in Rats. *Obesity* 27:409–419. <https://doi.org/10.1002/oby.22381>
9. Ahmed H, Hannan JL, Apolzan JW, Osikoya O, Cushen SC, Romero SA, Goulopoulou S (2019) A free-choice high-fat, high-sucrose diet induces hyperphagia, obesity, and cardiovascular dysfunction in female cycling and pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 316:R472–R485. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00391.2018>
10. La Fleur SE, Luijendijk MCM, Van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan RAH (2011) A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsive-

- ness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes* 35:595–604.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2010.164>
11. Kubasov IV, Stepanov A, Bobkov D, Radwanski PB, Terpilowski MA, Dobretsov M, Gyorke S (2018) Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. *Front Physiol* 9:1–9.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061>
 12. Kuzmenkov AI, Peigneur S, Nasburg JA, Mineev KS, Nikolaev MV, Pinheiro-Junior EL, Arseniev AS, Wulff H, Tytgat J, Vassilevski AA (2022) Apamin structure and pharmacology revisited. *Front Pharmacol* 13:977440.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.977440>
 13. Seferović PM, Petrie MC, Filippatos GS, Anker SD, Rosano G, Bauersachs J, Paulus WJ, Komajda M, Cosentino F, de Boer RA, Farmakis D, Doehner W, Lambrinou E, Lopatin Y, Piepoli MF, Theodorakis MJ, Wiggers H, Lekakis J, Mebazaa A, Mamas MA, Tschöpe C, Hoes AW, Seferović JP, Logue J, McDonagh T, Riley JP, Milinković I, Polovina M, van Veldhuisen DJ, Lainscak M, Maggioni AP, Ruschitzka F, McMurray JJV (2018) Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 20:853–872.
<https://doi.org/10.1002/ehjhf.1170>
 14. Fontes-Carvalho R, Ladeiras-Lopes R, Bettencourt P, Leite-Moreira A, Azevedo A (2015) Diastolic dysfunction in the diabetic continuum: Association with insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 14:1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12933-014-0168-x>
 15. Kubasov IV, Stepanov AV, Györke S (2017) Action potential heterogeneity as revealed by extracellular microelectrode recording from the surface of the isolated rat heart. *J Evol Biochem Physiol* 53:515–518.
<https://doi.org/10.1134/S0022093017060102>
 16. Kubasov IV, Bobkov DE, Stepanov AV, Sukhov IB, Chistyakova OV, Dobretsov MG (2020) Evaluation of the t-system of rat cardiomyocytes during early stages of streptozotocin-induced diabetes. *Российский Физиологический Журнал Им И М Сеченова* 106:1098–1108.
<https://doi.org/10.31857/s0869813920090046>
 17. Zhang X-D, Thai PN, Lieu DK, Chiamvimonvat N (2021) Cardiac small-conductance calcium-activated potassium channels in health and disease. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 473:477–489.
<https://doi.org/10.1007/s00424-021-02535-0>
 18. Yi F, Ling TY, Lu T, Wang XL, Li J, Claycomb WC, Shen WK, Lee HC (2015) Down-regulation of the small conductance calcium-activated potassium channels in diabetic mouse atria. *J Biol Chem* 290:7016–7026.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607952>
 19. Fu X, Pan Y, Cao Q, Li B, Wang S, Du H, Duan N, Li X (2018) Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 18:1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0805-5>
 20. Liu CH, Hua N, Fu X, Pan YL, Li B, Li XD (2018) Metformin regulates atrial SK2 and SK3 expression through inhibiting the PKC/ERK signaling pathway in type 2 diabetic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 18:1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0950-x>
 21. Kanaporis G, Blatter LA (2023) Activation of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels suppresses Ca^{2+} transient and action potential alternans in ventricular myocytes. *J Physiol* 601:51–67.
<https://doi.org/10.1113/JP283870>
 22. Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, Chen QH (2013) Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 304:118–130.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2011>
 23. Chang P-C, Hsieh Y-C, Hsueh C-H, Weiss JN, Lin S-F, Chen P-S (2013) Apamin induces early afterdepolarizations and torsades de pointes ventricular arrhythmia from failing rabbit ventricles exhibiting secondary rises in intracellular calcium. *Heart Rhythm* 10:1516–1524.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.07.003>
 24. Chang P-C, Chen P-S (2015) SK Channels and Ventricular Arrhythmias in Heart Failure. *Trends Cardiovasc Med* 25:508.
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.01.010>
 25. Terentyev D, Rochira JA, Terentyeva R, Roder K, Koren G, Li W (2014) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release is both necessary and sufficient for SK channel activation in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306:H738–746.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00621.2013>
 26. Coulombe A, Lefevre IA, Deroubaix E, Thuringer D, Coraboeuf E (1990) Effect of 2,3-butanedione 2-monoxime on slow inward and transient outward currents in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22:921–932.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)90123-j](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)90123-j)
 27. Watanabe Y, Iwamoto T, Matsuoka I, Ohkubo S, Ono T, Watano T, Shigekawa M, Kimura J (2001) Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 132:1317.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703926>
 28. Stepanov AV, Dobretsov MG, Filippov YuA, Kubasov IV (2024) Influence of Apamin on the Extracellularly Recorded Action Potentials Profiles of Subepicardial Cardiomyocytes of the Rat Heart in Myocardial Infarction. *J Evol Biochem Physiol* 60:1317–1327.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024040057>

EXTRACELLULAR ACTION POTENTIALS OF VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES IN THE HEART ISOLATED FROM RATS KEPT ON A HIGH-FAT/HIGH-SUCROSE DIET

I. V. Kubasov, A. V. Stepanov[#], Yu. A. Filippov, O. Yu. Karnishkina, A. A. Panov, and M. G. Dobretsov

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

** e-mail: botanik2407@gmail.com*

Rats kept on a high-fat/high-sucrose diet (HFSD) for 10–12 weeks demonstrated the development of hyperglycemia and signs of visceral obesity. Compared to the control, extracellular action potentials (eAP) of subepicardial myocytes of the left ventricle (LV) of HFSD rats characterized by a significantly increased fraction of signals with a pronounced afterhyperpolarization (AHP) phase and an accelerated decline. Local delivery of apamin (a blocker of low-conductivity Ca^{2+} -dependent K^{+} channels (IKCa, SK channels) to the eAP registration site at a concentration of 500 nM in the solution inside the pipette was accompanied by suppression of the AHP phase and prolongation of the eAP decline. The obtained data suggest that HFSD leads to an increase in the expression and/or activity of SK channels and, as a result, to the development of AHP and shortening of eAP in epicardial cardiomyocytes of the LV of the rat heart.

Keywords: rat, cardiomyocyte, high-fat/high-sucrose diet, cardiomyopathy, extracellular action potential, SK channels

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА, ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ НА МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ У КРЫС

© 2024 г. А. А. Нужнова¹, Д. А. Лисенкова¹, А. З. Биджиев²,
А. П. Ивлев³, Е. В. Черниговская³, Е. Д. Бажанова^{3, 4, *}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия;

⁴Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: bажановаe@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2024 г.

После доработки 03.10.2024 г.

Принята к публикации 17.11.2024 г.

Височная эпилепсия — распространенное неврологическое заболевание, которое во многих случаях сопровождается фармакорезистентностью. Современный подход к лечению пациентов с лекарственной устойчивостью включает в себя хирургическое вмешательство, которое не гарантирует полноценное выздоровление. В настоящее время разрабатываются новые противоэпилептические препараты, воздействующие на сигнальные каскады, присущие эпилептогенезу. Для разработки таких препаратов необходимо знание основных механизмов патогенеза эпилепсии. Цель работы — исследовать динамику изменения белков, участвующих в регуляции апоптоза, циркадных ритмов и антиоксидантного ответа в височной коре мозга при длительном киндлинге на модели крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) с наследственной аудиогенной эпилепсией. Динамику изменения белков интереса — p53, CLOCK, Nrf2, p105 — исследовали в височной коре головного мозга (иммуногистохимическое исследование, Вестерн блоттинг). Выявлено, что у контрольных крыс КМ уровень p53 ниже, чем у крыс Вистар. У крыс КМ, подвергшихся киндлингу в течение 21 дня, содержание p53 увеличивается в сравнении с КМ-контролем. Уровень CLOCK оказался понижен в группе КМ контроль по сравнению с отрицательным контролем и повышен у группы КМ после киндлинга 21 день относительно КМ после киндлинга 7 дней. Изменений продукции Nrf2 и p105 обнаружено не было. Полученные данные позволяют предположить, что изменение уровня исследуемых белков у контрольных крыс КМ в сравнении с крысами Вистар генетически обусловлены. Индуцированный эпилептогенез (киндинг) в течение 21 дня приводит к активации p53-зависимого апоптозного пути и возможному десинхронизму — изменению циркадных ритмов. Полученные данные вносят вклад в изучение механизмов височной эпилепсии и требуют дальнейших исследований, связанных с митохондриальным апоптозом и сдвигом цикла сна-бодрствования в патогенезе височной эпилепсии.

Ключевые слова: височная эпилепсия, крысы Крушинского-Молодкиной, аудиогенный киндинг, p53, CLOCK, Nrf2, p105

DOI: 10.31857/S0044452924070067, **EDN:** ККСАНТ

ВВЕДЕНИЕ

Височная эпилепсия (ВЭ) — распространенное неврологическое заболевание, характеризующееся судорожными припадками, вызванными чрезмерной электробиологической активностью нейронов мозга. Очаг этой разновидности заболевания локализуется в лимбической системе (мезиальная височная эпилепсия), неокортексе (латеральная височная эпилепсия) либо содержит смешанный

очаг, характерный для обеих указанных форм [1]. Среди всех пациентов с эпилепсией больные с ВЭ имеют самый высокий процент фармакорезистентной формы [2]. В случае лекарственно устойчивой формы заболевания эпилептогенный очаг удаляют хирургически, однако невозможно предсказать, насколько высок риск повторения припадков после отмены противоэпилептических препаратов вследствие хирургического вмешательства [3].

Очевидно, что проблема поиска новых противоэpileптических препаратов в наши дни особенно актуальна. В дополнение к традиционным методам лечения ВЭ (антиконвульсанты) разрабатываются препараты, основанные на таргетной медицине. Цель такой терапии — воздействовать на сигнальные каскады, способствующие развитию и течению epileптогенеза [4]. В течение epileптогенеза протекает множество клеточных изменений: нейровоспаление, aberrантный нейрогенез, реактивный глиоз, гибель нейронов и т.д. [5, 6].

Одной из причин возникновения epilepsии во взрослом возрасте является лимбический энцефалит, частота судорог повышается при аутоиммунных заболеваниях [7]. Потенциальное участие нейровоспаления в патогенезе epilepsии впервые было замечено на данных клинических испытаний, показывающих противосудорожный эффект от применения противовоспалительных препаратов и стероидов [8]. Повышение цитокинов и хемокинов во время судорожных припадков приводит к активации иммунных клеток, которые усиливают воспалительную реакцию и способствуют повреждению нейронов [9]. Кроме того, гибель возбуждающих или тормозящих нейронов смещает баланс возбуждения-торможения, что может способствовать epileптогенезу [10].

Субъединицы p106 и p65 из семейства факторов транскрипции генов иммунного ответа NF- κ B могут оказывать как провоспалительное, так и противовоспалительное воздействие в зависимости от пути активации. Субъединица p105 может являться репрессором либо активатором генов, в то время как p65 — активатором [11].

Судорожная активность приводит к нейрональной гибели и, далее, к различным нарушениям, в том числе когнитивным [12]. Исследование механизма гибели нейронов после epileптических приступов выявило роль сигнальных путей апоптоза. Апоптоз может протекать по внешнерецепторному и внутреннему пути (митохондриальному либо зависящему от эндоплазматического ретикулаума). Связь митохондриального апоптоза с окислительным стрессом можно проследить через повышение внутриклеточного кальция в митохондриях во время epileптических припадков, что приводит к переизбытку активных форм кислорода (АФК) и последующей активации апоптоза, опосредуемого Caspase-3 [13].

Внешний путь апоптоза может осуществляться за счет взаимодействия рецептора смерти Fas со своим лигандом, что влечет за собой образование липидного рафта, последующую активацию NOX и производство АФК [13, 14]. При этом при небольшом избытке АФК активируется система антиоксидантной защиты, опосредуемая Nrf2.

Имеются также данные о том, что epilepsия влияет на циркадные ритмы. Показано, что судорожные припадки, локализованные в височной доле, имеют наибольшую интенсивность в световом интервале суток [15]. Исследования на модельных животных с хронической височной и иными видами epilepsии регистрируют склонность к припадкам в определенное, но не совпадающее время суток [16]. На данный момент актуальным является предположение о том, что связь между циркадными ритмами и epilepsией имеет двойственный характер: циркадная дисфункция может стимулировать развитие epilepsии и, наоборот, epileптогенез может привести к нарушению циркадных ритмов — десинхронозу [17]. Изучение этой связи может помочь в прогнозировании припадков epileптического генеза и сделать терапию более эффективной.

Циркадные ритмы опосредуются ритмичной экспрессией часовых генов CLOCK, BMAL1, PER и CRY и активностью соответствующих белков. В начале циркадного дня происходит взаимодействие CLOCK:BMAL1. Получившийся димер перемещается из цитоплазмы в ядро и запускает транскрипцию PER и CRY с помощью взаимодействия с промоторами E-box [18]. PER и CRY действуют по механизму отрицательной обратной связи и репрессируют активность лидирующего димера в период циркадной ночи, после чего разрушаются и дают начало новому циркадному циклу [18, 19].

Изменения экспрессии BMAL1, PER и CRY исследовались на животных при epileптическом статусе, индуцированном пилокарпином, и на материале, полученном от пациентов [20, 21]. Менее известно о динамике синтеза CLOCK при epileптогенезе. В пилокарпиновой модели epilepsии зафиксировано уменьшение транскриптов CLOCK при длительном воздействии, но на ранних этапах эксперимента изменений не нашли [21]. При этом потеря CLOCK в корковых возбуждающих нейронах способствует развитию epilepsии [22].

Следует заметить, что PER2 может связываться с отрицательным регулятором транскрипционного фактора p53 MDM2, тем самым индуцируя p53 [23]. P53-зависимый апоптоз активируется при клеточных стрессах различного генеза, в том числе окислительном, опосредуя митохондриальный апоптозный путь. Показано, что гибель клеток при epileптогенезе может быть связана с активацией p53 [24]. Есть предположения о зависимости окислительного стресса и последующего апоптоза от активации p53-зависимых окислительно-восстановительных ферментов [13]. По данным некоторых авторов, p53 также способствует росту и регенерации аксонов [25].

Многие клеточные стимулы способны приводить к индукции p53 и NF- κ B. p53 и p65 ингибируют способность друг друга стимулировать экспрессию генов, и этот процесс контролируется относительными уровнями каждого фактора транскрипции [4]. При высоких клеточных стрессах p53 активирует апоптоз, а при умеренных — запускает Nrf2-зависимый антиоксидантный ответ [26]. При окислительном стрессе Nrf2 диссоциирует от своего отрицательного регулятора, взаимодействует с ARE в промоторной части многих антиоксидантных генов и активирует их транскрипцию.

Nrf2 играет важную роль в эпилептогенезе. У пациентов с височной эпилепсией обнаружена повышенная экспрессия мРНК Nrf2 в ткани гиппокампа, а также увеличение продукции Nrf2 после индукции приступов пилокарпином у лабораторных животных [27]. При введении активатора Nrf2 сульфохлорана наблюдалось снижение гибели нейронов, вызванное эпилептическим статусом [28]. На основе анализа литературных данных можно предположить, что активаторы Nrf2-зависимого антиоксидантного пути могут быть выдвинуты как потенциальные противоэпилептические лекарственные препараты.

Таким образом, целью работы было исследование изменений уровня белков, участвующих в апоптозе, регуляции циркадных ритмов и антиоксидантной защиты при аудиогенном киндлинге длительностью 7 и 21 дней на модели крыс линии Крушинского-Молодкиной, которое включало в себя изучение динамики продукции p53, CLOCK, Nrf2 и p105 в височной доле мозга в зависимости от длительности киндлинга, а также сравнение базового уровня синтеза данных белков у крыс линии КМ в сравнении с крысами линии Вистар.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы

Эксперимент выполняли на крысах линии Крушинского-Молодкиной (КМ), которые являются моделью рефлекторной аудиогенной эпилепсии. Крысы инбредной линии КМ имеют предрасположенность к судорожным припадкам в ответ на звуковую стимуляцию. Данная линия характеризуется развитием тонических судорог максимальной интенсивности практически у всех животных каждого поколения. Индукция судорог приводит к возникновению эпилептического очага в стволовых отделах мозга, однако длительное повторение акустической стимуляции приводит к распространению эпилептической активности на гиппокамп и кору головного мозга животных. Также использованы крысы линии Вистар в качестве отрицательного контроля для выявления генетических особенностей предрасположенности к заболеванию у крыс линии КМ. Животных содержали в стандартных условиях в клетках вивария со свободным доступом к корму и воде.

