



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

www.sciencejournals.ru

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



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 2, 2023

Все статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в "Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology" ISSN 0022-0930, ©Pleiades Publishing, Ltd.

ОБЗОРЫ

Обработка информации головным мозгом во время сна:
эволюционный и экологический подходы

В. М. Ковальзон

79

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Анализ состава фракции из осмотически активных белков сыворотки крови
атлантической трески *Gadus morhua*

*А. М. Андреева, З. М. Базарова, И. Ю. Торопыгин, А. С. Васильев,
Р. А. Федоров, П. А. Павлова, Д. В. Гарина*

90

Объем гиппокампа и спектр нейрометаболитов у зрелых серых крыс (*Rattus norvegicus*),
селекционируемых по реакции на человека: влияние ранней социальной нестабильности

*С. Г. Шихевич, А. Е. Акулов, Р. В. Кожемякина, М. П. Мошкин,
Ю. Э. Гербек, Р. Г. Гулевич*

100

Морфологическая асимметрия антенн и поведенческие асимметрии
при груминге у таракана *Periplaneta americana* L.

М. И. Жуковская, Е. С. Новикова

112

Профиль молекулярных маркеров фиброза у крыс при воздействии
различных доз доксорубина

*Е. Ю. Подъячева, Т. В. Шмакова, Д. Д. Андреева, Р. И. Торопов,
Ю. В. Чебуркин, М. С. Данильчук, С. А. Осипова, М. О. Мартынов, Я. Г. Торопова*

121

Электрические характеристики мембраны и параметров потенциала
действия пары идентифицированных электрически связанных нейронов
Lutjanus stagnalis при пролонгированной экспериментальной гипергликемии

А. В. Сидоров, В. Н. Шаденко

131

Contents

Vol. 59, No. 2, 2023

REVIEWS

- Cerebral information processing during sleep: Evolutionary and ecological approaches
V. M. Kovalzon 79
-

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Analysis of the Composition of Osmotically Active Protein Fraction
in Blood Serum from Atlantic Cod *Gadus morhua*
*A. M. Andreeva, Z. M. Bazarova, I. Yu. Toropygin, A. S. Vasiliev,
R. A. Fedorov, P. A. Pavlova, and D. V. Garina* 90
- Hippocampal Volume and the Spectrum of Metabolites
in Adult Gray Rats (*Rattus norvegicus*) Selected for Different Attitudes
to Humans and Exposed to Social Disturbance in Early Life
*S. G. Shikhevich, A. E. Akulov, R. V. Kozhemyakina, M. P. Moshkin,
Y. E. Herbeck, and R. G. Gulevich* 100
- Morphological Asymmetry of Antennae and Behavioral Asymmetries
During Grooming in the Cockroach *Periplaneta americana* L.
M. I. Zhukovskaya, and E. S. Novikova 112
- Molecular Markers Profile of Fibrosis in Rats Exposed to Different Doses of Doxorubicin
*E. Yu. Podyacheva, T. V. Shmakova, D. D. Andreeva, R. I. Toropov,
Yu. V. Cheburkin, M. S. Danilchuk, M. O. Martynov, and Ya. G. Toropova* 121
- Membrane Electrical Properties and Spike Characteristics in a Pair of Identified Electrically
A. V. Sidorov, V. N. Shadenko 131
-
-

ОБРАБОТКА ИНФОРМАЦИИ ГОЛОВНЫМ МОЗГОМ ВО ВРЕМЯ СНА: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОДЫ

© 2023 г. В. М. Ковальзон

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

e-mail: kovalzon@sevin.ru

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 15.01.2023 г.

Принята к публикации 16.01.2023 г.

На основе анализа обширного клинического, психофизиологического и экспериментального материала автор приходит к выводу о неприменимости широко распространенного представления о том, что в процессе сна происходит обработка информации, полученной в предшествующем бодрствовании, необходимая для формирования долговременной памяти и других когнитивных ресурсов головного мозга. Эта гипотеза плохо согласуется с целым рядом данных в отношении медленного (медленноволнового) и быстрого (парадоксального, REM) сна. Состояние коры большого мозга в фазе медленного сна более адекватно описывается классическим термином “разлитое корковое торможение”. Что касается быстрого сна, то и здесь весьма интенсивная работа головного мозга никакой адаптивной роли (по крайней мере, для взрослого организма) не играет – информация обрабатывается, образно говоря, “вхолостую”. Весь накопленный в последние десятилетия громадный экспериментальный и клинический материал говорит в пользу “экологической” гипотезы, рассматривающей сон как периоды “адаптивной неактивности” организма, повышающие его выживаемость в условиях враждебной среды. Функция сна, возможно, состоит в радикальной перестройке всех рефлексов бодрствования для нормального протекания таких периодов.

Ключевые слова: сон, бодрствование, медленный сон, быстрый сон, обработка информации мозгом, экология, эволюция

DOI: 10.31857/S0044452923020031, **EDN:** VIKTTL

В настоящее время общепринято сравнение головного мозга с информационной машиной – аналоговой или аналогово-цифровой [1]. Понятно, какую информацию обрабатывает нервная ткань в состоянии бодрствования – это афферентные сигналы, приходящие от органов чувств в режиме реального времени (*on-line*), называемые сенсорным притоком. Эти сигналы изучает физиология сенсорных систем, и об их обработке многое известно. Хорошо изучено также формирование так называемого “приобретенного” поведения: новых навыков, образующихся при обучении благодаря ассоциативным связям и другим характеристикам сенсорных систем. Анализ сенсорного притока происходит в тесном взаимодействии с “эндогенными” сигналами, связанными с врожденными программами поведения. Однако каким образом происходит это наследственное кодирование поведения и как оно передается в нейрональную память – об этом пока не известно ничего. Ясно, во всяком случае, что вся эта информация обрабатывается головным мозгом человека и других млекопитающих в бодрствовании *on-line* и *off-line*.

Однако возникает естественный вопрос – а как происходит обработка информации головным мозгом во сне, занимающем значительную часть времени суток (у человека – 33%, у большинства млекопитающих и птиц – 50% и более), и какое значение имеет эта обработка для организма и поведения? Логически возможны три варианта: информация во сне обрабатывается либо *off-line*, либо *on-line*, либо вовсе не обрабатывается. Известно, что сон млекопитающих и птиц состоит из двух различных состояний, или фаз – медленного (медленноволнового, NREM) и быстрого (парадоксального, REM) сна, – столь же отличных друг от друга, сколь и от бодрствования [2]. Поэтому мы рассмотрим все варианты ответа на поставленный вопрос – отдельно для медленного и для быстрого сна.

ОБРАБОТКА ИНФОРМАЦИИ ГОЛОВНЫМ МОЗГОМ В МЕДЛЕННОМ СНЕ *OFF LINE*

Идея о том, что в процессе сна происходит какая-то переработка той информации, которая была получена в предшествующем бодрствовании, воз-

никла с появлением первых счетно-решающих устройств. И по сию пору эта идея является повсеместно принятой — она высказывается во всех без исключения книгах и учебниках по нейро- и психофизиологии и в большинстве обзорных статей по проблеме сна. Считается, что мозг и во сне способен к обработке поступающих сенсорных сигналов, поскольку “полная изоляция от внешней среды представляла бы огромный эволюционный риск”. Ряд исследований, особенно появившихся в последнее десятилетие, указывает на ограниченную возможность некоторых форм обучения, в частности, выработки при определенных условиях классических условных рефлексов во сне [3]. Предполагается, что это основная (или одна из основных), жизненно необходимая функция сна, ответственная за его восстановительные свойства по отношению к организму в целом.