В эксперименте использованы 29 животных, распределенных в группы по 5–6 крыс в каждой (рис. 1). Для выяснения роли исследуемых белков экспериментальные группы подвергали процедуре аудиогенного киндлинга (9 kHz, 50 dB) в течение 7 и 21 дней. Во время эксперимента производилась видеофиксация. Судороги оценивали по модифицированной шкале Racine, тяжесть судорог составляла 6 баллов. После окончания киндлинга для животных наступал семидневный период покоя, по окончании данного периода проводили necropsy с использованием препарата “Золетил”. Киндлинг в течение 21 дня подразумевает сформировавшуюся лимбическую эпилепсию, в то время как 14-дневный киндлинг ассоциирован с одни-

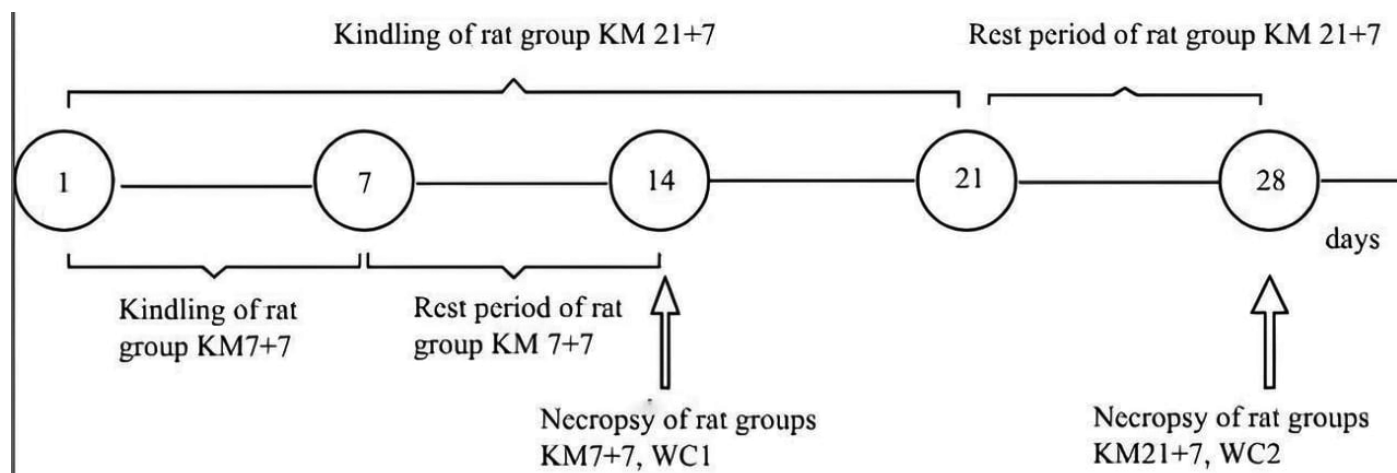


Рис. 1. План эксперимента.

ми из начальных ступеней развития лимбической эпилепсии [30]. Период покоя в течение 7 дней был выбран для исследования отсроченной реакции на длительный киндлинг. В качестве положительно-го контроля выступали интактные крысы линии КМ (KM Control, КМС). Некропсию контрольных крыс КМ проводили параллельно с некропсией экспериментальной группой КМ7+7 (крысы КМ, подвергнутые киндлингу в течение 7 дней + 7 дней покоя). В качестве дополнительного контроля выступали две интактные группы крыс линии Вистар (Wistar Control, WC). Их выводили из эксперимента одновременно с группами КМ 7+7 и КМ 21+7 (крысы КМ, подвергнутые киндлингу в течение 21 дня + 7 дней покоя).

Производили перфузию физраствором, декаптацию и извлечение головного мозга. Мозг разделяли на две половины в сагиттальной плоскости. Из левой половины иссекали кору височной доли для приготовления проб для Вестерн блоттинга (ВБ). Правую половину мозга для иммуногистохимического (ИГХ) анализа фиксировали в 4% параформальдегиде на фосфатном буфере и оставляли на 2 дня при +4°C. После переносили в раствор 20% сахарозы на 5 дней. Затем помещали в емкость с изопентаном, находящуюся в сухом льду, на 1 мин, при -50°C, далее хранили при -80°C. Чередующиеся срезы толщиной 5–6 мкм изготовили на криостате (Leica, Германия) и фиксировали на предметных стеклах для проведения ИГХ. Согласно атласу крысиного мозга [31], интерес представляла амигдало-пириформная трансляционная область (височная кора).

Методы

Иммуногистохимия (ИГХ)

Для оценки экспрессии белков p53, CLOCK, Nrf2, p105 на срезах коры височной доли мозга проводили ИГХ реакции с немечеными поликлональными антителами к p53 (Rabbit, ab131442, Abcam, 1:90), CLOCK (Rabbit, ab3517, Abcam, 1:620), Nrf2 (Rabbit, E-AB-32280, Elabscience, 1:150), p105 (Rabbit, ab32360, Abcam, 1:600), антитела разводили в фосфатно-солевом буфере. Демаскировку антигена проводили с помощью цитратного буфера при pH = 6.0, 90°C – 10 мин, далее стекла оставляли на 15 мин в этом буфере остывать. Блокировку проводили в 2% растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере в течение 1 часа. Срезы оставляли для инкубации с первичными антителами при комнатной температуре на ночь. Сигнал проявляли с помощью биотинилированных вторичных антител (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (IgG (H+L) goat Vector Lab BA1000 LOT U1001, 1:200, антитела разводили в фосфатно-солевом буфере), реагирующих со стрептавидин-пероксидазой (Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive Product Number S 2438 Sigma 1:400), разведенной в

фосфатно-солевом буфере. С целью оценки специфичности окрашивания для каждого белка проводили отрицательный контроль (ИГХ без первичных антител), в результате чего получали отсутствие иммунного окрашивания на срезах. Микрофотографии срезов головного мозга получали на микроскопе PFM (WPI) с цветной камерой Leica DFC300 FX при разрешении 1280×960 пикселе, с последующей денситометрией (программа PhotoM 1.31). Оптическую плотность областей интереса оценивали как интенсивность сигнала относительно малоокрашенных областей в височной коре.

Вестерн блоттинг (ВБ)

Участки височной коры для Вестерн блоттинга гомогенизировали в лизатном буфере (20 mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА), содержащем ингибиторы фосфатазы (Roche, #04 906 837 001) и протеазы (Sigma-Aldrich, #P8340), инкубировали при 4°C 1 ч, после чего центрифугировали при 12000 g. После центрифугирования отбирали получившийся супернатант, добавляли буфер Лэммли с меркаптоэтанолом и инкубировали 10 минут при 95°C. Общее содержание белка определяли методом Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА, #1.4.1.4, Биолот, Санкт-Петербург, Россия) в качестве стандарта. После вертикального электрофореза в 10% полиакриламидном геле (6 мкг белка в лунке) белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану мокрым методом (BioRad, #1620112). Перенос осуществлялся в трансферном буфере, содержащем 25 mM Трис, 192 mM глицин и 20% метанол, при токе 100 мА. Мембраны инкубировали в 3% растворе БСА в TBST буфере (0.1% Твин 20, 0.2 mM Трис, 137 mM NaCl, 20% Tween-20) в течение 1 ч. Затем мембраны инкубировали при 4°C в течение ночи с первичными антителами к CLOCK (ab3517, Abcam, 1: 1000), Nrf2 (E-AB-32280, Elabscience, 1:1000) и Tubulin (CAB-870Mi22, Cloud-Clone Corp 1:1000) при постоянном перемешивании. Затем мембраны инкубировали со вторичными антителами (A0545, Anti-Rabbit IgG, peroxidase antibody produced in goat, Sigma, 1:5000, для Tubulin B8520, Anti-Mouse IgG, Biotin antibody produced in rabbit, Sigma, 1:5000) с последующим использованием реакции хемилюминисцентной детекции пероксидазы с субстратом SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075). Для разведения антител использовали 3% раствор БСА в TBST буфере. Реакцию оценивали с помощью гель-детектирующей системы ChemiDoc MP Imaging System (#12003154, Bio-Rad) с денситометрией блотов в программе "ImageJ". Уровень специфического сигнала для каждого белка нормировали на сигнал тубулина.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического теста Краске-

ла-Уоллиса с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные в статье представлены как медиана и интерквартильное расстояние для каждой группы. Достоверными считали отличия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения уровня p53 у крыс КМ при аудиогенном киндлинге. Иммуногистохимический анализ.

При сравнении данных ИГХ анализа крыс из группы отрицательного контроля ($Q_1 = 0.42$, $Med = 0.46$, $Q_3 = 0.48$, $n = 5$) с крысами из группы положительного контроля обнаружено статистически значимое увеличение уровня p53 у интактных

крыс КМ (рис. 2b, c). Аудиогенный киндлинг в течение 7 дней ($U = 0$, $Q_1 = 0.49$, $Med = 0.56$, $Q_3 = 0.58$, $n = 5$, $p = 0.06$) не повлиял на продукцию p53 у экспериментальных крыс КМ при сопоставлении с контрольными крысами той же линии, однако мы зафиксировали повышенный уровень этого белка у крыс группы КМ21+7 ($U = 0$, $Q_1 = 0.38$, $Med = 0.58$, $Q_3 = 0.68$, $n = 3$, $p = 0.02$) относительно КМС (рис. 2a). При этом достоверных отличий в продукции белка у экспериментальных групп не наблюдали. Измененный уровень p53 у группы КМС относительно ВС можно объяснить генетическими особенностями линии КМ. Увеличение уровня продукции p53 в группе КМ21+7 может быть вызвано активацией p53-зависимого апоптозного пути.

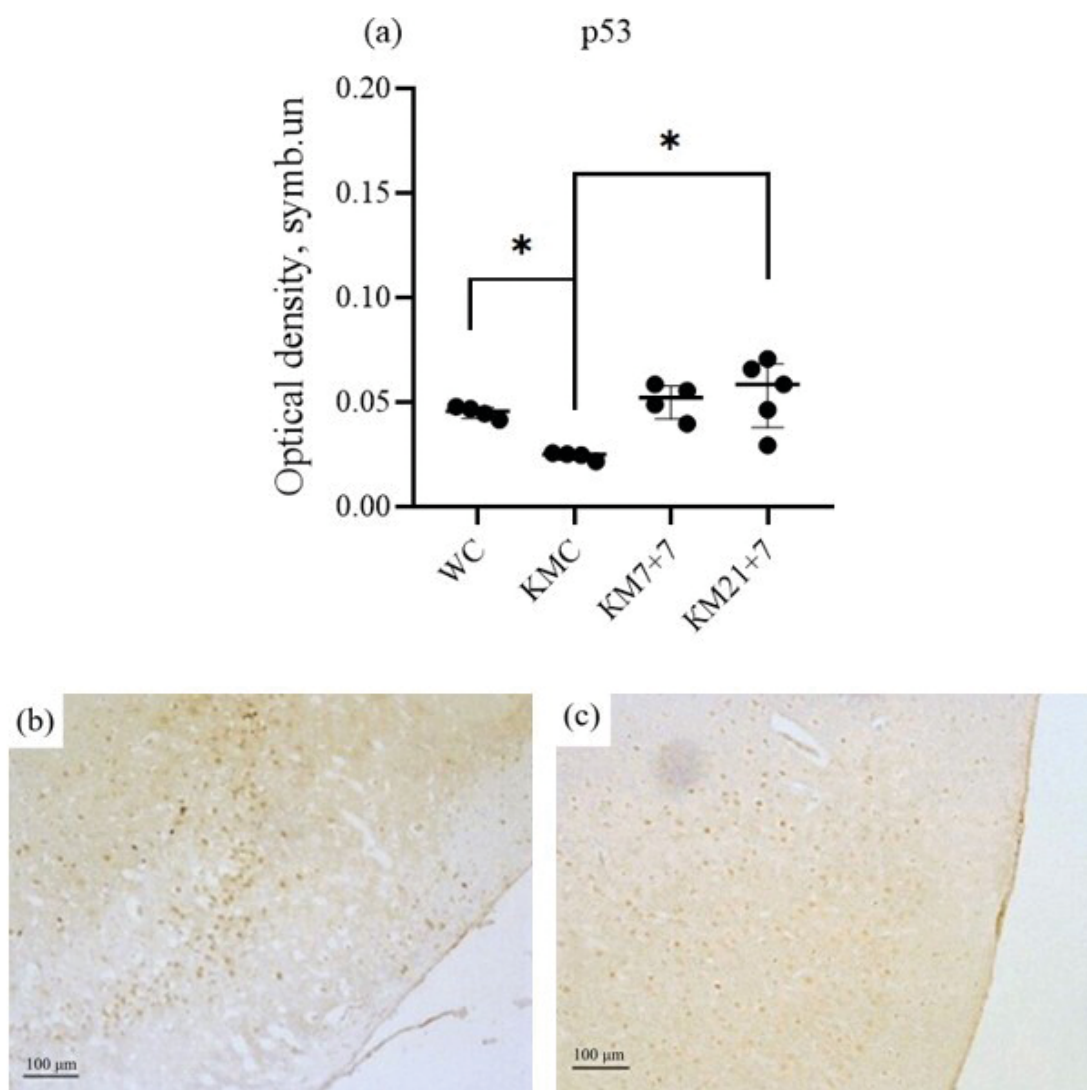


Рис. 2. (a) – Сравнение уровня p53 в коре височной доли мозга у экспериментальных животных (ИГХ); (b) – Кора височной области крысы из группы WC. ИГХ с антителами к p53, x200; (c) – Кора височной области крысы из группы КМС. ИГХ с антителами к p53, x200. WC – контрольная группа крыс линии Вистар, КМС – контрольная группа крыс линии КМ, КМ7+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 7 дней + 7 дней покоя, КМ21+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 21 дня + 7 дней покоя.

Изменения уровня CLOCK у крыс КМ при аудио-генном киндлинге. Иммуногистохимический анализ и Вестерн блоттинг.

Уровень экспрессии CLOCK у контрольных крыс КМ ($Q=0$, $Q_1=0.032$, Med = 0.034, $Q_3=0.043$, $n=4$, $p=0.03$) заметно снижен в сравнении с крысами Вистар ($Q_1=0.06$, Med = 0.07, $Q_3=0.14$, $n=5$, $p=0.03$, рис. 3а). Статистически значимых различий при сравнении КМС и экспериментальных групп КМ7+7 ($U=3$, $Q_1=0.023$, Med = 0.028, $Q_3=0.040$, $n=3$, $p=0.20$) и КМ21+7 не обнаружили (рис. 3б, с, 4). Вестернблоттинг не выявил значимых различий между КМ7+7 и КМ21+7 (рис. 4а), но более тщательный анализ (ИГХ) показал увеличение продукции CLOCK у КМ21+7 относительно КМ7+7 ($U=0$, $p=0.03$, рис. 3а).

Пониженный уровень CLOCK в группе КМС относительно WC может предполагать наличие генетических особенностей линии КМ. Различные уровни этого белка в группах КМ7+7 и КМ21+7 свидетельствуют о развитии десинхроноза.

Изменения уровня Nrf2 у крыс КМ при аудио-генном киндлинге. Иммуногистохимический анализ и Вестерн блоттинг.

При сравнении WC ($Q_1=0.006$, Med = 0.009, $Q_3=0.012$, $n=3$) и КМС ($U=2$, $Q_1=0.012$, Med = 0.019, $Q_3=0.021$, $n=3$, $p=0.90$) мы не нашли статистически значимых различий в продукции Nrf2 (рис. 5а, б, с). Не наблюдалось изменений экспрессии этого белка у экспериментальных групп (КМ 7+7: $U=9$, $Q_1=0.014$, Med = 0.018, $Q_3=0.020$, $n=4$, $p=0.03$, КМ21+7: $U=9$, $Q_1=0.007$,

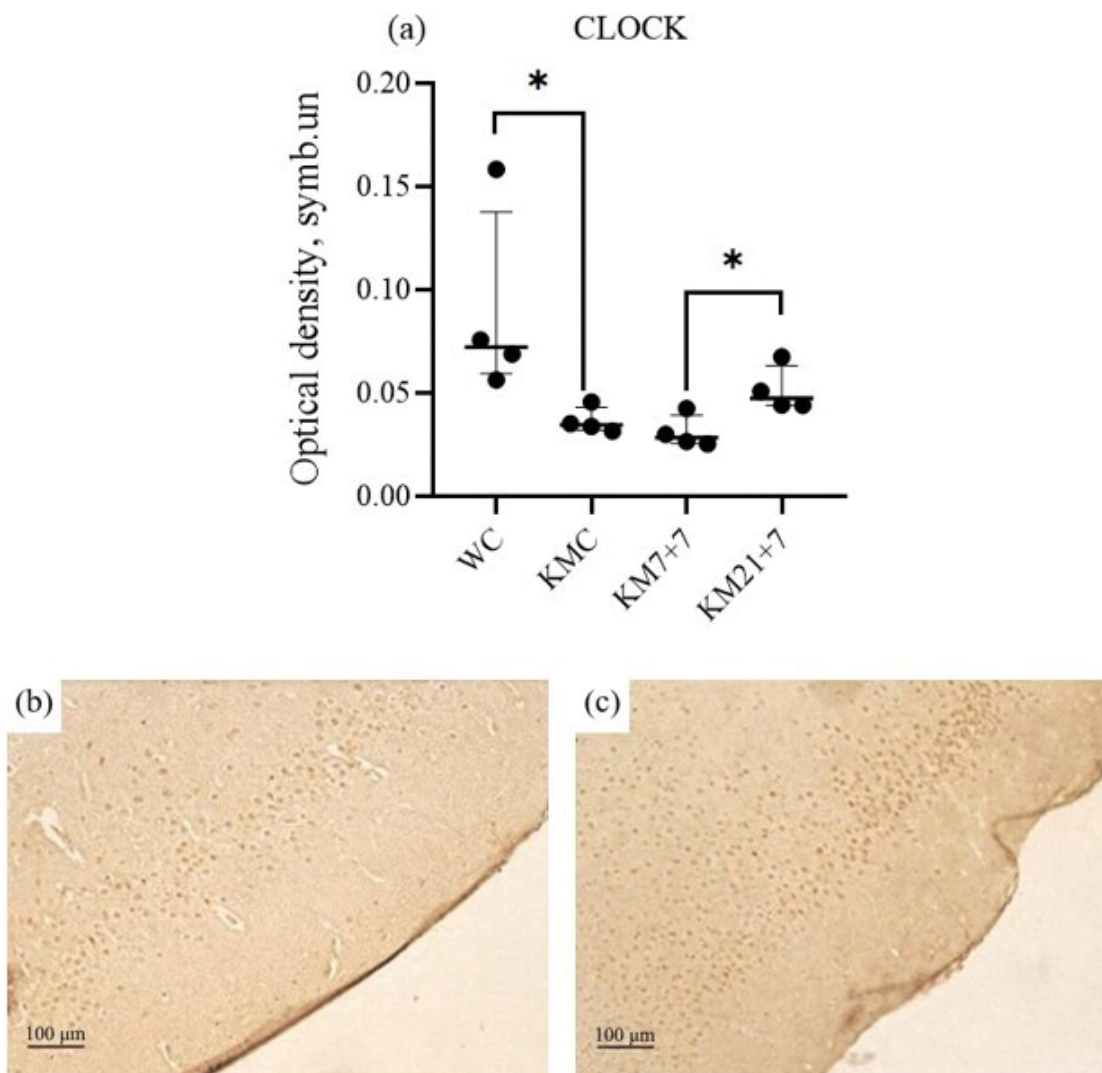


Рис. 3. (а) – Сравнение уровня CLOCK в коре височной доли мозга у экспериментальных животных (ИГХ); (б) – Кора височной области крысы из группы КМС. ИГХ с антителами к CLOCK, $\times 200$; (с) – Кора височной области крысы из группы КМ7+7. ИГХ с антителами к CLOCK, $\times 200$. WC – контрольная группа крыс линии Вистар, КМС – контрольная группа крыс линии КМ, КМ7+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 7 дней + 7 дней покоя, КМ21+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 21 дня + 7 дней покоя.