Однако уже в первых исследованиях нейронной активности подопытных животных в естественном цикле сон-бодрствование эта гипотеза была поставлена под сомнение. Как хорошо известно, при переходе от бодрого состояния к медленному сну “индивидуальный” характер разрядов пирамидных нейронов неокортекса сменяется на “хоровой” режим “пачка-пауза” [4, 5]. При этом происходит резкая смена длительной предельной гиперполяризации — глубокого торможения клеток (до -75 мВ, в отдельных случаях — до -90 мВ) и предельной деполяризации (-61 мВ), сопровождаемой экзальтацией — мощными вспышками потенциалов действия. Такой характер работы нейронов, порождающий в суммарной ЭЭГ ритм сонных веретен и дельта-волн, крайне неблагоприятен для приема, переработки и передачи информации нейронами. Основываясь на своих работах с Д. Риццоллати в Университете Пармы и на других исследованиях итальянских авторов, выполненных в конце 1960-х — начале 1970-х годов путем внеклеточной регистрации активности одиночных нейронов на ненаркотизированных кошках, Л.М. Мухаметов¹ писал в 1977 г.: “...на фоне рисунка “пачка-пауза” для нормального поступления информации в систему таламус-кора возникает барьер на таламическом уровне. По этим же причинам должно быть затруднено распространение информации по таламусу между его различными ядрами и по различным полям коры головного мозга. Следовательно, во время медленного сна на кортикоталамическом уровне обработка информации существенно затруднена. На этом основании можно высказать предположение, что во время медленного сна (в отличие от быстрого) невозможно координированное осуществление сложных психических функций” [6].

В дальнейшем результаты исследований итальянской школы были полностью подтверждены и

развиты И. Тимофеевым и другими сотрудниками лаборатории М. Стериале (Лаваль, Квебек, Канада) [4, 5], а также в лабораториях США и других стран [7]. Однако ни один исследователь “не посмел” сделать столь радикального вывода, как приведенный выше. Все они оставались в рамках традиционной парадигмы относительно “переработки в медленном сне информации, полученной в предшествующем бодрствовании, необходимой для формирования долговременной памяти” и т.д. Считалось и считается, что эта функция глубокого медленного сна (стадии 3 у человека, или “дельта-сна”) жизненно важна, так как именно эта стадия первой восстанавливается после более или менее длительного периода лишения или ограничения продолжительности сна как у человека, так и у подопытных животных.

Но ведь такое поведение нейронов таламокортикального комплекса, субстрата высших психических функций человека, и есть, собственно говоря, то самое “разлитое корковое торможение”, с гениальной интуицией предсказанное И.П. Павловым сто лет назад. Казалось бы, современные представления об “активности спящего мозга” навсегда “похоронили” эту Павловскую гипотезу. Однако все дело в том, что раньше такое состояние неправильно понимали, как “выключение” нейронов из их активной работы. Такое тоже имеет место, но только у холоднокровных позвоночных в состоянии покоя, когда организм животного остывает [8]. У млекопитающих эти нейроны никогда не “замолкают”, но лишь перестраивают свою работу, коренным образом меняя рисунок разрядов в медленном сне. При этом по коре быстро распространяются тормозные процессы, опосредуемые активностью длинноаксонных нейронов “центров сна” в вентролатеральной и срединной преоптической области, в базальной области переднего мозга и в ретикулярном таламическом ядре, а также короткоаксонных интернейронов самой коры. Все эти клетки выделяют ГАМК — главный тормозный медиатор головного мозга, а также тормозные нейропептиды — галанин, меланин-концентрирующий гормон и др. Кроме того, в местах скопления тормозных нейронов повышается концентрация аденозина, основного модулятора перевода организма из бордствующего в сонное состояние, опосредуемого рецепторами A2A [9]. Возникающее в фазе медленного (но, разумеется, не быстрого!) сна состояние новой коры (точнее, таламокортикального комплекса) вполне адекватно описывается термином “разлитое корковое торможение”.

Кроме результатов прямого изучения нейронной активности, со временем накапливается все больше косвенного материала — клинического, психофизиологического и экспериментального, который в рамки традиционных представлений об “обработке информации мозгом” как жизненно важной функции сна, без которой организм

¹ О жизни Л.М. Мухаметова и его вкладе в науку — см. [56].

не может обойтись, никак не укладывается. Такие представления, в рамках которых развивается современная сомнология, Ю.В. Панчин назвал “*Indispensable Sleep Scenario, ISS*” (“сценарий обязательного сна”) [10]. Так, в историю медицины вошел уникальный случай многомесячной агрипнии (полного отсутствия сна), описанный М. Жуве. Это был большой редкой болезнью, называемой хоррея Морвана, который находился под круглосуточным непрерывным полисомнографическим контролем в течение четырех месяцев в 1974 г., вплоть до своей смерти (которая последовала, несмотря на все усилия врачей спасти его). Этот пациент сохранял способность к нормальной умственной деятельности; оставалась совершенно ненарушенной его кратковременная и долговременная память, а также способность к обучению и концентрации внимания. “Система бодрствования нашего больного показала [...] исключительную неустойчивость на протяжении нескольких месяцев в отсутствие активной системы сна, призванной ее тормозить [...]. Человек, лишенный в течение четырех месяцев сна и сновидений, от которых осталось лишь нескольких минут ночных галлюцинаций, оказывается, может днем читать газеты, составлять планы, играть в карты и выигрывать, и при этом лежать в темноте на кровати всю ночь без сна!.. Получается, что медленный и парадоксальный сон не являются необходимыми для жизни...” [11].

В дальнейшем были описаны еще несколько подобных клинических случаев полного выпадения всего сна [12, 13]. Кроме этого имеются полисомнографически подтвержденные данные (в том числе приводимые самим Жуве в вышеупомянутой книге) о “малоспящих” людях, не испытывающих ни повышенной дневной сонливости, ни каких-либо особых психологических или физиологических затруднений [14, 15]. Показано, что некоторые вариации генома (в рамках популяционного полиморфизма) сильно сокращают сон человека без каких-либо побочных эффектов. Несколько человеческих мутаций, сильно влияющих на этот фенотип, были недавно идентифицированы прямым генетическим скринингом в семьях с так называемым естественным коротким сном (FNSS). Члены таких семей спят 4–6 ч в сутки (т.е., 3–4 цикла вместо 5–6 в норме), чувствуют себя хорошо отдохнувшими и не проявляют явных нарушений, обычно возникающих при хроническом недосыпании. Одна из таких мутаций связана с часовыми генами [16], другая – с $\beta 1$ -адренорецептором [17], третья – с рецептором 1-го типа нейропептида S [18]. Все эти гены кодируют разные семейства белков без очевидного функционального перекрытия или участия в общих известных сигнальных путях. Экспериментальное внедрение таких мутаций в геном мышей также приводило к сокращению суточной представленности (доли) медленного сна. Полученные в результате подобных генноинженерных

манипуляций “короткоспящие” линии лабораторных мышей также существуют без видимых поведенческих нарушений и сокращения продолжительности жизни.

Хотя “неспящие” животные в дикой природе не обнаружены, но колоссальный разброс средней ежесуточной продолжительности естественного сна (от двух часов у слонов [19] до 20 ч у некоторых видов летучих мышей [20]) также плохо совместим с гипотезой “обработки информации”. Как отмечается в многочисленных обзорно-теоретических работах на эту тему, все звери, обладающие экологическим преимуществом “безопасного сна”, всегда используют его в полной мере – у них суммарная суточная продолжительность сна высокая (12 ч и выше). А тем млекопитающим, которые в силу своей экологии являются жертвами хищников, либо питаются низкокалорийной растительной пищей и вынуждены тратить большую часть времени суток на ее поиски, кормление и пережевывание, – приходится довольствоваться минимальной продолжительностью суточного сна (2–4 ч) [21]. Таким образом, обнаруживается высокая корреляция продолжительности сна с образом жизни, экологией данного вида, а вовсе не с его “когнитивным уровнем” (что можно было бы ожидать, исходя из гипотезы “обработки информации”): человек и некоторые наиболее “умные” млекопитающие, например, слоны, относятся к наименее спящим видам.

У птицы – большого фрегата – во время многосуточного “беспосадочного” полета зарегистрировано по ЭЭГ лишь менее 7% (40 мин/24 ч) той продолжительности сна, которая отмечается у него на суше (7 ч/24 ч). Однако по возвращении в гнездо выраженной “отдачи” сна не наблюдалось [22]. Иными словами, *потребность во сне* практически исчезала на время полета и вновь возвращалась при приземлении. Некоторые птицы значительно сокращают суточную продолжительность сна в период спаривания. В результате самцы, которые спят меньше, спариваются с большим числом самок. Судя по частоте встречаемости птиц и их выживаемости, сокращение продолжительности сна в период размножения не имеет негативных последствий для их физиологического состояния [23]. Все это также плохо согласуется с вышеизложенной гипотезой “обработки информации” во сне.

В последние годы все более широкое распространение получает представление о наличии психической активности в фазе медленного сна, якобы “неотличимой” от сновидений быстрого сна [24]. Такие взгляды связаны, на наш взгляд, с чрезмерно доверчивым, некритическим отношением исследователей и врачей к так называемым “отчетам” испытуемых и пациентов, а по сути – к их безответственному резонерству. Сторонники подобных рассуждений почему-то упускают из вида то про-

стое соображение, что, если бы это действительно было так, то означало бы полный разрыв между ЭЭГ и психическими процессами: не только различные психические процессы могут происходить на одном и том же ЭЭГ-фоне (что хорошо известно), но и одинаковые психические процессы — на совершенно различном ЭЭГ-фоне! На самом деле психическая активность в медленном сне, если не исчезает полностью, то носит иной характер, и ее главное отличие от сновидений быстрого сна — отсутствие ярко выраженной эмоциональности. Состояние сознания в медленном сне следует обозначать другими терминами: гипнагогические галлюцинации (в стадии 1), “мыслеподобная” активность (в стадиях 2 и 3). В целом наиболее “надежные” психологические исследования — опросы пациентов и здоровых испытуемых непосредственно при пробуждении из разных стадий сна, — несомненно, свидетельствуют в пользу вышеприведенного предположения Л.М. Мухаметова (полувековой давности!), что во время медленного сна (в отличие от быстрого) невозможно (или, по крайней мере, значительно затруднено) координированное осуществление сложных психических функций.

ОБРАБОТКА ИНФОРМАЦИИ ГОЛОВНЫМ МОЗГОМ В МЕДЛЕННОМ СНЕ *ON-LINE*

Несколько лет назад И.Н. Пигарев² опубликовал оригинальную гипотезу функционального назначения медленного сна. Согласно его предположению, основанному на собственных экспериментах с помощью внеклеточной регистрации активности одиночных нейронов на ненаркотизированных кошках, во время медленного сна продолжается обработка зрительной и слуховой корой мозга информации в режиме реального времени, но уже не экстеро-, а интероцептивной. Висцеральная гипотеза сна, названная им теорией, предполагает, что во сне (имеется в виду, очевидно, медленный сон) центральная нервная система, в частности, кора больших полушарий, переключается с анализа экстероцептивной информации на анализ сигналов, поступающих от интероцепторов, распределенных во всех системах живого организма [25]. При смене корковой афферентации во сне изменяются направления и эфферентных потоков из коры мозга, переключающихся со структур, обеспечивающих поведение в окружающей среде, на структуры, обеспечивающие эффективную работу всех висцеральных систем. Пигарев полагал, что многие патологические состояния, связанные с циклом сон-бодрствование, могут быть объяснены нарушениями синхронности переключений потоков информации в кору мозга и из коры при переходе от бодрствования ко сну и обратно.

² О жизни И.Н. Пигарева и его вкладе в науку — см. [57].

Надо сказать, что гипотеза Пигарева получила широкую известность, не раз подвергалась серьезной критике (указывалось, в частности, что факт реакции на стимул не обязательно означает, что клетка анализирует “информацию”), но за все прошедшие годы не получила ни независимых подтверждений, ни опровержений. Она коренным образом противоречит “энцефалоцентрической” идее известного гарвардского сомнолога А. Хобсона, провозгласившего в свое время: “Сон мозга, из мозга и для мозга” (“*sleep is of the brain, by the brain and for the brain*”) [26], но также плохо согласуется и с идеей Л.М. Мухаметова, и со всеми другими вышеизложенными контраргументами в отношении гипотезы “переработки информации” во сне (неважно, какой — экстеро- или интероцептивной). Высказывалось предположение, что нейрофизиологической основой гипотезы И.Н. Пигарева могут служить низкопороговые кальциевые каналы, локализованные на some нейронах. Оптимальными условиями для их срабатывания, действительно, являются именно гиперполяризационные изменения мембранного потенциала, доминирующие в медленном сне [5]. Однако такие процессы должны быть в той же мере пригодны и для обработки экстероцептивных сигналов. Но экспериментальных подтверждений, ни тому, ни другому, пока не получено.

Резюмируем все эти разрозненные аргументы по обработке информации головным мозгом в медленном сне, а именно:

А. Нейрофизиологический аргумент

(1) переход пирамидных нейронов таламо-кортикального комплекса на время медленного сна в “хоровой” режим импульсации “пачка—пауза”, малопригодный для обработки информации;

Б. Клинический аргумент

(2) *case report* — описание больного хореей Морвана, не спавшего ни минуты на протяжении 4 мес. (под непрерывным ЭЭГ-контролем) без всякой потребности во сне и без каких-либо когнитивных нарушений;

В. Генетические аргументы

(3) обнаружение популяционных генных полиморфизмов, приводящих к значительному укорочению ночного сна человека без всяких признаков дневной сонливости или каких-либо когнитивных нарушений;

(4) создание генетически модифицированных линий мышей со значительно укороченным суточным сном, не демонстрирующих ни нарушений поведения, ни сокращения продолжительности жизни;

В. Экологические аргументы

(5) обнаружение связи продолжительности суточного сна с экологией данного вида, а не с его “интеллектом”;

(б) временное исчезновение *потребности во сне* в связи с экологической необходимостью у некоторых видов птиц.

Из всего этого, несколько утрируя, но не слишком, можно сделать предварительный вывод о том, что *в медленном сне фактически никакой обработки информации головным мозгом не происходит*. Образно говоря, во время медленного сна таламокортикальная система находится в режиме функциональной изоляции, своего рода “холостого хода”. Такой вывод можно рассматривать в пользу классической гипотезы “разлитого коркового торможения”, происходящего во время медленного сна.

ОБРАБОТКА ИНФОРМАЦИИ ГОЛОВНЫМ МОЗГОМ В БЫСТРОМ СНЕ *OFF LINE*

Быстрый, или парадоксальный (REM) сон — это особое состояние организма теплокровных животных, характеризующееся исключительно высокой активацией головного мозга на фоне “отключения” сенсорных систем и глубокого торможения спинного мозга [2]. Нет сомнений в происходящей в быстром сне весьма интенсивной переработке информации головным мозгом [27]. Многочисленные доказательства этому получены и на нейронном, и на метаболическом уровне. Об этом же говорят и психологические исследования — отчеты испытуемых и пациентов об эмоционально насыщенных, ярких сновидениях. При всех хорошо изученных радикальных различиях между двумя фазами сна есть одно очень важное, что их объединяет: это функциональная изоляция переднего мозга как от афферентных, так и от эфферентных потоков. И если последние изучены в быстром сне довольно хорошо, что связано с такими патологиями, как нарколепсия с катаплексией [28], расстройства поведения в быстром сне (RBD) [29] и синдром беспокойных ног (RLS) [30], то блокада сенсорных входов в быстром сне остается почти неизученной. Тем не менее не будет большой ошибкой предположить, что информация в быстром сне обрабатывается главным образом (если не исключительно) *off-line*. Эта информация, образы, извлекаемые из памяти спящим, но высокоактивным головным мозгом, причудливым образом деформируются и комбинируются, реализуясь на психическом уровне в виде особого измененного сознания — ярко эмоционально окрашенных сновидений, которые, видимо, очень плохо запоминаются. Результаты нейросканирования показывают значительное снижение кровотока и обмена в области дорзолатеральной префронтальной коры, которая в нейропсихологии считается зоной, вовлеченной в процесс формирования рабочей памяти [31].