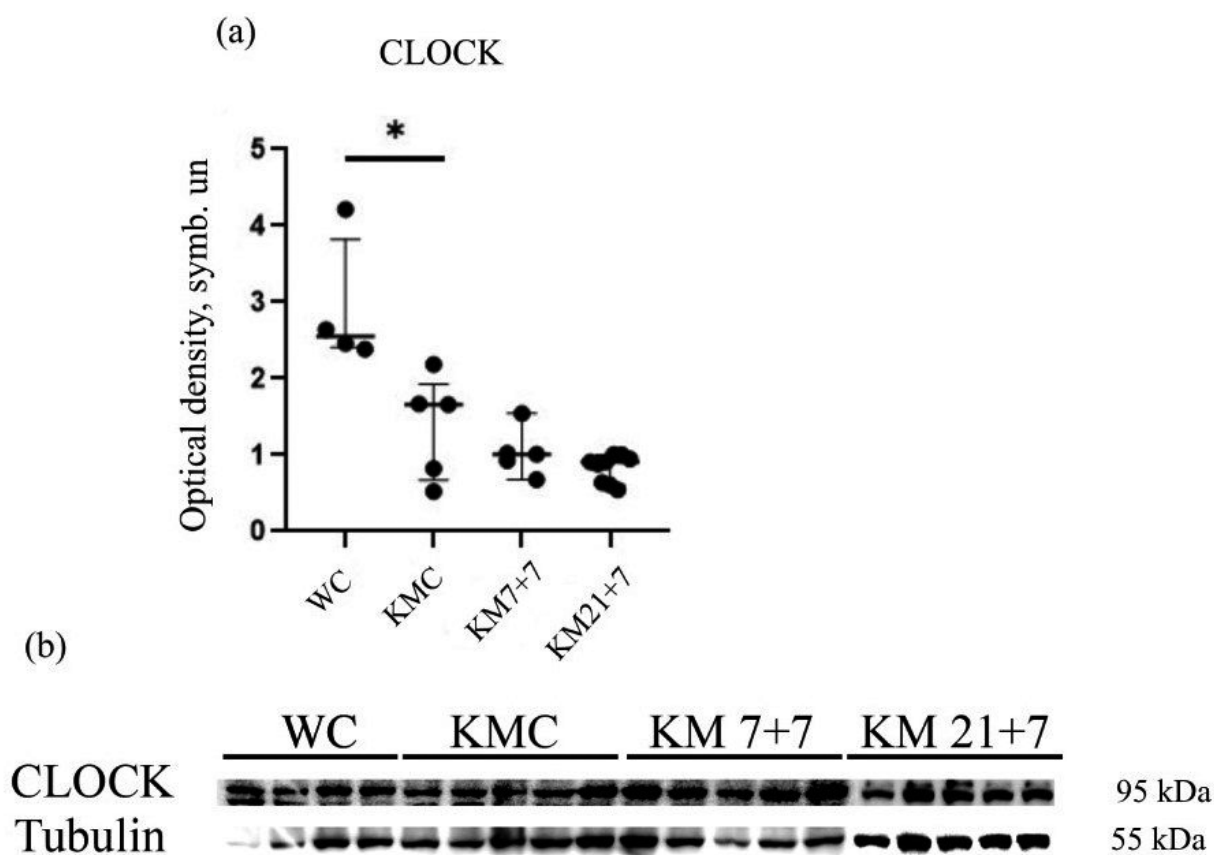


Рис. 4. (а), (b) – Сравнение уровня CLOCK в коре височной доли мозга у экспериментальных животных (ВБ); WC – контрольная группа крыс линии Вистар, КМС – контрольная группа крыс линии КМ, КМ7+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 7 дней + 7 дней покоя, КМ21+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 21 дня + 7 дней покоя.

Med = 0.013, $Q_3 = 0.023$, $n = 4$, $p = 0.61$) в сравнении с положительным контролем (рис. 5а). Отличия в уровнях Nrf2 у групп КМ7+7 и КМ21+7 тоже не были обнаружены (рис. 5а, 6).

Изменение уровня p105 у крыс КМ при аудиогенном киндлинге. Иммуногистохимический анализ.

Сравнение групп крыс WC ($Q_1 = 0.031$, Med = 0.035, $Q_3 = 0.041$, $n = 5$) и КМС ($U = 6$, $Q_1 = 0.025$, Med = 0.032, $Q_3 = 0.037$, $n = 4$, $p = 0.26$) не показало значимых различий в продукции субъединицы p105 белка Nf-kB (рис. 7а). Не обнаружено отличий между контрольной группой крыс КМ и группами КМ21+7 и КМ7+7 (КМ 7+7: $U = 5$, $Q_1 = 0.017$, Med = 0.025, $Q_3 = 0.053$, $n = 3$, $p = 0.8$, КМ21+7: $U = 1$, $Q_1 = 0.042$, Med = 0.07, $Q_3 = 0.142$, $n = 4$, $p = 0.57$). Сравнение экспериментальных групп, подвергшихся киндлингу разной продолжительности (рис. 7а), также не выявило различий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные нами с использованием аудиогенной модели эпилепсии: уменьшение

продукции p53 в коре височной доли у КМС относительно WC и увеличение у группы КМ21+7 в сравнении с КМС – согласуются с данными, полученными на модели химически индуцированной эпилепсии. У крыс, которым вводили пентилентетразол, наблюдался повышенный уровень p53 в СА3 области гиппокампа на протяжении четырех недель, причем экспрессия p53 оставалась без изменений на протяжении эксперимента [31]. Не было показано повышения уровня p53 после 4 дней аудиогенного киндлинга на крысах КМ [4]. Можно предположить, что повышение активности p53-зависимого апоптозного пути происходит вследствие множественных судорожных припадков.

При исследовании биоптатов эпилептогенных тканей, полученных от пациентов при операции, показано, что экспрессия CLOCK в височной ткани снижена [22]. Было продемонстрировано снижение экспрессии CLOCK в эпилептогенной области человека и пониженный порог судорожной активности у мышей с нокаутом гена CLOCK [32], что косвенно подтверждает полученные нами результаты – снижение уровня CLOCK у положи-

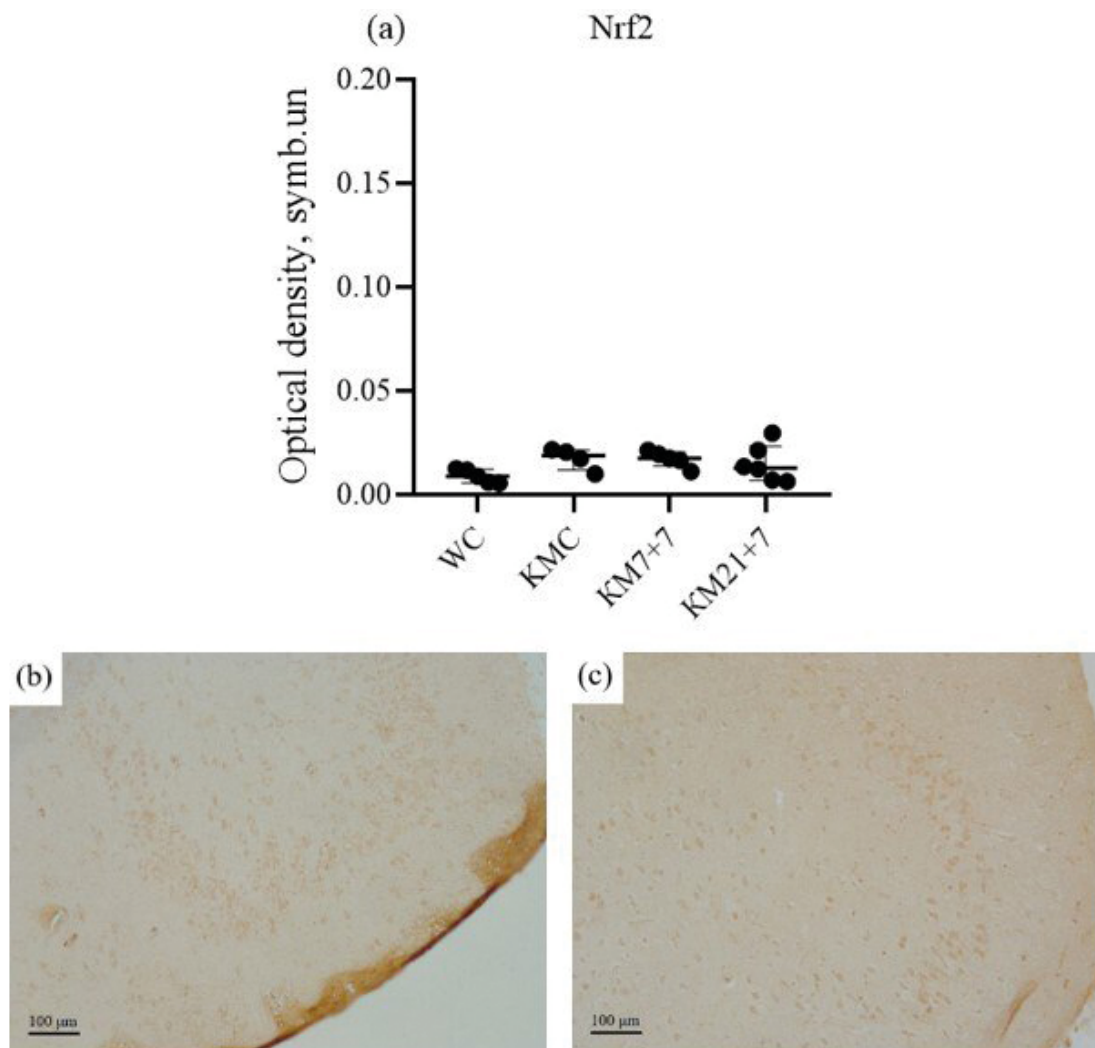


Рис. 5. (a) – Сравнение уровня Nrf2 в коре височной доли мозга у экспериментальных животных (ИГХ); (b) – Кора височной области крысы из группы WC. ИГХ с антителами к Nrf2, x200; (c) – Кора височной области крысы из группы КМС. ИГХ с антителами к Nrf2, x200. WC – контрольная группа крыс линии Вистар, КМС – контрольная группа крыс линии КМ, KM7+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 7 дней + 7 дней покоя, KM21+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 21 дня + 7 дней покоя.

тельного контроля в сравнении с отрицательным и повышение продукции у группы KM21+7 в сравнении с KM7+7. В каинатной модели эпилепсии уровни транскриптов CLOCK в гиппокампе также снижались в эпилептической фазе [20].

Окислительный стресс рассматривается как один из пусковых механизмов развития эпилепсии [33]. Мы изучали изменения антиоксидантного транскрипционного фактора – Nrf2 при индуцированном эндогенном эпилептогенезе у крыс КМ. В нашем исследовании мы не нашли статистически значимых различий в продукции Nrf2 между опытными и контрольными группами. Подобные результаты демонстрируются в других работах: отсутствие изменений уровня Nrf2 через неделю после индуцированного пентитетразолом эпилептическо-

го статуса [34] и на каинатной модели [27]. Значительное увеличение уровня Nrf2 наблюдается в начале эпилептического статуса в нейронах гиппокампа мышей, возможно, как клеточный ответ на действие стрессирующего фактора (киндлинг) [35]. На данный момент также активно исследуется нейропротекторное действие активаторов Nrf2 как потенциальных противозепилептических препаратов.

Предполагается, что нейровоспаление принимает активное участие в эпилептогенезе [7]. Во время эпилептических судорожных припадков происходит повышение уровня цитокинов, хемокинов и других медиаторов воспаления в головном мозге [36]. Мы исследовали экспрессию субъединицы p105 в коре височной доли у крыс КМ при длительном аудиогенном киндлинге. По литературным

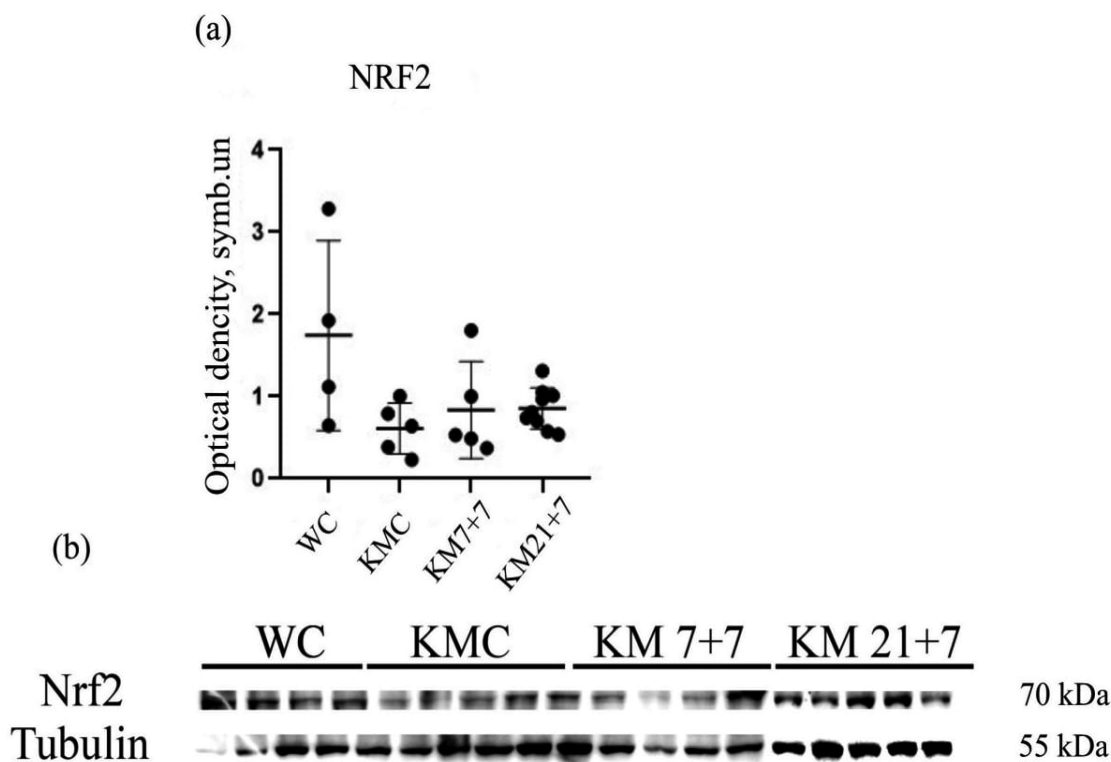


Рис. 6. (а), (b) – Сравнение уровня NRF2 в коре височной доли мозга у экспериментальных животных (ВБ); WC – контрольная группа крыс линии Вистар, KMC – контрольная группа крыс линии KM, KM7+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 7 дней + 7 дней покоя, KM21+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 21 дня + 7 дней покоя.

данным, показано как про-, так и противовоспалительное действие данного белка. Так, содержание фосфорилированной субъединицы p105 в коре головного и белом веществе пациентов с эпилепсией было значительно выше по сравнению с контрольной группой [37]. Sun и соавторы (2002) показали повышение экспрессии Nf-kB в гиппокампе [21]. В наших экспериментах мы не обнаружили изменений экспрессии субъединицы p105 белка Nf-Kb, возможно, в развитии нейровоспаления при эпилептогенезе у крыс линии KM играют роль другие медиаторы воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами было изучено влияние аудиогенного киндлинга длительностью 7 дней и 21 день на экспрессию p53, CLOCK, Nrf2 и субъединицы p105 белка Nf-Kb в коре височной доли мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной. Повышенный уровень p53 у группы KM21+7 в сравнении с контрольной группой той же линии, очевидно, свидетельствует об активации p53-зависимого апоптозного пути после 21 дня аудиогенного киндлинга. Повторяющиеся эпилептические припадки, возможно, способствуют смещению циркадных ритмов (увели-

ченный уровень экспрессии CLOCK у KM21+7 относительно KM7+7) и приводят к десинхронозу. Мы не обнаружили изменения количества Nrf2, участвующего в регуляции антиоксидантных процессов, как и субъединицы p105 транскрипционного фактора Nf-Kb, регулирующего воспаление.

Сниженный уровень экспрессии CLOCK и p53 в височной доле интактных крыс Крушинского-Молодкиной по сравнению с крысами линии Вистар может свидетельствовать о генетической предрасположенности животных к судорожным припадкам.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием животных проводились согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (№ 123 01/01/1991), используемых для экспериментальных и других научных целей, и были одобрены этической комиссией Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Д.Б., Е.В.Ч., А.З.Б., А.П.И.), сбор данных (Е.Д.Б., А.З.Б., А.П.И., Е.В.Ч., А.А.Н., Д.А.Л.), обработка данных (Е.Д.Б., А.З.Б., А.П.И., А.А.Н., Д.А.Л.), написание и редактирование манускрипта (Е.Д.Б., Е.В.Ч., А.З.Б., А.А.Н., Д.А.Л.).

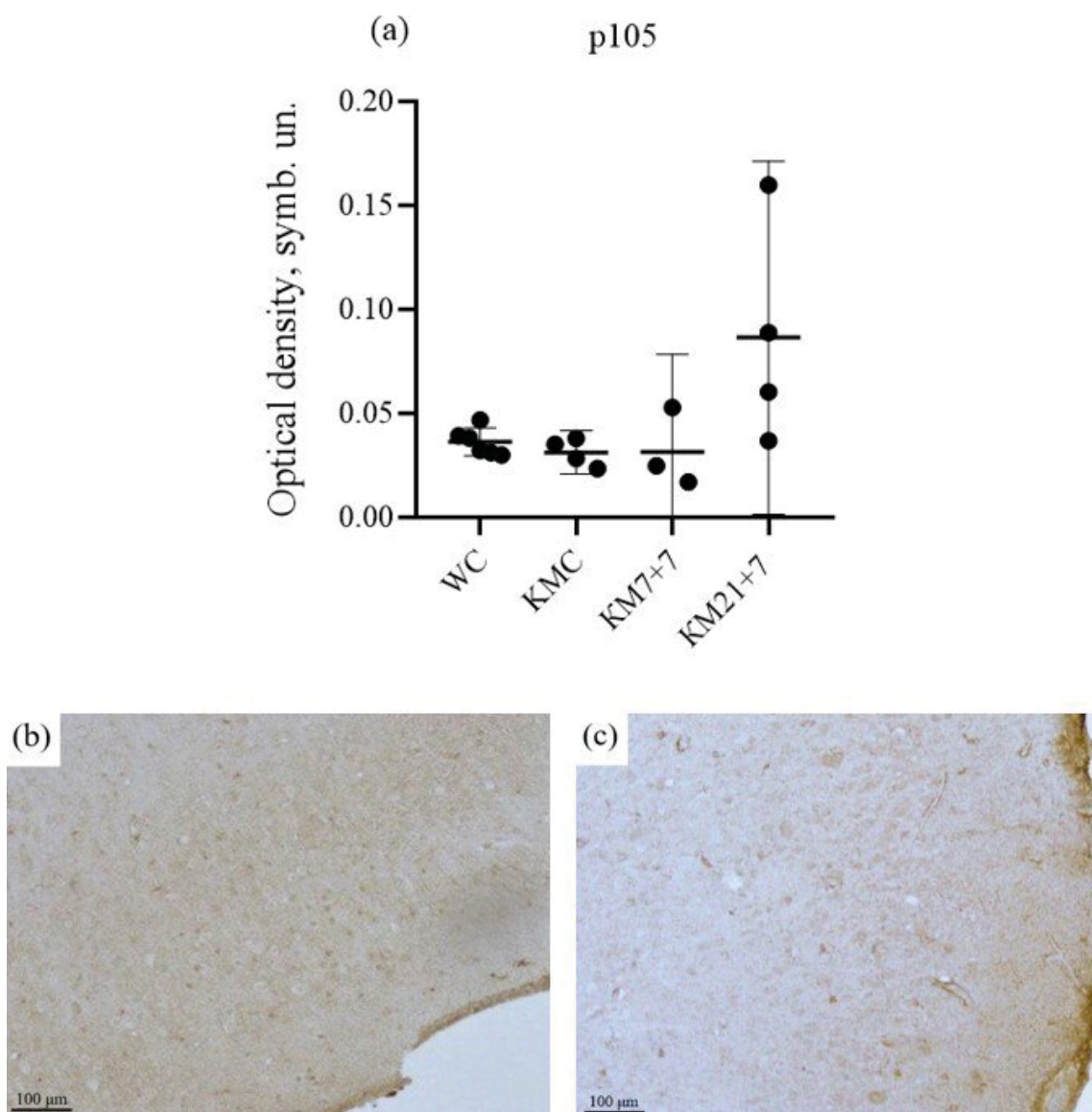


Рис. 7. (a) – Сравнение уровня p105 в коре височной доли мозга у экспериментальных животных (ИГХ); (b) – Кора височной области крысы из группы WC. ИГХ с антителами к p105, x200; (c) – Кора области крысы из группы KM7+7. ИГХ с антителами к p105, x200. WC – контрольная группа крыс линии Вистар, КМС – контрольная группа крыс линии KM, KM7+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 7 дней + 7 дней покоя, KM21+7 – экспериментальная группа крыс, с которыми производили киндлинг в течение 21 дня + 7 дней покоя.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена в соответствии с тематическим планом прикладных научно-исследовательских работ по Гос.заданию ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России и при поддержке Гос.задания ИЭФБ РАН 075-00264-24-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Костиной Марине Игоревне за консультации по обработке экспериментальных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakashita K, Akiyama Y, Hirano T, Sasagawa A, Arihara M, Kuribara T, Ochi S, Enatsu R, Mikami T, Mikuni N (2023) Deep learning for the diagnosis of mesial temporal lobe epilepsy. PLoS One 18(2): e0282082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282082>
2. Tran VD, Nguyen BT, Van Dong H, Nguyen TA, Nguyen PX, Van Vu H, Chu HT (2023) Microsurgery for drug resistance epilepsy due to temporal lobe lesions in a resource limited condition: a cross-sectional study. Annals of Medicine & Surgery 85(8):3852–3857. <https://doi.org/10.1097/ms9.0000000000001021>
3. Ahmad S, Khanna R, Sani S (2020) Surgical Treatments of Epilepsy. Semin Neurol 40(6):696–707. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1719072>

4. Куликов АА, Наслузова ЕВ, Дорофеева НА, Глазова МВ, Лаврова ЕА, Черниговская ЕВ (2021) Пифитрин-альфа тормозит дифференцировку вновь образованных клеток субгранулярной зоны зубчатой извилины у крыс линии Крушинского—Молодкиной при аудиогенном киндлинге. Росс физиол журн им И М Сеченова 107:332–351. [Kulikov AA, Nasluzova EV, Dorofeeva NA, Glazova MV, Lavrova EA, Chernigovskaya EV (2021) Pifitrin-alpha inhibits the differentiation of newly formed cells of the subgranular zone of the dentate gyrus in the Krushinsky—Molodkina rat strain during audiogenic kindling. Ross Physiol J I M Sechenov 107:332–351. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813921030079>
5. Cho KO, Lybrand ZR, Ito N, Brulet R, Tafacory F, Zhang L, Good L, Ure K, Kernie SG, Birnbaum SG, Scharfman HE, Eisch AJ, Hsieh J (2015) Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. Nat Commun 6: 6606. <https://doi.org/10.1038/ncomms7606>
6. Litovchenko AV, Zabrodsкая YuM, Sitovskaya DA, Khuzhakhmetova LK, Nezdorovina VG, Bazhanova ED (2021) Markers of Neuroinflammation and Apoptosis in the Temporal Lobe of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. J Evol Biochem Physiol 57: 1040–1049. <https://doi.org/10.1134/s0022093021050069>
7. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T (2019) Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. Nat Rev Neurol 15 (8):459–472. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x>.
8. Feng J, Feng L, Zhang G (2018) Mitochondrial damage in hippocampal neurons of rats with epileptic protein expression of fas and caspase-3. Exp Ther Med 16(3): 2483–2489. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6439>
9. Rana A, Musto AE (2018) The role of inflammation in the development of epilepsy. J Neuroinflammation 15
10. Sokolova TV, Zabrodsкая YM, Paramonova NM, Dobrogorskaya LN, Kuralbaev AK, Kasumov VR, Sitovskaya DA (2018) Apoptosis of Brain Cells in Epileptic Focus at Phamacoresistant Temporal Lobe Epilepsy. Translational Medicine 4:22–33. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2017-4-6-22-33>
11. Sokolova T V, Zabrodsкая YM, Litovchenko A V, Paramonova NM, Kasumov VR, Kravtsova S.V., Skiteva EN, Sitovskaya DA, Bazhanova ED (2022) Relationship between Neuroglial Apoptosis and Neuroinflammation in the Epileptic Focus of the Brain and in the Blood of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. Int J Mol Sci 23:12561. <https://doi.org/10.3390/ijms232012561>
12. Dingledine R, Varvel NH, Dudek FE (2014) When and How Do Seizures Kill Neurons, and Is Cell Death Relevant to Epileptogenesis? Adv Exp Med Biol. 813: 109–122. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8914-1_9
13. Mao XY, Zhou HH, Jin WL (2019) Redox-related neuronal death and crosstalk as drug targets: Focus on epilepsy. Front Neurosci 13:512. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00512>
14. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA (2016) Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1863 (12):2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
15. Smyk MK, van Luijckelaar G (2020) Circadian Rhythms and Epilepsy: A Suitable Case for Absence Epilepsy. Front Neurol Apr 28;11:245. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00245>
16. Xu C, Yu J, Ruan Y, Wang Y, Chen Z (2020) Decoding Circadian Rhythm and Epileptic Activities: Clues From Animal Studies. Front Neurol 11:751. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00751>
17. Bazhanova ED (2022) Desynchronosis: Types, Main Mechanisms, Role in the Pathogenesis of Epilepsy and Other Diseases: A Literature Review. Life 12(8):1218. <https://doi.org/10.3390/life12081218>
18. Cox KH, Takahashi JS (2019) Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. J Mol Endocrinol 63(4): R93–R102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>
19. Jin B, Aung T, Geng Y, Wang S (2020) Epilepsy and Its Interaction With Sleep and Circadian Rhythm. Front Neurol 11:327. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00327>
20. Matos H de C, Koike BDV, Pereira W dos S, de Andrade TG, Castro OW, Duzzioni M, Kodali M, Leite JP, Shetty AK, Gitai DLG (2018) Rhythms of core clock genes and spontaneous locomotor activity in post-status Epilepticus model of mesial temporal lobe epilepsy. Front Neurol 9: 632. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00632>
21. Wu H, Liu Y, Liu L, Meng Q, Du C, Li K, Dong S, Zhang Y, Li H, Zhang H (2021) Decreased expression of the clock gene Bmal1 is involved in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. Mol Brain 14(1): 113. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00824-4>
22. Li P, Fu X, Smith NA, Ziobro J, Curiel J, Tenga MJ, Martin B, Freedman S, Cea-Del Rio CA, Oboti L, Tsuchida TN, Oluigbo C, Yaun A, Magge SN, O'Neill B, Kao A, Zelleke TG, Depositario-Cabacar DT, Ghimbovski S, Knoblach S, Ho CY, Corbin JG, Goodkin HP, Vicini S, Huntsman MM, Gaillard WD, Valdez G, Liu JS (2017) Loss of CLOCK Results in Dysfunction of Brain Circuits Underlying Focal Epilepsy. Neuron 96: (2): 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.044>
23. Gotoh T, Vila-Caballer M, Santos CS, Liu J, Yang J, Finkielstein CV (2014) The circadian factor Period 2 modulates p53 stability and transcriptional activity in unstressed cells. Mol Biol Cell 25(19): 3081–3093. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-05-0993>
24. Burla R, Torre ML, Zanetti G, Bastianelli A, Merigliano C, Del Giudice S, Vercelli A, Di Cunto F, Boido M, Verni F, Saggoi I (2018) p53-Sensitive Epileptic Behavior and Inflammation in Ft1 Hypomorphic Mice. Front Genet. 9:581. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00581>
25. Gönenç A, Kara H (2023). Netrin-1 ve Reseptörlerinin Çeşitli Kanserlerdeki Rolü. Hacettepe Univ J Facult Pharm 43(4): 352–363. <https://doi.org/10.52794/hujpharm.1327025>

26. *Chen W, Jiang T, Wang H, Tao S, Lau A, Fang D, Zhang DD* (2012) Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death? *Antioxid Redox Signal* 17(12):1670–1675.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4674>
27. *Sandouka S, Saadi A, Singh PK, Olowe R, Shekh-Ahmad T* (2023) Nrf2 is predominantly expressed in hippocampal neurons in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Cell Biosci* 13: 3.
<https://doi.org/10.1186/s13578-022-00951-y>
28. *Sandouka S, Shekh-Ahmad T* (2021) Induction of the nrf2 pathway by sulforaphane is neuroprotective in a rat temporal lobe epilepsy model. *Antioxidants* 10(11): 1702.
<https://doi.org/10.3390/antiox10111702>
29. *Ding DX, Tian FF, Guo JL, Li K, He JX, Song MY, Li L, Huang X* (2014) Dynamic expression patterns of ATF3 and p53 in the hippocampus of a pentylentetrazole-induced kindling model. *Mol Med Rep* 10(2): 645–651.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2256>
30. *Kulikov AA, Naumova AA, Aleksandrova EP, Glazova MV, Chernigovskaya A* (2021) Audiogenic kindling stimulates aberrant neurogenesis, synaptopodin expression, and mossy fiber sprouting in the hippocampus of rats genetically prone to audiogenic seizures. *Epilepsy & Behavior* 10:
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108445>
31. *Paxinos G, Watson C* (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 240.
32. *Re CJ, Batterman AI, Gerstner JR, Buono RJ, Ferraro TN* (2020) The Molecular Genetic Interaction Between Circadian Rhythms and Susceptibility to Seizures and Epilepsy. *Front Neurol* 11.
33. *Borowicz-Reutt KK, Czuczwar SJ* (2020) Role of oxidative stress in epileptogenesis and potential implications for therapy. *Pharmacological Reports* 72(5):1218–1226.
<https://doi.org/10.1007/s43440-020-00143-w>
34. *Sandouka S, Saadi A, Olowe R, Singh PK, Shekh-Ahmad T* (2023) Nrf2 is expressed more extensively in neurons than in astrocytes following an acute epileptic seizure in rats. *J Neurochem* 165(4): 550–562.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15786>
35. *Mazzuferi M, Kumar G, Van Eyll J, Danis B, Foerch P, Kaminski RM* (2013) Nrf2 defense pathway: Experimental evidence for its protective role in epilepsy. *Ann Neurol* 74(4): 560–568.
<https://doi.org/10.1002/ana.23940>
36. *Bazhanova ED, Kozlov AA, Litovchenko AV* (2021) Mechanisms of Drug Resistance in the Pathogenesis of Epilepsy: Role of Neuroinflammation. A Literature Review. *Brain Sci* 11:663.
<https://doi.org/10.3390/brainsci11050663>
37. *Sun Z, Andersson R* (2002) NF- κ B activation and inhibition: A review. *Shock* 18(2):99–106.
<https://doi.org/10.1097/00024382-200208000-00001>

DYNAMICS OF CHANGES IN MARKERS OF APOPTOSIS, CIRCADIAN RHYTHMS AND ANTIOXIDANT PROCESSES IN THE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY IN RATS

A. A. Nuzhnova^a, D. A. Lisenkova^a, A. Z. Bidzhiev^b, A. P. Ivlev^c,
E. V. Chernigovskaya^c, and E. D. Bazhanova^{c, d, #}

^a*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

^b*Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia*

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

^d*Golikov Research Center of Toxicology, Saint Petersburg, Russia*

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

Temporal lobe epilepsy is a common neurological disorder that in many cases is accompanied by drug resistance. The current approach to the treatment of patients with drug resistance includes surgical intervention, which does not guarantee full recovery. At present, new antiepileptic drugs that affect signaling cascades inherent in epileptogenesis are being developed. The development of such drugs requires knowledge of the basic mechanisms of epilepsy pathogenesis. The aim of the work was to investigate the dynamics of expression of proteins involved in the regulation of apoptosis, circadian rhythms and antioxidant response in the temporal cortex of the brain during prolonged kindling in the Krushinsky-Molodkina (KM) rat model with hereditary audiogenic epilepsy. The dynamics of expression of studied proteins – p53, CLOCK, Nrf2, p105 – was investigated in the temporal cortex (immunohistochemistry, Western blotting). It was found that p53 level was lower in KM control rats than in Wistar rats. In KM rats subjected to 21 days kindling, p53 content is increased compared to KM control. CLOCK level was downregulated in the KM control group compared to the negative control and elevated in the KM group after kindling 21 days relative to the KM group after 7 days kindling. No changes in Nrf2 and p105 production were detected. The data obtained suggest that the changes in the levels of the studied proteins in control KM rats compared to Wistar rats are genetically determined. Induced epileptogenesis (kindling) for 21 days leads to activation of p53-dependent apoptosis pathway and, possibly, to desynchronization – change of circadian rhythms. The findings contribute to the study of temporal lobe epilepsy mechanisms and require further studies related to mitochondrial apoptosis and sleep-wake cycle shift in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy.

Keywords: temporal lobe epilepsy, Krushinsky-Molodkina rats, audiogenic kindling, p53, CLOCK, Nrf2, p105

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУННОГО ОТВЕТА, КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ВОСПРИИМЧИВОСТИ К БАКТЕРИЯМ *BACILLUS THURINGIENSIS* У КОЛОРАДСКОГО ЖУКА *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*

© 2024 г. Д. С. Терещенко¹, Е. В. Гризанова¹, Е. В. Шелихова¹,
Т. Ю. Аликина², М. Р. Кабилов², И. М. Дубовский^{1, *}

¹Новосибирский государственный аграрный университет, Кафедра защиты растений, Новосибирск, Россия.

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия.

*e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.10.2024 г.

После доработки 13.11.2024 г.

Принята к публикации 18.11.2024 г.