Как известно, быстрый сон преобладает в раннем онтогенезе; так, у новорожденного ребенка половину времени всего сна (8 ч из 16) занимает так называемый активированный сон, который счита-

ется предшественником быстрого сна взрослых. По мере созревания мозговой ткани суточная продолжительность быстрого сна снижается и по прекращении нейрогенеза, в возрасте 5–9 лет, достигает взрослых значений (1.5–2 ч за ночь) [32]. Как писали Ф. Крик и Г. Митчисон [33], если пытаться объяснить функцию быстрого сна (REM-сна, по их терминологии) с точки зрения биологии развития (как необходимый элемент клеточной пролиферации, процесса созревания и формирования нервной системы), то остается непонятным, зачем эта фаза сна сохраняется у взрослых людей и животных (причем, у некоторых видов — весьма значительный ее процент), когда митозы нервных клеток давно завершены? Если же объяснять функцию быстрого сна с психологической точки зрения (для реализации сновидений, поисковой активности, эмоционального равновесия, формирования долговременной памяти, перевода генетической информации в нейробиологическую и т.д. и т.п.), то непонятно, почему же это состояние доминирует именно в раннем онтогенезе (когда ни сознания, ни поведения, ни памяти в явном виде еще нет) и резко сокращается при созревании “высших психических функций”?

Неожиданными для авторов всех этих гипотез явились сообщения о том, что среди нас, оказывается, есть люди с полным (или почти полным) отсутствием быстрого сна, прекрасно живущие и успешно работающие много лет. И у них не наблюдается никакого ухудшения памяти и дефицита когнитивных способностей. В первую очередь речь идет об известном пациенте израильского сомнолога П. Лави [34]. Этот мужчина в возрасте 20 лет получил тяжелое шрапнельное ранение в голову — металлические осколки застряли в его стволе мозга, таламусе и мозжечке. После травмы он 10 дней находился в коме, еще две недели оставался в критическом состоянии, но затем постепенно восстановился, завершил образование, стал профессиональным юристом, художником-любителем и даже подрабатывал составлением кроссвордов в городской газете. Когда ему было 33 года, родственники отвезли его в лабораторию сна Университета Технион в Хайфе. Причиной стали его ночные крики во сне, похожие на те, которые иногда издают дети (*pavor nocturnus*). Полисомнографические записи у этого пациента проводились в лаборатории в течение 8 ночей. Он мало спал — в среднем 4.5 ч (т.е. 3 нормальных цикла), но сама цикличность была нарушена и, к удивлению врачей, у него вообще не было эпизодов быстрого сна в первые 3 ночи. Затем такие эпизоды стали появляться в конце всего периода сна, под утро, но были очень короткими — в среднем один эпизод за ночь продолжительностью 6 мин (вместо обычных 4–6 эпизодов суммарной продолжительностью 1.5–2 ч). У этого пациента не наблюдалось никакого ухудшения интеллекта и

памяти. Несмотря на инвалидность, он работал и вел нормальный образ жизни.

Через 35 лет этого человека разыскали и вновь подвергли тщательному полисомнографическому обследованию в сочетании с психологическим тестированием [35]. Теперь ему было уже 68 лет. В лаборатории он спал в среднем по 6 ч за ночь (т.е. 4 цикла), и быстрый сон занимал в среднем 16 мин (от 0 до 3 коротких эпизодов в конце сна). Тестирование выявило абсолютно нормальные показатели по всем шкалам (уровень от среднего до выше среднего), включая память, интеллект и когнитивные способности. Таким образом, человек, практически всю свою взрослую жизнь проживший (почти) без быстрого сна, не продемонстрировал никаких нарушений, которые можно было бы отнести на счет его отсутствия. П. Лави заявил, что “он, наверное, самый нормальный человек, которого я знаю, и один из самых успешных” [36].

Разумеется, такие случаи крайне редки – обычно разрушения в ростральной области ствола несовместимы с жизнью. Однако опубликована еще пара свидетельств того, что изредка люди с ограниченными поражениями в этой области и полным (или почти полным) выпадением REM сна могут постепенно восстанавливаться и вести нормальный образ жизни, причем ни в одном случае не наблюдалось никаких когнитивных нарушений [37]. Другое свидетельство возможности “жить без быстрого сна” предоставлено психофармакологией. Хорошо известно, что большая часть антидепрессантов (трициклические препараты и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина – СИОЗС) глубоко подавляют быстрый сон. Особенно эффективны в этом отношении ингибиторы MAO, которые могут практически полностью подавлять быстрый сон на месяцы и годы. А СИОЗС обладают способностью подавлять быстрый сон без последующей отдачи, т.е. устранять саму *потребность* в быстром сне. Миллионы пациентов во всем мире принимали и принимают эти лекарства. Не было зарегистрировано ни одного случая когнитивных нарушений; вместо этого есть некоторые доказательства того, что ингибиторы MAO и СИОЗС даже улучшают память! Напротив, последнее поколение бензодиазепинов, используемых в качестве снотворных и практически не нарушающих продолжительность и распределение быстрого сна, оказывает выраженное пагубное влияние на память из-за воздействия этих препаратов на сигнальную систему ГАМК [38].

Недавно исследователями из Японии была обнаружена особая роль определенных мускариновых рецепторов в регуляции быстрого сна. Были выявлены два мускариновых рецептора из пяти существующих, нокаутирование гена каждого из которых значительно нарушает нормальное протекание быстрого сна у мышей: нокаутирование гена

Chrm3 вызывает фрагментацию быстрого сна, а гена *Chrm1* – сокращение его продолжительности. Но самый удивительный результат ожидал Niwa и соавт., когда они произвели дабл-нокаут по обоим генам. У этих мышей быстрый сон вообще исчез [39]. К сожалению, ничего не сообщается о фенотипировании этих мышей, за исключением структуры цикла бодрствование-сон, но отмечают их “неожиданную жизнестойкость, несмотря на почти полное отсутствие REM-сна”. Yamada и соавт. задаются вопросом, действительно ли быстрый сон играет столь важную роль в организме, включая процессы обучения и памяти, какую ему приписывают? – и ссылаются при этом на вышеупомянутые широко известные гипотезы [40].

Животный мир демонстрирует колоссальную вариабельность суточной представленности (доли) быстрого сна у взрослых особей, еще большую, чем таковая для медленного сна. Как уже говорилось, многие представители эволюционно древних видов млекопитающих демонстрируют высокий процент быстрого сна (>20%). Кроме того, высокий процент показывают взрослые млекопитающие с “безопасными” условиями сна (например, в глубоких норах), обычно имеющие относительно короткий срок беременности и рождающие незрелых (*altricial*) детенышей с высоким процентом активированного сна (например, хищные и многие грызуны). Наоборот, млекопитающие, спящие в дикой природе без особого укрытия, непосредственно на поверхности земли (копытные, морские свинки и др.), имеющие длительный срок беременности и рождающие зрелых (*precocial*) детенышей с исходно низким процентом быстрого сна, демонстрируют низкий процент этой фазы сна и во взрослом состоянии (<10% всего сна) [41].

Аналогичные закономерности отмечены и у птиц [23]. Хотя в целом доля быстрого сна у них значительно ниже, чем у млекопитающих, а его эпизоды короче, но, тем не менее, более древние виды птиц (древнепещерные, или бескилевые), например, страусы, демонстрируют более высокий процент быстрого сна и более длительные его эпизоды, чем более эволюционно молодые виды (новопещерные) [42]. Есть такие виды птиц, которые вылупляются из яиц незрелыми, а есть такие, что более зрелыми. У первых, как и у млекопитающих, более высокий исходный уровень быстрого сна и, соответственно, более высокий его уровень во взрослом состоянии, чем у вторых [43].