Биологические инсектициды для защиты растений на основе бактерий *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) обладают высокой специфичностью действия по отношению к различным отрядам насекомых и безопасны для окружающей среды. Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*) самый распространенный вредитель пасленовых культур в мире. Широкий ареал обитания колорадского жука в различных по климатическим условиям регионах, быстрое формирование устойчивости к широкому спектру химических инсектицидов, ставит вопрос за счет каких защитных реакций он обладает такой экологической пластичностью и насколько быстро формирует устойчивость к биологическим инсектицидам. В данном исследовании у личинок колорадского жука из двух районов Новосибирской области (НСО) изучены показатели клеточного и гуморального иммунитета, активность ферментов антиоксидантной и детоксифицирующей систем, микробиота кишечника и восприимчивость к бактериям *B. thuringiensis*. Общее количество гемоцитов и лизоцим-подобная антибактериальная активность в гемолимфе у насекомых Венгеровского района НСО в 1,5–2 раза выше по сравнению с личинками Ордынского района НСО. В кишечнике и жировом теле у личинок из Ордынского района отмечена повышенная в 1.7–2.5 раза активность ферментов детоксикации по сравнению с Венгеровской группой насекомых. Показано, что доминирующей группой кишечной микробиоты насекомых из двух районов НСО являются бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и *Citrobacter*, однако у личинок из Ордынского района одной из мажорных групп являются бактерии рода *Spiroplasma*. Установлено, что насекомые не отличались по уровню чувствительности к бактериям *B. thuringiensis*. Развитие бактериальной инфекции приводит к увеличению активности ФО в гемолимфе насекомых в 2–3 раза, при этом у группы насекомых Ордынского района НСО зарегистрирован 1.5–кратное увеличение общего количества гемоцитов. Таким образом, установлено, что насекомые разных географических популяций могут эффективно перестраивать защитную стратегию от энтомопатогенов, за счет баланса между их конституциональными и индуцированными системами резистентности.

Ключевые слова: резистентность, фенолоксидаза, гемоциты, энтомопатогены, кишечный иммунитет, метабаркодинг, ген 16S рРНК

DOI: 10.31857/S0044452924070079, EDN: KJZNRG

ВВЕДЕНИЕ

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*) — один из самых распространенных и опасных вредителей сельскохозяйственных культур семейства пасленовых [1]. Вредоносность данного вида объясняется значительной экологической пластичностью, что позволяет ему адаптироваться к изменениям условий среды обитания [2, 3]. Основным методом контроля численности колорадского жука

заклучается в применении химических инсектицидов. Однако на сегодняшний день известно, что колорадский жук способен формировать устойчивость к химическим препаратам практически всех классов [4]. Альтернативой химическим инсектицидам является применение биопрепаратов, созданных на основе энтомопатогенных микроорганизмов, в частности бактерий *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), которые обладают высокой специфичностью

действия по отношению к различным отрядам насекомых и безопасны для окружающей среды. Препараты для защиты растений на основе бактерий *Bt* — самые продаваемые биологические инсектициды в мире на сегодняшний день [5]. Бактерии *Bt* распространены повсеместно в природе, продуцируют широкий спектр инсектицидных белков (Cry, Vip, Cyt и др.), активных против насекомых из различных отрядов [6–8]. Инсектицидное действие бактерий *Bt* осуществляется за счет продуцируемого в виде кристалла дельта-эндотоксина, содержащего Cry и Cyt белки, спор, а также вторичных факторов вирулентности [6, 9]. Ранее был показан синергетический эффект спор и Cry3Aa токсина бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *thuringiensis* в смертности личинок колорадского жука [10]. Кристаллический эндотоксин бактерий *Bt* растворяется под действием кислотности кишечника насекомых, происходит высвобождение протоксина Cry и их последующая активация за счет протеолитических ферментов в просвете кишечника насекомых [11, 12]. Далее происходит агрегация активированных Cry-токсинов и связывание с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток кишечника, что приводит к разрушению клеток кишечника за счет образования пор или активации внутриклеточных сигнальных путей [13, 14].

Иммунная и детоксицирующая системы насекомых принимают участие в защите колорадского жука от бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Было показано, что сублетальная бактериальная инфекция *B. thuringiensis* вызывает изменения в активности реакций клеточного и гуморального иммунитета колорадского жука [15]. Гемоциты, присутствующие в гемолимфе, обеспечивают фагоцитоз, инкапсуляцию и меланизацию, а также могут вырабатывать антимикробные пептиды (АМП), которые приводят к снижению скорости размножения или уничтожению патогена, главным образом путем лизиса [16]. Процесс меланизации играет центральную роль в защите насекомых от широкого спектра патогенов и включает в себя скоординированное взаимодействие рецепторов распознавания (PRR), сериновых протеаз, ингибиторов сериновых протеаз и фенолоксидаз [14].

Инактивация токсичных метаболитов эндогенного и экзогенного происхождения, в том числе токсинов патогенов, осуществляется комплексом ферментов детоксицирующей системы [17, 18]. Ферменты глутатион-S-трансферазы (ГСТ) и неспецифические эстеразы принимают участие в детоксикации Cry-токсинов бактерий *Bt* у насекомых [19]. Было показано их участие в защите колорадского жука от токсинов, образующихся при бактериальном патогенезе [10, 15]. Кроме того, ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы защищают организм на-

секомых от повреждения активными формами кислорода (АФК), которые образуются при нарушении целостности тканей токсинами патогена, а также при активации защитных реакций фагоцитоза, меланизации, инкапсуляции [20–22].

Микробиота кишечника играет важную роль в жизнедеятельности насекомых и может быть дополнительным фактором, усиливающим вирулентность бактерий *Bt*. Состав микробиоты у особей одного вида насекомых может различаться в пределах ареала. Кишечный микробиом личинок колорадского жука включает в себя представителей бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [23], *Lactococcus* [24] и *Spiroplasma* [24, 25]. Бактерии рода *Citrobacter* считаются типичным представителем нормальной микробиоты насекомых, включая колорадского жука [26]. В ряде сообщений описывается влияние эндосимбионтов на различные аспекты биологии насекомых, такие как чувствительность к тепловому стрессу и другим факторам окружающей среды [27], питание [28, 29], генетическая дифференциация [30] и размножение [31]. Кроме того, симбиотические микроорганизмы могут играть важную роль в иммунитете насекомых. Микробиота кишечника насекомых — один из основных факторов, определяющих устойчивость хозяина к микроорганизмам, которые оказывают свое инсектицидное действие через кишечник [32]. Установлено, что рекомбинантный штамм *B. subtilis* 26DCry, содержащий ген δ -эндотоксина Cry11a из *Bt* var. *kurstaki*, сочетал продукцию Cry-токсина и способность исходного штамма *B. subtilis* 26D подавлять развитие симбиотных микроорганизмов колорадского жука и иммунные реакции насекомого, что и приводило к высокой смертности фитофага [33]. В исследовании о влиянии бактерий *B. thuringiensis* на микробиом колорадского жука, наблюдались резкие изменения в бактериальном сообществе, связанные со снижением относительной численности эндосимбиотических бактерий *Spiroplasma leptinotarsae*, а также резким повышением численности бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при бактериозе [24]. Существуют значительные различия в восприимчивости к токсинам *B. thuringiensis* у личинок *Helicoverpa armigera* из разных мест обитания и при питании на разных растениях, что может быть связано с изменением микробиоты кишечника, участвующей в метаболизме питательных веществ у насекомых, и активацией / деградацией токсинов *Bt* [34].

Изменчивые географические условия (совокупность природных факторов или свойств географической среды, включающих: географическое положение территории; природные ресурсы; рельеф; климат; почвы и др.) могут разделить популяцию насекомых на разные экологические типы. Различия между этими экологическими типами

могут быть связаны с экологической адаптивностью, устойчивостью к инсектицидам и морфометрическими показателями, а именно скоростью роста, развитием и размножением насекомых [35, 36]. Широкий адаптивный потенциал определяется высокой степенью генетического, биохимического и фенотипического полиморфизма [37, 38], в результате чего у колорадского жука может формироваться различная стратегия защиты от патогенов, в частности, бактерий. Это может иметь важное значение, как для планирования защитных мероприятий, так и для прогноза численности вредителя. Несмотря на обширные знания о том, как бактерии *B.thuringiensis* проявляют свою вирулентность, и как личинки колорадского жука реагируют на инфекцию, имеется недостаточно данных о восприимчивости к бактериям *B.thuringiensis* насекомых из разных географических точек ареала, особенно достаточно удаленных (сотни и тысячи км).

Целью работы является оценка показателей иммунитета, активности ферментов антиоксидантной и детоксицирующей систем, а также изучение состава кишечной микробиоты и восприимчивости к бактериям *Bacillus thuringiensis* у личинок колорадского жука из разных популяций географически удаленных районов Новосибирской области.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты

В работе использовали восстановленный глутатион, 3-хлор-2,4-динитробензойная кислота (ДНХБ) (Sigma, США), п-нитрофенил ацетат (р-НФА) (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), дигидроксифенилаланин (L-ДОФА) (Sigma, США), перекись водорода 0.1% (H_2O_2) (ООО Реактив, РФ), фенилтиомочевина (ФТМ) (Sigma, США), антикоагулянт (АК) pH 4,5 (NaCl, натрий лимоннокислый $Na_3C_6H_5O_7$ (ДИАЭМ, РФ), глюкоза (ДИАЭМ, РФ), ЭДТА (Sigma, США), дистиллированная вода), 10мМ фосфатный буфер (ФБ) pH 7,2 (гидроортофостфат натрия Na_2HPO_4 , хлорид натрия NaCl, дистиллированная вода) (ООО Реактив, РФ), этиловый спирт 96% (ОАО “Кемеровская фармацевтическая фабрика”, РФ).

Насекомые

Личинок колорадского жука третьего возраста собирали с посадок картофеля *Solanum tuberosum*, свободного от обработок инсектицидами, в двух разных точках Новосибирской области: Ордынский район (п. Пролетарский: (54°22'57"с.ш. 81°09'41"в.д.) и Венгеровский район (г. Венгерово: 55°41'05" с.ш 76°44'49" в.д.). Личинок содержали в вентилируемых пластиковых контейнерах объемом 300 мл (по 10 насекомых в одном контейнере) при 12/12-часовом цикле свет/темнота при 25°C, с по-

стоянным доступом к кормовому растению — листьям картофеля, которые собирали в тех же посадках, где собирали насекомых. Картофельные листья помещали в пробирки 1.5 мл с водой и заменяли ежедневно на свежие. Для экспериментов использовали личинок четвертого возраста, через 4–6 ч после линьки [10, 39].

Бактерии и заражение насекомых

Для заражения насекомых использовали бактерии *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni*, из коллекции лаборатории биологической защиты растений и биотехнологии Новосибирского ГАУ. Бактерии культивировали на чашках с агаризованной средой Лурии—Бертани (LB, 1.5% агар, 1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, pH 7.0) в течение 5 суток при 28°C до полного формирования спор и кристаллов. Споры и кристаллы бактерий собирали с ИПС, отмывали от клеточных компонентов и компонентов среды трехкратно в физиологическом растворе (0.9% NaCl), осаждая при 4°C 6000g. В полученной суспензии спор и кристаллов бактерий подсчитывали титр методом посева на ИПС серийного разведения. Для подсчета титра бактерий в качестве ИПС была использована агаризованная среда LB. Способность бактерий *B. thuringiensis* продуцировать параспоральные включения, форму и размер кристаллов оценивали с помощью световой микроскопии в фиксированных, окрашенных карболовым эозином препаратах. Соотношение спор и кристаллов бактерий составляло 1:1. Кристаллический эндотоксин *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* содержит токсин Cry3A (размер 65 кДа), являющимся специфичным для отряда Coleoptera.

Пероральное заражение личинок колорадского жука споро-кристаллической смесью бактерий в физиологическом растворе проводили однократно путем принудительного скармливания с помощью тупоконечной иглы (30G) и шприцевого насоса (KDS 100, KD Scientific). Каждой личинке скармливали 10 мкл суспензии. Для сравнения чувствительности насекомых из разных частей Новосибирской области использовали титр 10^6 спор и кристаллов бактерий на личинку, 100 насекомых на вариант, разделенных на 10 повторностей. Контрольной группе насекомых скармливали 10 мкл физиологического раствора. После инфицирования насекомых, ежедневно заменяли картофельные листья (которые собирали в тех же посадках, где собирали насекомых), помещенные в пробирки 1,5 мл с водой. Личинок содержали при 25°C. Учет смертности личинок производили в течение 6 суток после заражения. Через 48 ч после инфицирования личинок колорадского жука бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* у насекомых отбирали гемолимфу для изучения иммунного ответа.

Анализ активности фенолоксидаз в плазме гемолимфы

Перед отбором гемолимфы поверхность тела насекомых стерилизовали 70% этанолом. Отбор гемолимфы проводили, прокалывая четвертый вентральный сегмент кутикулы тела насекомых стерильным скарификатором, и собирая выступившую каплю гемолимфы пипеткой со стерильным наконечником. Индивидуально с каждой личинки отбирали по 20 мкл гемолимфы в стерильную пробирку, содержащую 10 мкл 10мМ ФБ. Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. Надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов. Активность фенолоксидазы (ФО) в плазме гемолимфы определяли по методу Ashida и Söderhäll [40] с использованием L-ДОФА как субстрат. Образцы (5 мкл) инкубировали в течение 15 мин с 200 мкл 10 мМ L-ДОФА при 28°C, затем измеряли оптическую плотность при 490 нм. Использовали 20 насекомых на вариант.

Анализ лизоцим-подобной антибактериальной активности в плазме гемолимфы

Индивидуально с каждой личинки отбирали 10 мкл гемолимфы в 2 мкл охлажденного ФБ, содержащего фенилтиомочевину (ФТМ) (4мг/мл). Полученную суспензию центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. 6 мкл плазмы, свободной от гемоцитов, помещали в лунку на агаризованной (1.5%) пластинке, содержащей лиофилизированные бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, США) (40 мг на 10 мл физиологического раствора - 0,9% NaCl) [41]. Агаризованные пластинки инкубировали при 37°C в течение 18ч. Лизоцим-подобную активность гемолимфы определяли по диаметру зоны лизиса *M. lysodeikticus*. Для построения калибровочной кривой использовали лизоцим яичного белка. Использовали 20 насекомых на вариант.

Общее количество гемоцитов

Индивидуально с каждой личинки отбирали 10 мкл гемолимфы в 20 мкл охлажденного антикоагулянта (62 мМ NaCl, 100 мМ глюкоза, 10 мМ ЭДТА, 30 мМ цитрат натрия, 26 мМ лимонная кислота, pH 4.5) (АК) с фенилтиомочевинной (ФТМ) (4мг/мл). Подсчет общего числа гемоцитов проводили в камере Горяева. Общее количество гемоцитов представляли как количество гемоцитов на 1 мл гемолимфы. Использовали 15 насекомых на вариант.

Приготовление образцов кишечника и жирового тела

Для приготовления гомогенатов кишечника и жирового тела насекомых препарировали в ох-

лажденном ФБ. Образцы готовили индивидуально (весь кишечник без содержимого в одном образце, $n = 20$ на каждый вариант). Кишечники помещали в 100 мкл фосфатного буфера. Извлеченные органы разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора (SONICATOR q125 (QSonica, США) в течение 10с при амплитуде 90%, трехкратно). Гомогенаты тканей центрифугировали в течение 15 мин при 4°C, 10000g. Полученную надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов.

Определение активности каталазы, неспецифических эстераз, ГСТ в образцах кишечника и жирового тела

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при 240 нм по скорости разложения H_2O_2 [42]. К 200 мкл реакционной смеси ФБ с 0.5 % H_2O_2 добавляли образец 5 мкл и инкубировали 10 мин при 28°C.

Активность неспецифических эстераз определяли по скорости гидролиза п-нитрофенилацетата согласно Prabhakaran et al. [43] с изменениями [44]. 5 мкл образца инкубировали в течение 10 мин с 200 мкл п-нитрофенилацетата при 28°C, оптическую плотность измеряли при 410 нм.

Активность ГСТ определяли по скорости увеличения концентрации 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, продукта реакции динитрохлорбензойной кислоты (ДНБ) и восстановленного глутатиона, катализируемой глутатионом [45]. Инкубацию образца объемом 10 мкл проводили с 1 мМ глутатиона и 1 мМ ДНБ при 25 °C в течение 5 мин, оптическую плотность измеряли при 340 нм.

Концентрацию белка в гомогенатах кишечника, жирового тела и образцах гемолимфы определяли методом Брэдфорда [46] с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) для построения калибровочной кривой, оптическую плотность измеряли при 590 нм.

Удельную активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка [47]. Использовали 20 насекомых на каждый вариант.

Анализ кишечной микробиоты

Для изучения микробиоты кишечника был использован общепринятый метод метабаркодинга гена 16S представителей бактериального сообщества [39, 48]. У личинок, прошедших поверхностную стерилизацию, извлекали средний отдел кишечника с неповрежденным содержимым (по пять личинок на образец). ДНК из образцов кишечника насекомых выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответ-

ствии с инструкцией производителя. Использовали три повторности на вариант (5 насекомых в каждой повторности). Для механического разрушения образца использовали TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Германия) 10 мин при 30 Герц. Качество ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, а количество – на флуориметре Qubit (Life Technologies, США) и спектрофотометре Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Для амплификации региона V3-V4 гена 16S рРНК использовали праймеры 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), содержащих адаптерные последовательности (Illumina, США), линкер и баркод [49]. Амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси в условиях, описанных ранее [50]. Ампликоны смешивали по 200 нг каждый и чистили в 1% агарозном геле с помощью набора MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Германия). Секвенирование проводили в ЦКП "Геномика" (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США), используя набор Reagent Kit v3 (2x300, Illumina, USA).

Полученные парные последовательности анализировали с помощью UPARSE скриптов [51], используя Usearch v11.0.667 [52]. Биоинформатическая обработка включала перекрывание парных ридов, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер и получение операционных таксономических единиц (ОТЕ) с помощью алгоритма кластеризации UPARSE. Таксономическую принадлежность последовательностей (ОТЕ) определяли с помощью SINTAX [53] с использованием 16S RDP training set v18 в качестве референсной базы [54]. Таксономическую структуру полученного таким образом ансамбля 16S последовательностей оценивали путем вычисления отношения числа таксон-специфичных последовательностей к общему числу последовательностей образца, выраженного в процентах.

Статистическая обработка данных

Для проверки нормальности распределения данных использовали тест Д'Агостино (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) и критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk normality test). Для сравнения динамики смертности насекомых при заражении бактериями использовали метод Каплана-Майера. Логарифмический критерий Мантла-Кокса использовался для количественной оценки различий в уровнях смертности. Для сравнения обилия состава микробиоты в кишечнике насекомых использовали однофакторный дисперсионный анализ с тестом Дана (Dunn's multiple comparisons test). Для сравнения данных с нормаль-

ным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ тестом Тьюки (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test). Для расчетов использовали программу GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартной ошибки среднего. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели иммунитета, детоксицирующей и антиоксидантной систем у личинок колорадского жука

При сравнении показателей иммунитета в гемолимфе личинок колорадского жука, собранных в двух районах Новосибирской области, было зарегистрировано достоверное большее значение общего количества гемоцитов в 1.6 раза ($p < 0.001$; $q = 6.37$; $df = 54$), а также лизоцим-подобной антибактериальной активности в 2 раза ($p < 0.05$; $q = 4.43$; $df = 67$) у насекомых из Венгеровского района по сравнению с личинками Ордынского района. При сравнении активности ФО у личинок Венгеровского района и Ордынского района достоверных отличий не отмечено (Табл. 1).

В результате сравнения антиоксидантной и детоксицирующей систем насекомых отмечено достоверные различия в активности детоксицирующих ферментов: глутатион-S-трансферазы в 2.5 раза ниже ($p < 0.001$; $q = 6.9$; $df = 65$) и неспецифических эстераз в 1.7 раза ниже ($p < 0.0001$; $q = 7.02$; $df = 73$) в кишечнике личинок Венгеровского района по сравнению с группой насекомых из Ордынского района. В жировом теле насекомых между вариантами достоверных различий в активности данных ферментов не обнаружено. Активность антиоксидантного фермента каталазы в кишечнике и жировом теле насекомых, достоверно не различалась между насекомыми Ордынского и Венгеровского районов (табл. 1).

Микробиота кишечника колорадского жука

С помощью 16S метабаркодинга проведен анализ ДНК кишечной микробиоты у личинок колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов и было установлено, что в обеих группах насекомых доминирующими таксоном служат бактерии семейства *Enterobacteriaceae* $50.6 \pm 9.5\%$ и $36.5 \pm 5.0\%$, а также рода *Citrobacter* $24.6 \pm 10.3\%$ и $18.4 \pm 2.8\%$ соответственно (рис. 1). Бактерии рода *Acinetobacter*, *Myroides*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas* и *Sphingobacterium* присутствовали в кишечнике насекомых обеих групп в меньших пропорциях 1–5% (рис. 1). Однако, стоит обратить внимание, что в кишечнике насекомых Ордынского

Таблица 1. Показатели клеточного и гуморального иммунитета в гемолимфе (общее количество гемоцитов), активность антибактериальной системы и фенолоксидаз (ФО)), активность ферментов детоксицирующей (глутатион-s-трансферазы (ГСТ) и неспецифических эстераз) и антиоксидантной (ГСТ и каталазы) систем в кишечнике и жировом теле личинок колорадского жука Ордынского и Венгеровского районов Новосибирской области.

Показатели	Ордынский район	Венгеровский район
гемолимфа		
Общее число гемоцитов	13866667 ± 904100***	22573333 ± 1062587
Лизоцим-подобная антибактериальная активность	0.015 ± 0.002*	0.028 ± 0.003
Фенолоксидазная активность	0.138 ± 0.01	0.105 ± 0.009
кишечник		
Глутатион-s-трансферазная активность	0.998 ± 0.135***	0.421 ± 0.05
Активность неспецифических эстераз	0.629 ± 0.035 ****	0.368 ± 0.031
Каталазная активность	1.92 ± 0.28	1.77 ± 0.36
жировое тело		
Глутатион-s-трансферазная активность	1.036 ± 0.105	0.466 ± 0.057
Активность неспецифических эстераз	0.269 ± 0.021	0.1865 ± 0.019
Каталазная активность	1.082 ± 0.196	0.766 ± 0.120

Данные представлены, как среднее арифметическое значение и его ошибка. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$ – по сравнению с насекомыми Венгеровского района.

района также доминирующим таксоном отмечены бактерии рода *Spiroplasma* и составляют $30.6 \pm 7.8\%$, при этом в Венгеровской группе насекомых данного рода бактерий не обнаружено. Стоит отметить, что в кишечнике насекомых было обнаружено минорное присутствие (меньше 1%) бактерий рода *Enterococcus*, *Providencia*, *Empedobacter*, *Serratia*, *Vagococcus*, *Achromobacter*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Melaminivora*, *Sphingomonas*, *Diphorobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Brevundimonas*.

Восприимчивость личинок колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов Новосибирской области к бактериям B.thuringiensis

При пероральном заражение насекомых Ордынского района споро-кристаллической смесью бактерий *Bt* ssp. *morrisoni* была зафиксирована смертность 35% на шестые сутки после заражения по сравнению с незараженной группой насекомых (Chi square, 8.54; $p < 0.01$). Смертность личинок колорадского жука Венгеровского района после заражения бактериями составила 30% на шестые сутки эксперимента по сравнению с незараженными насекомыми (Chi square, 9.18; $p < 0.01$) (рис. 2). Достоверных отличий в чувствительности насекомых из Венгеровского и Ордынского районов к бактериям *B.thuringiensis* отмечено не было (рис. 2).

Иммунный ответ личинок колорадского жука при развитии бактериальной инфекции B.thuringiensis

При сравнении иммунного ответа в гемолимфе личинок колорадского жука из Ордынского и Венгеровского районов на вторые сутки после заражения бактериями были получены следующие данные. Установлено, что заражение бактериями *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* личинок колорадского жука из Ордынского района, приводило к достоверному ($p < 0.001$; $q = 6.49$; $df = 54$) увеличению общего количества гемоцитов в гемолимфе насекомых в 1,6 раза по отношению к контрольной группе (рис. 3).

При изучении лизоцим-подобной антибактериальной активности плазмы гемолимфы личинок колорадского жука на вторые сутки после заражения бактериями *B. thuringiensis* насекомых Ордынского и Венгеровского районов достоверных отличий по сравнению с незараженными насекомыми не зарегистрировано (рис. 4).

Показано достоверное увеличение активности ФО в плазме гемолимфы насекомых при скармлировании бактерий *B.thuringiensis* личинкам колорадского жука Ордынского и Венгеровского районов по сравнению с незараженными насекомыми в 2 ($p < 0.001$; $q = 5.69$; $df = 71$) и 2.8 раза соответственно ($p < 0.0001$; $q = 7.97$; $df = 71$) (рис. 5).

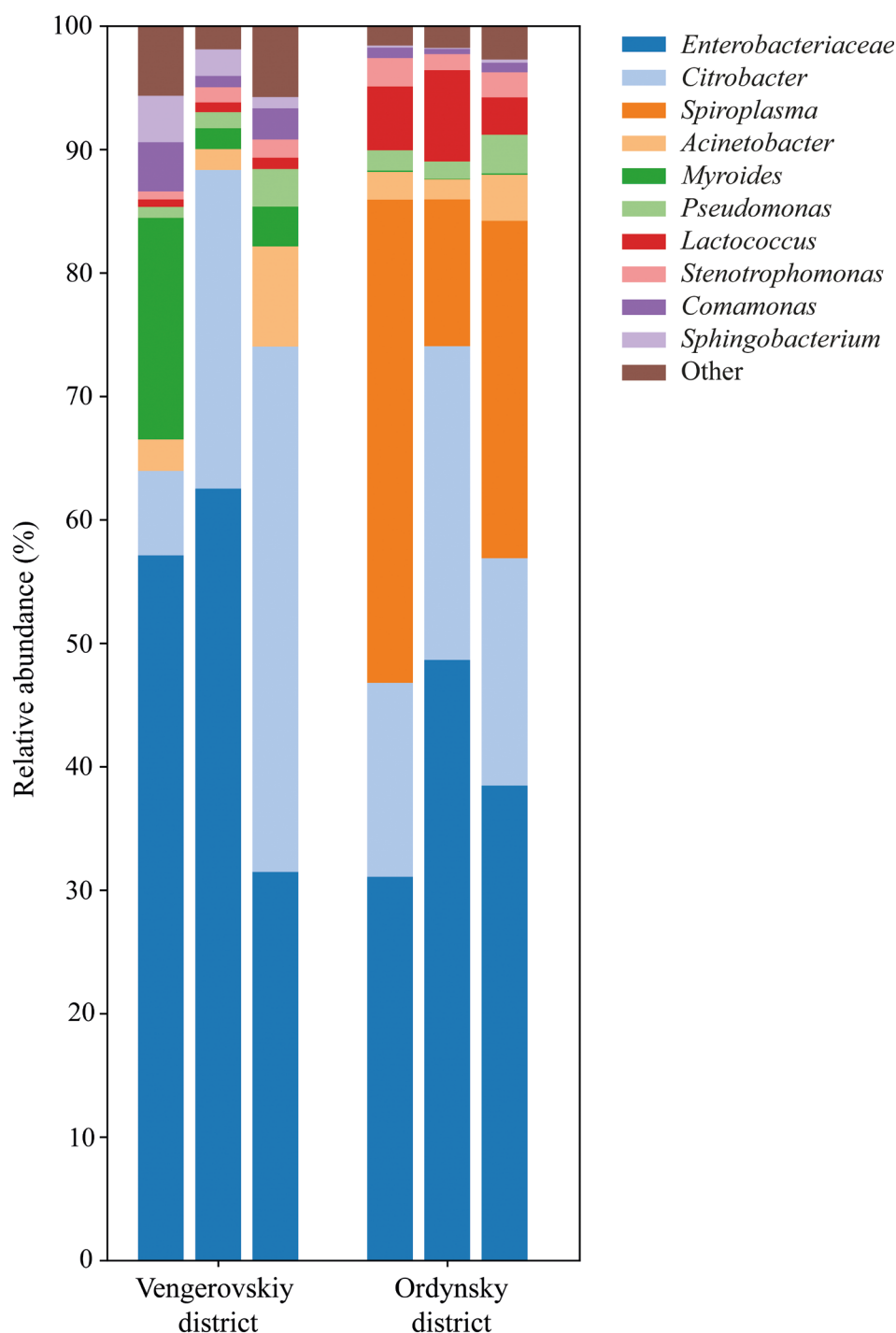


Рис. 1. Относительное обилие (%) бактерий в сообществах кишечной микробиоты колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Венгеровский и Ордынский районы). Отобрана встречаемость бактерий для трех биологических повторов (5 насекомых в каждой повторности).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено сравнение базовых показателей клеточного и гуморального иммунитета в гемолимфе, активности ферментов антиоксидантной и детоксицирующей систем, микробиоты кишечника у личинок колорадского жука из разных популяций

географически удаленных районов Новосибирской области, а также сравнение их восприимчивости к бактериям *B. thuringiensis*. Значение базовых показателей общего количества гемоцитов и лизоцим-подобной антибактериальной активности в гемолимфе у насекомых Венгеровского района

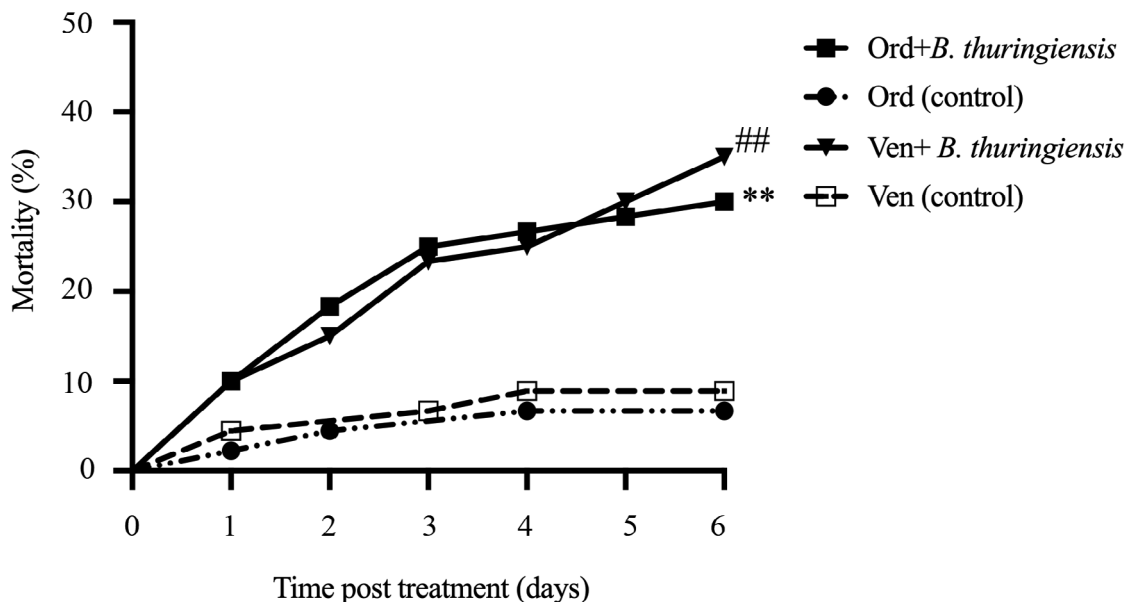


Рис. 2. Смертность личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен) после перорального заражения споро-кристаллической смесью *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni*. Данные были проанализированы путем сравнения кривых с использованием логарифмических тестов (Мантел-Кокса) ($n = 100$ личинок на вариант). ** – $p < 0.01$ по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль); ## – $p < 0.01$ по сравнению с незараженными насекомыми Венгеровского района (Вен контроль).

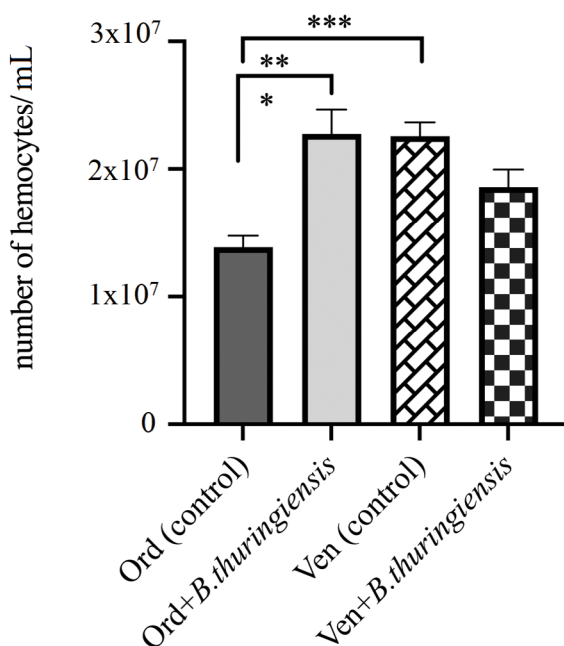


Рис. 3. Общее количество гемоцитов в гемолимфе личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен)) через 48 ч после перорального заражения споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* (Орд+B. thuringiensis; Вен+B. thuringiensis). Данные представляют собой среднее арифметическое значение и его ошибку. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. *** – $p < 0.001$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль).

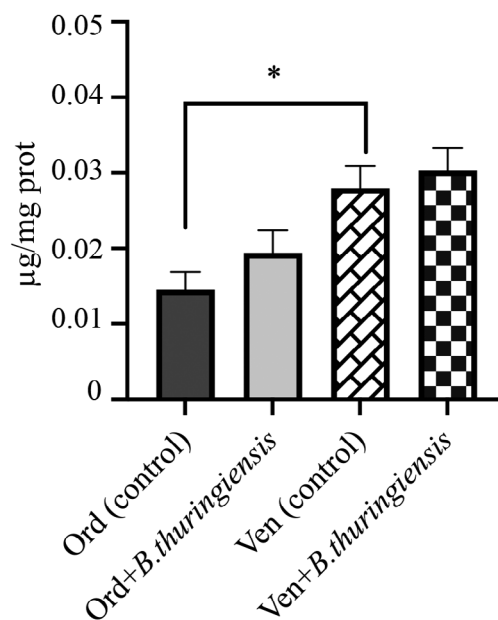


Рис. 4. Лизоцим-подобная антибактериальная активность в плазме гемолимфы личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен)) через 48 ч после перорального заражения споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* (Орд+B. thuringiensis; Вен+B. thuringiensis). Данные представляют собой среднее арифметическое значение и его ошибку. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. * – $p < 0.05$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль).

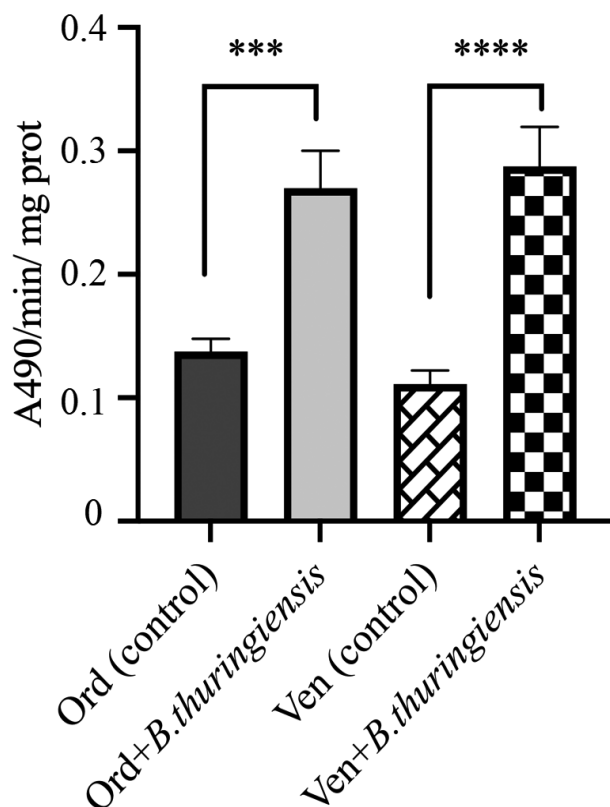


Рис. 5. Активность фенолоксидаз в плазме гемолимфы личинок колорадского жука из двух географических точек Новосибирской области (Ордынский район (Орд) и Венгеровский район (Вен)) через 48 часов после перорального заражения споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* (Орд+B.thuringiensis; Вен+ *B.thuringiensis*). Данные представляют собой среднее арифметическое значение и его ошибку. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа тестом Тьюки. *** – $p < 0.001$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского района (Орд контроль); **** – $p < 0.0001$ – по сравнению с незараженными насекомыми Ордынского (Орд контроль) и Венгеровского районов (Вен контроль).