Наконец, исследователей всегда поражал тот факт, что у многих видов птиц и мелких млекопитающих эпизоды быстрого сна настолько короткие (не более нескольких секунд), что за такой период не может завершиться никакая биохимическая реакция, и очень трудно представить себе “переработку информации” и “формирование памяти” головным мозгом столь короткими порциями.

Сильный удар по сторонникам гипотезы “обработки мозгом значимой информации и консолидации памяти в быстром сне” нанесло обнаружение животных, не имеющих этой фазы сна вообще. Впервые, речь идет о ехидне – особом виде однопроходных (яйцекладущих) млекопитающих, отделившихся от основной эволюционной ветви еще в самом ее зарождении. Несмотря на специальное изучение тремя разными группами исследователей, наличие быстрого сна у этого животного остается под вопросом [43]. Во-вторых, речь, разумеется, идет о таком широко известном факте, как отсутствие быстрого сна у дельфинов [44, 45] Под руководством Л.М. Мухаметова и О.И. Лямина двумя поколениями исследователей на Утришской морской станции ИПЭЭ РАН были проведены изучения сна-бодрствования у четырех разных видов зубатых китов, включая амазонского речного дельфина. Были предприняты значительные усилия по выявлению каких-либо, хотя бы фрагментарных, эпизодов быстрого сна у этих животных. Эти усилия включали длительные видеозаписи в сочетании с бескабельной полисомнографической регистрацией с помощью вживленных внутричерепных электродов и миниатюрных автономных рекордеров, закрепленных на теле животных, в условиях свободного плавания в экспериментальном бассейне. Однако за весь этот 40-летний период не удалось выявить ни одного такого эпизода [46, 47].

Еще более удивительные результаты были получены той же группой исследователей при полисомнографическом изучении цикла сон-бодрствование ушастых тюленей (морских котиков, морских львов, сивучей) [47, 48]. Сезон размножения эти животные проводят на лежбищах, а большую часть года в погоне за косяками рыбы проводят в океане, где вынуждены спать в воде. Ученые симитировали эту ситуацию, построив в бассейне помост, который может находиться над водой или под водой, в зависимости от ее уровня. И выяснилось, что когда котик спит в воде, структура сна у него сходна с таковой у дельфина – медленный сон однополушарный, а быстрый сон исчезает практически полностью (на 99%). А когда котик спит на помосте, то структура его сна такая же, как у наземных млекопитающих: медленный сон носит обычный двуполушарный характер, быстрый сон хорошо выражен и процент его высок. Когда после длительного периода пребывания в воде котик выходит на помост, быстрый сон у него восстанавливается, но в нормальной пропорции, феномен “отдачи” быстрого сна не возникает. Иными словами, когда котик спит в воде, то у него исчезает сама *потребность* в быстром сне, которая вновь возникает, когда он выходит на сушу. Все эти факты невозможно совместить с гипотезой “обработки неизменно важной информации мозгом” в фазе быстрого сна, но зато они очень хорошо сочетаются с экологическими факторами и образом жизни животного.

Резюмируем все эти разрозненные данные по обработке информации головным мозгом в быстром сне off line:

А. Психологический аргумент

(1) плохая фиксация сновидений в памяти, что подтверждается снижением BOLD сигнала в дорзолатеральной префронтальной коре в быстром сне;

Б. Клинический аргумент

(2) *case report* – описание вполне профессионально успешного человека, прожившего всю свою взрослую жизнь (почти) без быстрого сна, без малейшего нарушения когнитивных способностей;

В. Генетический аргумент

(3) создание генетически модифицированной линии мышей без быстрого сна, не демонстрирующих никаких явных нарушений поведения или физиологических процессов;

Г. Онтогенетический аргумент

(4) максимальный процент активированного/быстрого сна на поздних пренатальных/ранних постнатальных стадиях индивидуального развития;

Д. Фармакологический аргумент

(5) наличие в мире миллионов больных, постоянно принимающих антидепрессанты, подавляющие в разной степени быстрый сон, вплоть до его полного исчезновения, причем память у них не только не ухудшается, но, в ряде случаев, даже улучшается;

Е. Экологические аргументы

(6) корреляция доли быстрой фазы в суточном сне с эволюционными и экологическими, а не какими-то иными (например, “когнитивными”) характеристиками данного вида млекопитающих и птиц;

7) отсутствие быстрого сна у дельфинов и, возможно, также у ехидны;

(8) исчезновение *потребности* в быстром сне у ушастых тюленей при сне в воде и ее восстановление при возвращении на сушу без демонстрации феномена “отдачи”.

Можно, несколько утрируя, но не слишком, прийти к “парадоксальному” выводу о том, что *интенсивная обработка информации головным мозгом в быстром сне вряд ли играет важную адаптивную роль (по крайней мере, для взрослого организма) – информация обрабатывается, образно говоря, “вхолостую”*.

ГЕНЕРАЦИЯ И РЕАЛИЗАЦИЯ СНА

Однако возникает вопрос: как же совместить все вышеизложенное с широко известными фактами обыденной жизни, тысячи раз подтвержденными клиническим материалом, относительно важ-

ности сна — количественно достаточного и качественно полноценного — для поддержания здоровья, когнитивных способностей и долголетия? И, наоборот — с нарушением здоровья и умственной деятельности при хронической нехватке сна и/или снижении его качества?

М. Жуве, рассказывая о своем больном [11], так отвечает на эти вопросы: “Агрпнию, которую продемонстрировал этот пациент, интересно сравнить с примерами экспериментальной депривации сна у людей (здесь Жуве ссылается на две ранние работы; в дальнейшем такие эксперименты на людях были запрещены). В обоих случаях проводился полиграфический и поведенческий контроль, а также психомоторное тестирование. Сразу же отметим различие между нашим больным, лежащим всю ночь в постели и даже порой принимающим снотворные — и здоровыми испытуемыми-добровольцами, которым платят за то, чтобы они не спали, избегающими даже прилечь, и постоянно стимулирующими себя, чтобы оставаться бодрыми. В первом случае пациент хотел бы поспать и постоянно пытался уснуть, но [не испытывая сонливости] не мог заснуть даже после четырех месяцев инсомнии. Во втором случае, напротив, испытуемые постоянно боролись со сном и после 120, 200 и 264 бессонных часов падали от усталости, демонстрируя длительную “отдачу” сна”. У нашего же больного, указывает Жуве, “была нарушена сама система генерации сна” (курсив мой, *КВ*). Ясно, что Жуве в конце жизни вплотную подошел к идее механизмов генерации сна, отдельных от механизмов его реализации. Каковы же могут быть эти “генерирующие сон” механизмы?

Хорея Морвана долгое время казалась загадочной болезнью, но в настоящее время получены неопровержимые доказательства ее аутоиммунной этиологии, связанной с образованием аутоантител к комплексу потенциал-управляемых калиевых каналов (*voltage gated K⁺ channels*, VGKC). Известно, что антитела к VGKC влияют на периферическую нервную систему, вызывая нейромиотолию, и могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и действовать центрально, связываясь с нейронами гиппокампа [49]. Показано, что некоторые потенциал-управляемые калиевые каналы, действительно, участвуют в регуляции ритма активности-покоя у плодовых мушек и цикла сон-бодрствование — у мышей [50]. В случае разрушения этих каналов ионы K⁺ теряют возможность выйти из клетки и скапливаются внутри нее, в результате чего потенциал мембраны подкакивает до –55 мВ, нейроны постоянно возбуждены и неспособны к гиперполяризации и переходу в режим “пачка—пауза”. Что касается системы генерации быстрого сна, то она может быть опосредована упоминавшимися выше мускариновыми рецепторами 1-го и 3-го типов,

нокаутирование которых вызывает исчезновение этой фазы сна у мышей без заметных последствий.