было достоверно выше по сравнению с личинками Ордынского района. В кишечнике и жировом теле у личинок с Ордынского района отмечена повышенная активность ферментов детоксицирующей системы по сравнению с Венгеровской группой насекомых. Показано, что доминирующей группой кишечной микробиоты в обоих районах выступают бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Citrobacter*, однако у личинок Ордынского района также преобладают бактерии рода *Spiroplasma*. В ходе исследования установлено, что насекомые не отличались чувствительностью к бактериям *B. thuringiensis*. Развитие бактериальной инфекции *B. thuringiensis* у личинок колорадского жука из разных районов Новосибирской области вызывает достоверное увеличение активности ФО в гемолимфе по сравнению с незараженными насекомыми,

при этом у Ордынской группы насекомых также регистрируются достоверное увеличение общего количества гемоцитов по отношению к контрольной группе насекомых. Таким образом, показано, что две группы насекомых из разных точек Новосибирской области, принадлежащие к одному виду, демонстрируют различия в показателях клеточного и гуморального иммунного ответа при заражении бактериями *B. thuringiensis*.

Различия в базовых показателях клеточного и гуморального иммунного ответа в гемолимфе насекомых ранее были показаны при сравнении двух географических популяций (меланисты и ахромисты) личинок большой вошинной огневки *Galleria mellonella* [55]. В своем исследовании, группа авторов показали различия в активности ферментов глутатион-S-трансферазы и альфа-эстеразы у полевых популяций комаров *Anopheles stephensi* из провинций Кунар и Нангархар в Афганистане при изучении устойчивости насекомых к различным группам инсектицидов [56]. Также в исследовании по изучению устойчивости к инсектицидам разных географических популяций одного вида насекомых, было показано различие базовых показателей ферментов глутатион-S-трансферазы и альфа-эстеразы и ацетилхолинэстеразы у капустной моли *Plutella xylostella*, комаров *Anopheles maculipennis*, египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis*, яблонной плодовой гусеницы *Cydia pomonella* (L.) и др. [57–60]. Таким образом, различия в активности базовых показателей защитных систем насекомых из различных частей ареала обитания могут быть обусловлены уровнем устойчивости насекомых к биологическим и химическим инсектицидам, применяемым там ранее.

В результате секвенирования и профилирования бактериального сообщества кишечной микробиоты личинок колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов было установлено, что доминирующая группа в обоих районах представлена бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Полученные результаты согласуются с другими исследованиями, в которых доминирующей группой бактерий кишечной микробиоты колорадского жука из разных мест обитания в Китае были бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Также данные для западно-сибирской популяции жука свидетельствуют о преобладании бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [10, 23, 61]. В микробиоте колорадского жука из Венгеровского и Ордынского районов нами обнаружены бактерии рода *Citrobacter*, являющиеся типичным представителем нормальной микробиоты насекомых, включая колорадского жука [26]. Интересно отметить, что в кишечнике насекомых Ордынского района доминирующим таксоном ($30.6 \pm 7.8\%$) также выступают бактерии рода *Spiroplasma*, хотя у насекомых из Венгеровского района данные бакте-

рии в кишечнике отсутствуют. В работе Polenogova и соавт. отмечена высокая относительная численность бактерий *Spiroplasma leptinotarsae* (до 95%) в кишечнике личинок колорадского жука, собранного с частных картофельных полей (Новосибирская область, 53°44'3.534" с.ш., 77°39'0.0576" в.д.) [24]. Известно, что бактерии рода *Spiroplasma* являются облигатным эндосимбионтом колорадского жука [62]. Географическое расположение популяции насекомых может быть фактором, влияющим на уровень эндосимбионтов кишечника насекомых. В частности, в популяциях табачной белокрылки *Bemisia tabaci* численность кишечных эндосимбионтов рода *Candidatus*, *Portiera*, *Hamiltonella* и *Rickettsia* варьировала в зависимости от географического местоположения тестируемой популяции насекомого [63]. Также в популяциях каштанового долгоносика *Curculio sikkimensis* местный климат был фактором, влияющим на присутствие эндосимбионтных бактерий *Sodalis*, *Wolbachia* и *Rickettsia* [64]. Кроме того, было показано значительное различие микробных сообществ колорадского жука, собранного из разных мест в Китае [23].

Роль микробиоты насекомых в устойчивости к бактериальным и грибным инфекциям, химическим инсектицидам во многом зависит от видового состава микроорганизмов, условий выращивания хозяина и типа патогена [65–68]. Так, показано, что кишечные симбионты рода *Burkholderia* опосредуют устойчивость к инсектицидам у клопа *Riptortus pedestris* (Hemiptera), которая может передаваться горизонтально другим насекомым [66, 69]. Установлено, что некоторые штаммы бактерий *Citrobacter* sp., выделенные из кишечника мух *Bactrocera dorsalis* (Diptera), способны разлагать трихлорфон, повышали устойчивость насекомых к химическому инсектициду [70].

Симбиотические микроорганизмы могут играть важную роль в защите насекомых от паразитов и патогенов [71]. Было показано, что симбионты могут повысить устойчивость хозяина к чужеродным агентам, стимулируя или запуская иммунную систему насекомых [72, 73]. Исследования показали, что бактерии рода *Spiroplasma* могут активировать иммунные реакции у плодовых мух, запускать Toll-путь активации синтеза антимикробных белков [74, 75]. Показано, что бактерии рода *Spiroplasma* защищают *Drosophila neotestacea* от стерилизующего воздействия паразитической нематоды *Howardula* как в лаборатории, так и в полевых условиях [76]. Исследования свидетельствуют о том, что бактерии рода *Spiroplasma* распространяются в североамериканских популяциях мух *D. neotestacea* и происходят адаптивные изменения в защитных реакциях насекомых [76]. Было показано, что влияние бактерий данного рода на развитие инфекции связано с син-

тезом протеаз, которые задействованы в активации иммунитета хозяина, и такое влияние может быть защитным, нейтральным или отрицательным, в зависимости от возбудителя инфекции насекомых. Исходя из этого, можно сделать предположение о том, что повышенный уровень базовых показателей ГСТ и неспецифических эстераз в кишечнике Ордынской группы насекомых может быть связан с доминированием в кишечной микробиоте эндосимбионта рода *Spiroplasma*, который запускает активацию данных ферментов.

Популяции колорадского жука из Ордынского и Венгеровского районов Новосибирской области демонстрируют одинаковый уровень чувствительности к бактериям *B. thuringiensis*, при этом полученные результаты свидетельствуют о том, что бактериальная инфекция на уровне 30% смертности приводит к активации защитных реакций и различиям в иммунном ответе у насекомых из разных районов.

Известно, что клеточные и гуморальные иммунные реакции насекомых могут быть активированы системно в гемолимфе [14, 77, 78], а также локально в месте развития инфекции через синтез антимикробных пептидов, активацию детоксицирующих ферментов и регенерацию в кишечнике, кутикуле, трахеях [79–81]. Был показан вклад клеточных и гуморальных иммунных реакций при развитии бактериальной инфекции, вызванной *B. thuringiensis*, у личинок большой вошинной огневки *G. mellonella*, а также у личинок колорадского жука [14, 15, 77, 78]. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют, что общее количество гемоцитов у личинок колорадского жука Венгеровского района достоверно выше, чем у насекомых из Ордынского района, при этом заражение бактериями *B. thuringiensis* приводит к достоверному увеличению общего количества гемоцитов в гемолимфе насекомых из Ордынского района по отношению к незараженным. Гемоциты принимают активное участие в таких клеточных иммунных реакциях, как фагоцитоз, инкапсуляция, синтез антимикробных белков и реакция меланизации. Повышенный базовый уровень общего количества гемоцитов у насекомых из Венгеровского района дает преимущество насекомым при защите от патогена, в отличие от популяции, насекомые которой вынуждены расходовать ресурс на пролиферацию клеток гемолимфы во время развития инфекционного процесса.

Кроме того, необходимо отметить, что у личинок колорадского жука Венгеровского района достоверно более высокая лизоцим-подобная антибактериальная активность в гемолимфе по сравнению с личинками Ордынского района. Лизоцим синтезируется постоянно в организме насекомых в различных тканях и органах, и его продукция увели-

чивается в ответ на инфекцию. Антимикробные пептиды могут действовать синергетически и приводить к бактериостатическому или бактериолитическому эффекту, главным образом, путем нарушения целостности клеточной стенки [16, 81].

Одна из ключевых защитных реакций насекомых при повреждении целостности тканей и при проникновении патогена, считается меланизация, опосредованная деятельностью ФО-активирующего каскада. Меланин и активные формы кислорода — продукты меланогенеза, которые образуются в процессе каскада ферментативных реакций, способны предотвратить рост микроорганизмов [82, 83]. При заражении бактериями *B. thuringiensis* личинок колорадского жука Ордынского и Венгеровского районов было отмечено увеличение ферментативной активности ФО в гемолимфе инфицированных насекомых. Повышение активности фенолоксидаз — одна из первых реакций защиты у насекомых при заражении бактериями *B. thuringiensis* [10, 78, 84]. Сублетальная и полулетальная инфекция *B. thuringiensis* личинок колорадского жука приводит к увеличению активности ФО в гемолимфе и экспрессии проФО в кишечнике [10, 15], что свидетельствует о важной роли данных ферментов в защите насекомых от бактериальной инфекции. Необходимо учитывать, что изменение активности ФО в гемолимфе при бактериальной инфекции может быть связано с активацией иммунной системы при токсическом действии бактериальных метаболитов [15, 78, 84, 85]. Повышенный уровень базовых показателей клеточного и гуморального иммунного ответа у личинок Венгеровского района может указывать на потенциально большую устойчивость к энтомопатогенам различной природы по сравнению с насекомыми Ордынского района.

Ранее установлено, что синтез и повышение активности неспецифических эстераз и ГСТ происходит для инактивации токсинов и токсических метаболитов при развитии бактериальной инфекции *B. thuringiensis* у личинок колорадского жука в жировом теле, как основном органе детоксикации [15], и в кишечнике, как первом и наиболее важном барьере при пероральной инфекции [10]. Кроме того, необходимо отметить, что повышенная активность данных ферментов является одним из ключевых факторов метаболической устойчивости насекомых к химическим инсектицидам [86, 87]. Ряд исследований указывают на то, что неспецифические эстеразы играют важную роль в механизмах формирования устойчивости в кишечнике личинок *G. Mellonella* и *H. armigera* к бактериям *B. thuringiensis* [18, 88]. Основная функция ГСТ заключается в защите клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов, что подтверждается в исследовании активности данного фермента у ли-

чинок колорадского жука при заражении спорами, токсином и споро-кристаллической смесью бактерий *B. thuringiensis* [10]. В нашей работе зарегистрирована более высокая базовая активность неспецифических эстераз и ГСТ в кишечнике личинок колорадского жука Ордынского района по сравнению с популяцией из Венгеровского района. Можно предположить, что более высокая активность детоксицирующих ферментов в кишечнике будет способствовать защите организма Ордынской группы насекомых при проникновении бактерий *B. thuringiensis*.

Антиоксидантная система имеет решающее значение для контроля окислительно-восстановительного баланса, поскольку ферментативные и неферментативные антиоксиданты контролируют уровень АФК во время развития инфекционных процессов и иммунных реакций насекомых [10, 47, 89]. Следует отметить, что каталаза принимает участие в инактивации перекиси водорода [90, 91]. В кишечнике личинок колорадского жука было показано, участие неферментативных тиоловых антиоксидантов в защите от бактериоза, вызванного *B. thuringiensis* [10]. При изучении бактериальной инфекции на воцинной огневке было зарегистрировано достоверное снижение активности каталазы в кишечнике, авторы предполагают, что это связано с подавлением активности данного фермента в результате высокого уровня образования супероксидных радикалов во время окислительного стресса на острой стадии бактериоза [47]. Поддержание окислительно-восстановительного баланса в кишечнике личинок колорадского жука, регулируемое антиоксидантной системой, имеет решающее значение как для защитных насекомых от *Bt*, так и для защиты собственных клеток от АФК [10]. Мы установили, что у насекомых Ордынского района понижены базовые показатели гуморального и клеточного иммунного ответа по сравнению с Венгеровской группой насекомых, несмотря на это, вероятно, защита при развитии бактериальной инфекции, может эффективно осуществляться за счет более высокой базовой активности ферментов детоксицирующей системы, а именно неспецифических эстераз и ГСТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Популяции колорадского жука из Ордынского и Венгеровского районов Новосибирской области демонстрируют одинаковый уровень чувствительности к бактериям *B. thuringiensis*. Вероятно, в связи с тем, что личинки колорадского жука Венгеровского района имеют изначально более высокий базовый уровень показателей иммунитета, при проникновении патогена происходит повышение активности защитных реакций для ликвидации последствий заражения и предотвращения вторич-

ного заражения. При этом присутствие симбиотических бактерий рода *Spiroplasma* в кишечнике Ордынской группы насекомых, а также высокие базовые показатели ферментов детоксицирующей системы могут быть задействованы в защите от бактериальной инфекции *B. thuringiensis*. Это свидетельствует о том, что насекомые одного вида из разных частей ареала могут эффективно “перестраивать” защитную стратегию от энтомопатогенов, за счет баланса между конституциональными и индуцированными показателями резистентности.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека и ли животных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по изучению иммунного ответа насекомых и восприимчивости личинок колорадского жука к бактериям *Bacillus thuringiensis* выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-16-20031) и Правительства Новосибирской области (№ р-4), биоинформатическая обработка NGS данных была выполнена в рамках ГЗ ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alyokhin A, Rondon SI, Gao Y (2022) Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management. Academic Press 2nd Ed, London, 501.
2. Schoville SD, Chen YH, Andersson MN, Benoit JB, Bhandari A, Bowsher JH, Brevik K, Cappelle K, Chen MJM, Childers AK, Childers C, Christiaens O, Clements J, Didi-on EM, Elpidina EN, Engsontia P, Friedrich M, García-Robles I, Gibbs RA, Goswami C, Grapputo A, Gruden K, Grynberg M, Henrissat B, Jennings EC, Jones JW, Kalsi M, Khan SA, Kumar A, Li F, Lombard V, Ma X, Martynov A, Miller NJ, Mitchell RF, Munoz-Torres M, Muszewska A, Oppert B, Palli SR, Panfilio KA, Pauchet Y, Perkin LC, Petek M, Poelchau MF, Record E, Rinehart JP, Robertson HM, Rosendale AJ, Ruiz-Arroyo VM, Smagghe G, Szendrei Z, Thomas GWC, Torson AS, Vargas Jentszsch IM, Weirauch MT, Yates AD, Yocum GD, Yoon JS, Richards S (2018) A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Scientific Reports* 8 (1): 1931. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20154-1>
3. Izzo VM, Chen YH, Schoville SD, Wang C, Hawthorne DJ (2018) Origin of Pest Lineages of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol* 111 (2): 868–878. <https://doi.org/10.1093/jee/tox367>
4. Molnar I, Rakosy-Tican E (2021) Difficulties in Potato Pest Control: The Case of Pyrethroids on Colorado Potato Beetle. *Agronomy* 11(10): 1920. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101920>
5. Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH (2007) *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* 17(4): 547–559.
6. Domínguez-Arrizabalaga M, Villanueva M, Escriche B, Ancín-Azpilicueta C, Caballero P (2020) Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins against Coleopteran Pests. *Toxins* 12(7): 430. <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
7. Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC (2021) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 186:107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
8. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Gerasimova SV (2023) Plant recombinant gene technology for pest control in XXI century: from simple transgenesis to CRISPR/Cas. In: Kumar A, Arora S, Ogita S, Yau Y-Y, Mukherjee K (eds) *Gene editing in plants: CRISPR-Cas and its applications*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-8529-6_2
9. Kumar P, Kamle M, Borah R, Mahato DK, Sharma B (2021) *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egypt J Biol Pest Control* 31: 95. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00440-3>
10. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Tereshchenko D, Krytsyna TI, Alikina T, Kalmykova G, Kabilov M, Coates CJ (2021) *Bacillus thuringiensis* spores and Cry3A toxins act synergistically to expedite Colorado potato beetle mortality. *Toxins* (Basel) 13(11): 746. <https://doi.org/10.3390/toxins13110746>
11. Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4):423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
12. Soberón M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(8):1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>
13. Ruiz-Arroyo VM, García-Robles I, Ochoa-Campuzano C, Goig GA, Zaitseva E, Baaken G, Martínez-Ramírez AC, Rausell C, Real MD (2017) Validation of ADAM10 metalloprotease as a *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin functional receptor in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Insect Mol Biol* 26(2):204–214. <https://doi.org/10.1111/imb.12285>
14. García-Robles I, De Loma J, Capilla M, Roger I, Boix-Montesinos P, Carrión P, Vicente M, López-Galiano MJ, Real MD, Rausell C (2020) Proteomic insights into the