Можно предположить, что многочисленные примеры значительного и продолжительного (пожизненного) сокращения ежесуточной продолжительности сна (всего сна или только быстрой фазы) без последствий у людей и животных, рассмотренные выше, связаны с ослаблением (и прекращением) активности именно гипотетических систем генерации медленного и быстрого сна соответственно. По определенным причинам, которые будут рассмотрены далее, это *не влечет* за собой заметных нарушений в деятельности головного мозга и организма в целом. В то же время длительное подавление системы реализации медленного и быстрого сна, в том числе инструментальное, также приводящее к резкому сокращению продолжительности и разрушению структуры сна, может иметь весьма серьезные и даже катастрофические последствия для больных и экспериментальных животных. Врачи и исследователи обычно имеют дело с результатами повреждения систем именно реализации сна, и они хорошо изучены.

Все эти факты выявили неудовлетворительность традиционной гипотезы “обработки информации мозгом во сне” (некоторые исследователи даже заговорили о сне вообще или о быстром сне, как “явлении без функции” или “ошибке эволюции”) и привлекли внимание исследователей к разработке альтернативной парадигмы. Ю.В. Панчин назвал ее “сценарием адаптивного бездействия” (*Adaptive Inactivity Scenario*, AIS) [10]. В ее основе лежит очень простая мысль о том, что внутрисуточные периоды покоя и сна, или “адаптивной неактивности” [51], сами по себе обладают эволюционным преимуществом, потому что дополнительное время бодрствования делает животных более уязвимыми *в дикой природе*. Если предположить, что такая стратегия “жизни без суеты” является адаптивной, поведение, подобное сну, могло возникать в эволюции разных групп организмов независимо и неоднократно.

Но зачем нужно выключение сенсорных систем и прекращение информационной деятельности головного мозга во сне? Почему нужно обязательно глубоко спать, почему спокойное бодрствование не может заменить сон? Дело в том, что поведение в состоянии бодрствования контролируется различными сенсорными стимулами и реализуется завершением определенных моторных реакций. Аффферентная импульсация, поступающая в головной мозг в состоянии спокойного бодрствования от экстеро- и интерорецепторов (в особенности от проприорецепторов) будет вмешиваться в этот процесс, препятствуя его протеканию. Действительно, каждый человек знает, как тяжело провести несколько часов в постели без сна! Эволюционно адаптивное периодическое бездействие (неак-

тивность) требует радикальной перестройки существующих рефлексов бодрствования. Сон, возможно, наиболее простое эволюционное новоприобретение для достижения этой адаптации. Поэтому периодическое бездействие поддерживается естественным отбором. Вот почему оно зависит от естественных факторов и факторов окружающей среды и может широко варьировать — от полного отсутствия до значительных величин. Если сон является адаптивным фактором, но не выполняет какую-то неизвестную (“таинственную”) функцию, связанную с обработкой витально необходимой информации, то, с эволюционной точки зрения, неспящие животные будут элиминированы естественным отбором не потому, что они умирают от отсутствия сна, а потому, что дополнительное время бодрствования делает их более уязвимыми в дикой природе.

Можно предположить, что биологическая роль сна эволюционно усилилась за счет синхронизации и связи некоторых физиологических функций (в первую очередь — тех, которые не связаны с обязательным вовлечением центральной нервной системы — обменных, эндокринных, иммунных и т.п.) с периодами сна и бодрствования. Тут уместна аналогия с циркадианной ритмикой: все процессы в организме животного и человека подчинены этой ритмике, ее нарушение вызывает десинхроноз со всеми его хорошо изученными последствиями и резко снижает выживаемость особи в дикой природе. В то же время в условиях вивария, например, хомячки с экспериментально разрушенными супрахиазмальными ядрами прекрасно выживают, питаются и размножаются. Все физиологические функции у них протекают нормально, но хаотично распределены во времени.

Поскольку внутренняя жизнь организма теплоресурсного в периоды покоя продолжается, определенные функции по тем или иным причинам (иногда, возможно, случайным) стали “вытягиваться” в периоды медленного и быстрого сна. То есть, между сном и жизненными процессами, которые во время него происходят, имеется жесткая временная, но не причинно-следственная связь.

Быть может, никакой особой “тайны сна” нет [52] и “тривиальная функция сна” [53, 54] состоит не в “переработке головным мозгом полученной информации”, а в радикальной перестройке всех рефлексов бодрствования для нормального протекания периодов “адаптивного бездействия” организма [51, 55]?

Благодарность. Автор благодарит Ю.В. Панчина за плодотворное обсуждение и ценные идеи, высказанные им в ходе работы над совместным проектом и изложенные в статье [10], а также анонимных рецензентов журнала за внимательное прочтение рукописи и ценные замечания, позволившие ее значительно улучшить.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Обзор написан в ходе плановой научной работы в рамках государственного задания и не имеет специальной финансовой поддержки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brette R (2022) Brains as computers: metaphor, analogy, theory or fact? *Front Ecol Evol* 10:878729. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.878729>
2. Ковальзон ВМ (2011) Основы сомнологии. Физиология и нейрохимия цикла бодрствование-сон. М. Бинум. Лаборатория знаний. [Kovalzon VM (2011) Basics of somnology. Physiology and neurochemistry of the sleep-wakefulness cycle. Moscow. BINOM. Laboratory of knowledge. (In Russ).]
3. Puchkova AN (2020) Studies of learning during sleep: problems, progress, and perspectives. *Neurosci Behav Physiol* 50 (3): 257–263. <https://doi.org/10.1007/s11055-020-00895-1>
4. Steriade M, McCarley RW (2005) Brain Control of Wakefulness and Sleep, 2nd ed. N.Y. Springer. Kluwer. Plenum.
5. Timofeev I, Chauvette S (2019) Neuronal activity during the sleep-wake cycle. *Handbook Sleep Res* 30: 3–17. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813743-7.00001-3>
6. Мухаметов ЛМ (1977) Активность клеток головного мозга во время сна. *Природа* 8: 37–41. [Mukhametov LM (1977) Activity of cerebral cells during sleep. *Priroda* Issue 8: 37–41]. (In Russ).
7. Singer W (1977) Control of thalamic transmission by corticofugal and ascending reticular pathways in the visual system. *Physiol Rev* 57 (3): 386–420.
8. Eiland MM, Lyamin OI, Siegel JM (2001) State-related discharge of neurons in the brainstem of freely moving box turtles, *Terrapene carolina major*. *Arch Ital de Biol* 139 (1–2): 23–36.
9. Lazarus M, Oishi Y, Bjorness TE and Greene RW (2019) Gating and the need for sleep: dissociable effects of adenosine A1 and A2a receptors. *Front Neurosci* 13: 740. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00740>
10. Panchin Y, Kovalzon VM (2021) Total wake: natural, pathological, and experimental limits to sleep reduction. *Front Neurosci* 15: 643496. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.643496>
11. Жуве М (2021) Наука о сне. Кто познает тайну сна — познает тайну мозга! М.АСТ. [Russian translation of the book: Jouvett M (2016) Le sommeil, la conscience et l'éveil. Paris:Odile Jacob].

12. *Touzet C* (2016) Morvan's syndrome and the sustained absence of all sleep rhythms for months or years: An hypothesis. *Med Hypoth* 94: 51–54.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.06.011>
13. *Irani SR, Pettingill P, Kleopa KA, Schiza N, Waters P, Mazia C, Zuliani L, Watanabe O, Lang B, Buckley C, Vincent A* (2012) Morvan syndrome: clinical and serological observations in 29 cases. *Ann Neuro* 72 (2): 241–255.
<https://doi.org/10.1002/ana.23577>
14. *Jones HS, Oswald I* (1968) Two cases of healthy insomnia. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 24: 378–380.
15. *Meddis R, Pearson AJD, Langford G* (1973) An extreme case of healthy insomnia. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 35: 213–214.
16. *He Y, Jones CR, Fujiki N, Xu Y, Guo B, Holder JLL Jr, Rossner MJ, Nishino S, Fuet Y-H* (2009) The transcriptional repressor DEC2 regulates sleep length in mammals. *Science* 325: 866–870.
<https://doi.org/10.1126/science.1174443>
17. *Shi G, Yin C, Fan Z, Xing L, Mostovoy Y, Kwok P-Y, Ashbrook LH, Krystal AD, Ptáček LJ, Fu Y-H* (2021) Mutations in metabotropic glutamate receptor 1 contribute to natural short sleep trait. *Curr Biol* 31:13–24.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.071>
18. *Xing L, Shi G, Mostovoy Y, Gentry NW, Fan Z, McMahon TB, Kwok P-Y, Jones CR, Ptáček LJ, Fu Y-H* (2019) Mutant neuropeptide S receptor reduces sleep duration with preserved memory consolidation. *Sci Transl Med* 11: eaax2014.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax2014>
19. *Gravett N, Bhagwandin A, Sutcliffe R, Landen K, Chase MJ, Lyamin OI, Siegel JM, Manger PR* (2017) Inactivity/sleep in two wild free-roaming African elephant matriarchs – Does large body size make elephants the shortest mammalian sleepers? *PLoS One* 12 (3): e0171903.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171903>
20. *Harding CD, Yovel Y, Peirson SN, Hackett TD, Vyazovskiy VV* (2022) Re-examining extreme sleep duration in bats: implications for sleep phylogeny, ecology, and function. *Sleep* 45 (8): zsa064.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsa064>
21. *Siegel JM* (2022) Sleep function: an evolutionary perspective. *Lancet Neurol* 21: 937–946.
22. *Rattenborg NC, Voirin B, Cruz SM, Tisdale R, Dell'Omo G, Lipp H-P, Wikelski M, Vyssotski AL* (2016) Evidence that birds sleep in mid-flight. *Nat Commun* 7: 12468.
<https://doi.org/10.1038/ncomms12468>
23. *Lesku JA, Rattenborg NC* (2014) Avian sleep. *Current Biology* 24 (1): R12–R14.
24. *Siclari F, Baird B, Perogamvros L, Bernardi G, LaRocque JJ, Riedner B, Boly M, Postle BR, Tononi G* (2017) The neural correlates of dreaming. *Nat Neurosci* 20 (6): 872–878.
<https://doi.org/10.1038/nn.4545>
25. *Пугарев ИН* (2013) Висцеральная теория сна. Журнал высшей нервной деятельности 63 (1): 86–104. [*Pigarev IN* (2013) Visceral theory of sleep. *J High Nerv Activ* 63 (1): 86–104. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0044467713010115>
26. *Hobson JA* (2005) Sleep is of the brain, by the brain and for the brain. *Nature* 437 (7063): 1254–1256.
<https://doi.org/10.1038/nature04283>
27. *Dewan EM* (1970) The programing (P) hypothesis for REM sleep. *Int Psychiatry Clin* 7 (2): 295–307.
28. *Mahoney CE, Cogswell A, Korálnik IJ, Scammell TE* (2019) The neurobiological basis of narcolepsy. *Nat Rev Neurosci* 20 (2): 83–93.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0097-x>
29. *Peever J, Luppi PH, Montplaisir J* (2014) Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder. *Trends Neurosci* 37 (5): 279–288.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.009>
30. *Antelmi E, Rocchi L, Latorre A, Belvisi D, Magrinelli F, Bhatia KP, Tinazzi M* (2022) Restless legs syndrome: known knowns and known unknowns. *Brain Sci* 12: 118.
<https://doi.org/10.3390/brainsci12010118>
31. *Bassetti CL, Bischof M, Valko P* (2006) Dreaming: a neurological view. In: *Mancia M*. *Psychoanalysis and Neuroscience*, 351–387. Milan. Springer.
32. *Roffwarg HP, Muzio JN, Dement WC* (1966) Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Sci New Series* 152 (3722): 604–619.
33. *Crick F, Mitchison G* (1983) The function of dream sleep. *Nature* 304 (5922): 111–114.
34. *Lavie P, Pratt H, Scharf B, Peled R, Brown J* (1984) Localized pontine lesion: nearly total absence of REM sleep. *Neurology* 34: 118–120.
35. *Magidov E, Hayat H, Sharon O, Andelman F, Katzav S, Lavie P, Tauman R, Nir Y* (2018) Near-total absence of REM sleep co-occurring with normal cognition: an update of the 1984 paper. *Sleep Med* 52: 134–137.
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.09.003>
36. *Vertes RP, Siegel JM* (2005) Time for the sleep community to take a critical look at the purported role of sleep in memory processing. *Sleep* 28 (10): 1228–1229.
37. *Vertes RP* (2004) Memory consolidation in sleep: Dream or reality. *Neuron* 44: 135–148.
38. *Siegel JM* (2001) The REM sleep–memory consolidation hypothesis. *Science* 294: 1058–1063.
39. *Niwa Y, Kanda GN, Yamada RG, Shi S, Sunagawa GA, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H, Matsumoto N, Masumoto K-H, Nagano M, Kasukawa T, Galloway J, Perrin D, Shigeyoshi Y, Ukai H, Kiyonari H, Sumiyama K, Ueda HR* (2018) Muscarinic acetylcholine receptors Chrm1 and Chrm3 are essential for REM sleep. *Cell Rep* 24: 2231–2247.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.082>
40. *Yamada RG, Ueda H* (2020) Molecular mechanisms of REM sleep. *Front Neurosci* 13: 1402.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01402>
41. *Capellini I, Barton RA, McNamara P, Preston BT, Nunn CL* (2008) Phylogenetic analysis of the ecology and evolution of mammalian sleep. *Evolution* 62 (7): 1764–1776.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00392.x>
42. *Lyamin OI, Kibalnikov AS, Siegel JM* (2021) Sleep in ostrich chicks (*Struthio camelus*). *Sleep* 44 (5): zsa259.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsa259>
43. *Лямин ОИ* (2018) Эволюция сна от простых форм до млекопитающих. Эффективная фармакотерапия. Неврология и психиатрия. Спецвыпуск “Сон и его расстройства – 6” 35: 8–16. [*Lyamin OI* (2018) Evolution of Sleep from Simple Organisms to Mammals. Эффективная фармакотерапия. Неврология и психиатрия.