- immune response of the Colorado potato beetle larvae challenged with *Bacillus thuringiensis*. *Dev Comp Immunol* 104:103525.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103525>
15. Yaroslavl'tseva ON, Dubovskiy IM, Khodyrev VP, Duisembekov BA, Kryukov VY, Glupov VV (2017) Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae. *J Insect Physiol* 96:14–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.004>
 16. Hiller JF (2016) Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 58: 102–118.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
 17. Marmaras VJ, Lampropoulou M (2009) Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal* 21(2): 186–195.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
 18. Grizanova EV, Krytsyna TI, Surcova VS, Dubovskiy IM (2019) The role of midgut nonspecific esterase in the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 166:107208.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107208>
 19. Hoffman RL (2003) A new genus and species of trigoniuline millipede from Western Australia (Spirabolida: Pachybolidae: Trigoniulinae). *Records of the Western Australian Museum* 22 (1): 17–22.
[https://doi.org/10.18195/issn.0312-3162.22\(1\).2003.017-022](https://doi.org/10.18195/issn.0312-3162.22(1).2003.017-022)
 20. Felton GW, Summers CB (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 29(2): 187–197.
<https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
 21. Krishnan N, Kodrik D (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J Insect Physiol* 52(1): 11–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.08.009>
 22. Krishnan N, Kodrik D, Turanli F, Sehna F (2007) Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *J Insect Physiol* 53(1): 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.10.001>
 23. Yu Y, Wang Y, Li H, Yu X, Shi W, Zhai J (2021) Comparison of Microbial Communities in Colorado Potato Beetles (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Collected From Different Sources in China. *Front Microbiol* 12:639913.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639913>
 24. Polenogova OV, Noskov YA, Yaroslavl'tseva ON, Kryukova NA, Alikina T, Klementeva TN, Andrejeva J, Khodyrev VP, Kabilov MR, Kryukov VY, Glupov VV (2021) Influence of *Bacillus thuringiensis* and avermectins on gut physiology and microbiota in Colorado potato beetle: Impact of enterobacteria on susceptibility to insecticides. *PLoS One* 16(3): e0248704.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248704>
 25. Wang GH, Berdy BM, Velasquez O, Jovanovic N, Alkhali-fa S, Minbiole KPC, Brucker RM (2020) Changes in Microbiome Confer Multigenerational Host Resistance after Sub-toxic Pesticide Exposure. *Cell Host Microbe* 27(2):213–224.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.009>
 26. Muratoglu H, Demirbag Z, Sezen K (2011) The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia* 66: 288–293.
<https://doi.org/10.2478/s11756-011-0021-6>
 27. Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomol* 27: 189–195.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x>
 28. Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T (2003) Changing partners in an obligate symbiosis: A facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings. Biol sci The Royal Society* 270: 2543–2550.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2537>
 29. Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL (2009) Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog* 5(4): e1000368.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000368>
 30. Charlat S, Duploux A, Hornett EA, Dyson EA, Davies N, Roderick GK, Wedell N, Hurst GD (2009) The joint evolutionary histories of *Wolbachia* and mitochondria in *Hypolimnas bolina*. *BMC Evol Biol* 9: 64.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-64>
 31. White JA, Kelly SE, Perlman SJ, Hunter MS (2009) Cytoplasmic incompatibility in the parasitic wasp *Encarsia inaron*: Disentangling the roles of *Cardinium* and *Wolbachia* symbionts. *Heredity* 102: 483–489.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2009.5>
 32. Li S, Xu X, De Mandal S, Shakeel M, Hua Y, Shoukat RF, Fu D, Jin F (2021) Gut microbiota mediate *Plutella xylostella* susceptibility to Bt CryIAc protoxin is associated with host immune response. *Environmental Pollution* 271: 116271.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116271>
 33. Sorokan' A, Benkovskaya G, Blagova D, Maksimova T, Maksimov I (2018) Defense Responses and Changes in Symbiotic Gut Microflora in the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* under the Effect of Endophytic Bacteria from the Genus *Bacillus*. *J Evol Biochem Physiol* 54: 300–307.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018040063>
 34. Gujar GT, Mittal A, Kumari A, Kalia V (2004) Host crop influence on the susceptibility of the American bollworm, *Helicoverpa armigera*, to *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73. *Entomol Exp Appl* 113:165–172.
<https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00223.x>
 35. Tu XY, Xia QW, Chen C, He HM, Xue F, Sen (2015) Geographic variation in developmental duration of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guené) (Lepidoptera: Crambidae) in China. *Acta Ecologica Sinica* 35(2): 324–332.
<https://doi.org/10.5846/stxb201303260512>
 36. Xia X, Sun B, Gurr GM, Vasseur L, Xue M, You M (2018) Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (L.). *Front Microbiol* 9: 25.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00025>

37. Benkovskaya G, Dubovskiy I (2020) Spreading of colorado potato beetle resistance to chemical insecticides in siberia and history of its settling in the secondary area. *Plant Protection News* 103: 37–39.
<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-1-37-39>
38. Yang F, Crossley MS, Schrader L, Dubovskiy IM, Wei S, Zhang R (2022) Polygenic adaptation contributes to the invasive success of the Colorado potato beetle. *Mol Ecol* 31: 5568–5580.
<https://doi.org/10.1111/mec.16666>
39. Shatalova EI, Grizanova EV, Dubovskiy IM (2022) The Effect of Silicon Dioxide Nanoparticles Combined with Entomopathogenic Bacteria or Fungus on the Survival of Colorado Potato Beetle and Cabbage Beetles. *Nanomaterials* 12(9): 1558.
<https://doi.org/10.3390/nano12091558>
40. Ashida M, Söderhäll K (1984) The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Ashida, M., & Söderhäll, K. (1984). The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comp Biochem Physiol Part B: Comp Biochem* 77(1): 21–26.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90217-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90217-7)
41. Wojda I, Kowalski P, Jakubowicz T (2004) JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 56(4): 143–154.
<https://doi.org/10.1002/arch.20001>
42. Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW (2001) Antioxidant defense systems of two lipidopteran insect cell lines. *Free Radic Biol Med* 30(11): 1254–1262.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00520-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00520-2)
43. Prabhakaran SK, Kamble ST (1993) Activity and electrophoretic characterization of esterases in insecticide-resistant and susceptible strains of German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J Econ Entomol* 86(4): 1009–1013.
<https://doi.org/10.1093/jee/86.4.1009>
44. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Ershova NS, Rantala MJ, Glupov VV (2011) The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Chemosphere* 85(1):92–96.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.039>
45. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22):7130–7139.
46. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:..
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
47. Dubovskiy IM, Martemyanov VV, Vorontsova YL, Rantala MJ, Gryzanova EV, Glupov VV (2008) Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (*Lepidoptera, Pyralidae*). *Com Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 148(1):1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.02.003>
48. Grizanova EV, Krytsyna TI, Kalmykova GV, Sokolova E, Alikina T, Kabilov M, Coates CJ, Dubovskiy IM (2023) Virulent and necrotrophic strategies of *Bacillus thuringiensis* in susceptible and resistant insects, *Galleria mellonella*. *Microb Pathog* 175: 105958. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105958>
49. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J (2014) An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2(1):6.
<https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
50. Lysko SB, Baturina OA, Naumova NB, Lescheva NA, Pleshakova VI, Kabilov MR (2021) No-Antibiotic-Pectin-Based Treatment Differently Modified Cloaca Bacteriobiome of Male and Female Broiler Chickens. *Agriculture* 12:24.
<https://doi.org/10.3390/agriculture12010024>
51. Edgar RC (2013) UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10(10):996–998.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
52. Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
53. Edgar R (2016) SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv* 074161.
<https://doi.org/10.1101/074161>
54. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16):5261–5267.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
55. Dubovskiy IM, Whitten MMA, Kryukov VY, Yaroslavl'tseva ON, Grizanova EV, Greig C, Mukherjee K, Vilcinskis A, Mitkovets PV, Glupov VV, Butt TM (2013) More than a colour change: Insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proc Royal Soc B: Biol Sci* 280(1763):20130584.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0584>
56. Safi NHZ, Ahmadi AA, Nahzat S, Ziapour SP, Nikookar SH, Fazeli-Dinan M, Enayati A, Hemingway J (2017) Evidence of metabolic mechanisms playing a role in multiple insecticides resistance in *Anopheles stephensi* populations from Afghanistan. *Malar J* 16: 100.
<https://doi.org/10.1186/s12936-017-1744-9>
57. Sayani Z, Mikani A, Mosallanejad H (2019) Biochemical Resistance Mechanisms to Fenvalerate in *Plutella xylostella* (*Lepidoptera: Plutellidae*). *J Econ Entomol* 112(3):1372–1377.
<https://doi.org/10.1093/jee/toz025>
58. Akiner MM (2014) [Malathion and propoxur resistance in Turkish populations of the *Anopheles maculipennis* Meigen (*Diptera: Culicidae*) and relation to the insensitive acetylcholinesterase]. *Türkiye parazitolojii dergisi / Türkiye Parazitoloji Derneği = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitol* 38:111–115.
<https://doi.org/10.5152/tpd.2014.3388>
59. Moustafa MAM, Moteleb RIA, Ghoneim YF, Hafez SS, Ali RE, Eweis EEA, Hassan NN (2023) Monitoring Resistance and Biochemical Studies of Three Egyptian Field Strains of *Spodoptera littoralis* (*Lepidoptera: Noctuidae*) to Six Insecticides. *Toxics* 11(3):211.

- <https://doi.org/10.3390/toxics11030211>
60. Yang XQ, Zhang YL (2015) Investigation of insecticide-resistance status of *Cydia pomonella* in Chinese populations. *Bull Entomol Res* 105(3): 316–325. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000115>
 61. Kryukov VY, Kabilov MR, Smirnova N, Tomilova OG, Tyurin MV, Akhanev YB, Polenogova OV, Danilov VP, Zhangissina SK, Alikina T, Yaroslavtseva ON, Glupov VV (2019) Bacterial decomposition of insects post-Metarhizium infection: Possible influence on plant growth. *Fungal Biology* 123(12): 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.012>
 62. Hackett KJ, Whitcomb RF, Clark TB, Henegar RB, Lynn DE, Wagner AG, Tully JG, Gasparich GE, Rose DL, Carle P, Bové JM, Konai M, Clark EA, Adams JR, Williamson DL (1996) *Spiroplasma leptinotarsae* sp. nov., a Mollicute uniquely adapted to its host, the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Int J Systematic Bacteriol* 46:906–911. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-906>
 63. Goretty CCM, Loera-Muro A, Thelma C, Julian AMC, David MSM, Aarón B (2019) Analysis of the bacterial communities and endosymbionts of natural populations of *Bemisia tabaci* in several crop fields from Mexico semi-arid zone. *Ann Microbiol* 69:.. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01483-6>
 64. Toju H, Fukatsu T (2011) Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: Relevance of local climate and host plants. *Mol Ecol* 20(4): 853–868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04980.x>
 65. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41): 15196–15199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604865103>
 66. Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(22): 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200231109>
 67. Engel P, Moran NA (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37(5):699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
 68. Xia X, Zheng D, Zhong H, Qin B, Gurr GM, Vasseur L, Lin H, Bai J, He W, You M (2013) DNA Sequencing Reveals the Midgut Microbiota of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) and a Possible Relationship with Insecticide Resistance. *PLoS One* 8. e68852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068852>
 69. Kikuchi Y, Yumoto I (2013) Efficient colonization of the bean bug *Riptortus pedestris* by an environmentally transmitted *Burkholderia* symbiont. *Appl Environ Microbiol* 79(6):2088–2091. <https://doi.org/10.1128/AEM.03299-12>
 70. Cheng D, Guo Z, Riegler M, Xi Z, Liang G, Xu Y (2017) Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome* 5:13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0236-z>
 71. Hrdina A, Serra Canales M, Arias-Rojas A, Frahm D, Iatsenko I (2024) The endosymbiont *Spiroplasma poulsonii* increases *Drosophila melanogaster* resistance to pathogens by enhancing iron sequestration and melanization. *mBio* 14;15(8):e0093624. <https://doi.org/10.1128/mbio.00936-24>
 72. Upfold J, Rejasse A, Nielsen-Leroux C, Jensen AB, Sanchis-Borja V (2023) The immunostimulatory role of an *Enterococcus*-dominated gut microbiota in host protection against bacterial and fungal pathogens in *Galleria mellonella* larvae. *Front Insect Sci* 3:1260333. <https://doi.org/10.3389/finsec.2023.1260333>
 73. Hoang KL, King KC (2022) Symbiont-mediated immune priming in animals through an evolutionary lens. *Microbiology (United Kingdom)* 168(4). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001181>
 74. Hamilton PT, Leong JS, Koop BF, Perlman SJ (2014) Transcriptional responses in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Mol Ecol* 23(6): 1558–1570. <https://doi.org/10.1111/mec.12603>
 75. Masson F, Rommelaere S, Marra A, Schüpfer F, Lemaitre B (2021) Dual proteomics of *Drosophila melanogaster* hemolymph infected with the heritable endosymbiont *Spiroplasma poulsonii*. *PLoS One* 16(4):e0250524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250524>
 76. Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, Perlman SJ (2010) Adaptation via symbiosis: Recent spread of a *drosophila* defensive symbiont. *Science* 329(5988):212–215. <https://doi.org/10.1126/science.1188235>
 77. Chertkova EA, Grizanov EV, Dubovskiy IM (2018) Bacterial and fungal infections induce bursts of dopamine in the haemolymph of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* and greater wax moth *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 153:203–206. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.020>
 78. Grizanov EV, Dubovskiy IM, Whitten MMA, Glupov VV (2014) Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 119:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.003>
 79. Zwick RK, Ohlstein B, Klein OD (2019) Intestinal renewal across the animal kingdom: comparing stem cell activity in mouse and *Drosophila*. *Am J Physiol-Gastrointestinal Liver Physiol* 316(3): G313–G322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00353.2018>
 80. Wu K, Yang B, Huang W, Dobens L, Song H, Ling E (2016) Gut immunity in Lepidopteran insects. *Dev Comp Immunol* 64: 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.010>
 81. Terra WR, Dias RO, Oliveira PL, Ferreira C, Venancio TM (2018) Transcriptomic analyses uncover emerging roles of mucins, lysosome/secretory addressing and detoxification pathways in insect midguts. *Curr Opin Insect Sci* 29: 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.015>
 82. St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1988) The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and

- infection by *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 52: 459–470.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(88\)90059-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(88)90059-6)
83. Hajek AE, St Leger RJ (1994) Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Ann Rev Entomol* 39: 293–322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.39.1.293>
 84. Rahman MM, Roberts HLS, Sarjan M, Asgarit S, Schmidt O (2004) Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2696–2699.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0306669101>
 85. Ayres JS, Schneider DS (2008) A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. *PLoS Biol* 6(12):2764–2773.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060305>
 86. Khan MM, Kaleem-Ullah RM, Siddiqui JA, Ali S (2020) Insecticide Resistance and Detoxification Enzymes Activity in *Nilaparvata lugens* Stål Against Neonicotinoids. *J Agricult Sci* 12: 24–36.
<https://doi.org/10.5539/jas.v12n5p24>
 87. Siddiqui JA, Fan R, Naz H, Bamisile BS, Hafeez M, Ghani MI, Wei Y, Xu Y, Chen X (2023) Insights into insecticide-resistance mechanisms in invasive species: Challenges and control strategies. *Front Physiol* 13: 1112278.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1112278>
 88. Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2558–2563.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2558-2563.2005>
 89. Grizanov EV, Semenov AD, Komarov DA, Chertkova EA, Slepneva IA, Dubovskiy IM (2018) Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response. *Arch Insect Biochem Physiol* 98(4): e21460.
<https://doi.org/10.1002/arch.21460>
 90. Munday R, Winterbourn CC (1989) Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. *Biochem Pharmacol* 38(24): 4349–4352.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90641-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90641-2)
 91. Sies H (1991) Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 91(3C): 31S–38S.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSE, INTESTINAL MICROBIOTA AND SUSCEPTIBILITY TO *BACILLUS THURINGIENSIS* BACTERIA OF THE COLORADO POTATO BEETLE *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*

D. S. Tereshchenko^a, E. V. Grizanov^a, E. V. Shelikhova^a, T. J. Alikina^b,
 M. R. Kabilov^b, and I. M. Dubovskiy^{a, #}

^a*Novosibirsk State Agrarian University, Department of Plant Protection, 630039, Novosibirsk, Russia.*

^b*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch
 of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia.*

[#]*e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com*

Biological insecticides based on *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bacteria are highly specific in their action against various types of insects and are considered safe for the environment. One of the most common pests of nightshade crops worldwide is the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Due to its wide distribution across different climatic regions and rapid development of resistance to chemical insecticides, it raises questions about the mechanisms behind its ecological plasticity and rapid resistance formation to biological insecticides. In this study, we investigated indicators of cellular and humoral immunity, enzyme activity in the antioxidant and detoxification systems, gut microbiota, and susceptibility to *Bt* bacteria in larvae of Colorado potato beetles from different areas of the Novosibirsk Region (NSO). The total number of hemocytes and lysozyme-like antibacterial activity in the hemolymph of insects from the Vengerovsky district of NSO was 1.5–2 times higher than in larvae from the Ordynsky district of NSO. The activity of detoxification enzymes in the intestines and fat body of larvae from Ordynsky increased by 1.7–2.5 times compared to the Hungarian insect group. It has been shown that bacteria of the family *Enterobacteriaceae* and genera *Citrobacter* are the dominant groups of intestinal microbiota in both regions of NSO, but bacteria of the genus *Spiroplasma* predominate in larvae from Ordynsky. It was also found that insects did not differ in their level of sensitivity to *B. thuringiensis*, the development of bacterial infection in the intestines of Colorado potato beetles from different parts of their range causes a two- to three-fold increase in phenoloxidase activity in the hemolymph, while a 1.5-fold increase in the total number of hemocytes has also been recorded in insects from the Ordynsky district in NSO. This suggests that insects from different geographical populations are able to effectively develop a protective strategy against entomopathogens through a balance between innate and induced resistance mechanisms.

Keywords: Resistance, phenoloxidase, hemocytes, entomopathogens, intestinal immunity, metabarcoding, 16S rRNA gene