- Spetsvyпуск: “Son I ego rasstroistva-6 35: 8–16. (In Russ)].
44. *Mukhametov LM* (1988) The absence of paradoxical sleep in dolphins. In: Koella WP, Obal F, Schulz H, Visser P, eds. *Sleep’86*. P. 154–156. Stuttgart. Gustav Fischer Verlag.
 45. *Lyamin OI, Manger PR, Ridgway SH, Mukhametov LM, Siegel JM* (2008) Cetacean sleep: An unusual form of mammalian sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1451–1484.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.023>
 46. *Lyamin OI, Lapierre JL, Mukhametov LM* (2013) Sleep in aquatic species. In: Kushida C, ed. *The Encyclopedia of Sleep*, vol. 1, pp. 57–62. Waltham, MA: Acad Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378610-4.00013-9>
 47. *Мухаметов ЛМ* (2017) Начало исследований однополушарного сна морских млекопитающих. Эффективная фармакотерапия. Неврология и психиатрия. Спецвыпуск “Сон и его расстройства – 5” 35: 132–136. [*Mukhametov LM* (2017) Research Start of Marine Mammals’ Hemisphere Sleep. *Effectivnaya farmakoterapiya. Nevrol i Psihiatr Spetsvyпуск: “Son I ego rasstroistva-5” 35: 132–136*]. (In Russ).
<https://umedp.ru/upload/iblock/565/Muhametov.pdf>
 48. *Lyamin OI, Mukhametov LM, Siegel JM* (2017) Sleep in the northern fur seal. *Current Opin Neurobiol* 44: 144–151.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.04.009>
 49. *Liguori R, Vincent A, Clover L, Avoni P, Plazzi G, Cortelli P, Baruzzi A, Carey T, Gambetti P, Lugaresi E, Montagna P* (2001) Morvan’s syndrome: peripheral and central nervous system and cardiac involvement with antibodies to voltage-gated potassium channels. *Brain* 124 (12): 2417–2426.
 50. *Cirelli C* (2009) The genetic and molecular regulation of sleep: from fruit flies to humans. *Nat Rev Neurosci* 10 (8): 549–560.
<https://doi.org/10.1038/nrn2683>
 51. *Siegel JM* (2009) Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat Rev Neurosci* 10: 747–753.
<https://doi.org/10.1038/nrn2697>
 52. *Foster RG* (2018) There is no mystery to sleep. *Psych J* 7: 206–208.
<https://doi.org/10.1002/pchj.247>
 53. *Rial RV, Nicolau MC, Gamundí A, Akaârir M, Aparicio S, Garau C, Tejada S, Roca C, Gené L, Moranta D, Esteban S* (2007) The trivial function of sleep. *Sleep Med Rev* 11 (4): 311–325.
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2007.03.001>
 54. *Rial RV, Canellas F, Akaârir M, Rubiño JA, Barceló P, Martín A, Gamundí A, Nicolau MC* (2022) The birth of the mammalian sleep. *Biology* 11: 734.
<https://doi.org/10.3390/biology11050734>
 55. *Frank MG* (2021) Challenging sleep homeostasis. *Neurobiol Sleep Circad Rhythm* 10:100060.
<https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2021.100060>
 56. *Kovalzon VM, Lyamin OI* (2022) In memory of Lev Mukhametov. *J Sleep Res* 31: e13470.
<https://doi.org/10.1111/jsr.13470>
 57. *Rodionova EI, Kastner S, Krueger JM, Saalman Y.B., Lüthi A, Nobili L, Kovalzon VM, Vyazovskiy VV* (2022) In memoriam: Professor Ivan Pigarev (1941–2021). *J Sleep Res* 31: e13492.
<https://doi.org/10.1111/jsr.13492>

CEREBRAL INFORMATION PROCESSING DURING SLEEP: EVOLUTIONARY AND ECOLOGICAL APPROACHES

V. M. Kovalzon

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: kovalzon@sevin.ru

Based on the analysis of extensive clinical, psychophysiological and experimental data, the author comes to the conclusion that the widespread idea of the cerebral information processing during sleep related to previous wakefulness and necessary for the formation of long-term memory and other cognitive resources of the brain is inapplicable. This hypothesis does not agree well with a wide range of data regarding both non-REM and REM sleep. The state of the cerebral cortex in non-REM sleep is more adequately described by the classical term “diffuse cortical inhibition.” As for REM sleep, here, too, the very intensive work of the brain does not play any adaptive role (at least for an adult organism) - information is processed, figuratively speaking, “idle”. All the vast experimental and clinical material accumulated in recent decades speaks in favor of the “ecological” hypothesis, which considers sleep as periods of “adaptive inactivity” of the body, increasing its survival in a hostile environment. The function of sleep, perhaps, consists in a radical restructuring of all waking reflexes for the normal course of such periods.

Keywords: sleep, wakefulness, non-REM sleep, REM sleep, cerebral information processing, ecology, evolution

АНАЛИЗ СОСТАВА ФРАКЦИИ ИЗ ОСМОТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ АТЛАНТИЧЕСКОЙ ТРЕСКИ *GADUS MORHUA*

© 2023 г. А. М. Андреева^{1,*}, З. М. Базарова¹, И. Ю. Торопыгин^{1,2},
А. С. Васильев¹, Р. А. Федоров¹, П. А. Павлова³, Д. В. Гарина¹

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

² Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: aam@ibiw.ru

Поступила в редакцию 01.11.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Предприняты поиск и идентификация осмотически активных белков (ОАБ) в сыворотке крови атлантической трески *Gadus morhua* с использованием методов электрофореза в полиакриламидном геле и масс-спектрометрии MALDI. Было идентифицировано 17 ОАБ. В соответствии с аннотациями геномной онтологии кандидатов, 13 ОАБ отнесены к внеклеточным, а 4 ОАБ – к внутриклеточным белкам. Относительное содержание ОАБ в сыворотке трески составило ~50% от общего белка. В пуле ОАБ доминировали внеклеточные белки аполипопротеины (в составе липопротеинов высокой плотности) и гемопексины, причем относительное содержание первых составило ~25% общего белка сыворотки. Из внутриклеточных белков на протеомной карте сыворотки доминировали низкомолекулярные фрагменты тяжелой цепи миозина. Полученные результаты согласуются с положениями “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена, которая в качестве осмотически активных белков плазмы “безальбуминовых” костистых рыб рассматривает множественные внеклеточные и внутриклеточные белки разных функциональных классов.

Ключевые слова: атлантическая треска, белки сыворотки крови, электрофорез, MALDI

DOI: 10.31857/S004445292302002X, **EDN:** BIKKFO

ВВЕДЕНИЕ

Сывороточный альбумин, относящийся к суперсемейству альбуминоидов, играет ключевую роль в поддержании гомеостаза всех физиологических функций организма высших позвоночных, участвуя в транспорте множества лигандов и обеспечивая около 80% коллоидно-осмотического давления плазмы крови [1, 2]. В плазме млекопитающих его концентрация достигает ~30–50 мг/мл, что составляет около 60% от общего белка [3–5]. В плазме низших водных позвоночных концентрация альбумина также достаточно высока: у миноги *Petromyzon marinus* (Cyclostomata, Petromyzontiformes) она составляет ~30 мг/мл [6] или более 40% от общего белка; у чавычи *Oncorhynchus tshawytscha*, кумжи *Salmo trutta*, лосося атлантического *Salmo salar* (Teleostei, Salmoniformes) ~15 мг/мл или 25–28% от общего белка [7–10].

Между тем, в некоторых группах низших позвоночных альбумины не найдены [11]. Нет альбуминов у пластиножаберных (Elasmobranchii) [12] и костнопузырных и колючеперых костистых рыб (Teleostei: Ostariophysi, Acanthopterygii) [13]. Неизвестно, какие белки взяли на себя функцию альбу-

мина у акул и скатов, но установлено, что в качестве основного органического осмолита плазмы они выбрали мочевины [12]. Остается открытым и вопрос функционального замещения альбумина у “безальбуминовых” костистых рыб. На наш взгляд, причина нерешенности этой проблемы заключается в отсутствии методологических подходов для поиска белков, способных выполнять вместо альбумина осмотическую функцию.

В качестве основы для поиска осмотически активных белков (ОАБ) в крови “безальбуминовых” Teleostei мы предлагаем использовать параметры, характеризующие осмотические свойства альбуминов Mammalia, – высокий отрицательный поверхностный заряд, небольшую молекулярную массу (Mr) и высокое содержание в плазме (сыворотке) крови [14]; эти параметры достаточно легко определяются с помощью электрофореза и биохимических методов. Проявление осмотической активности такими белками мы предлагаем рассматривать в формате разработанной для рыб “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена [14].

Как применить этот подход для поиска ОАБ у костистых рыб? Несмотря на то что в физиологических

условиях все белки плазмы проявляют осмотическую активность, разные белки вносят разный вклад в КОД [2]. Так, очищенные препараты фибриногена (Fg) и иммуноглобулина G (IgG) создают меньшие величины КОД, чем альбумин (Alb) [15]. Поскольку в электрофорезе плазмы Fg и IgG расположены в катодной области, а альбумины в анодной области, то в ряду “Fg → IgG → Alb” имеет место снижение величины Mг и увеличение отрицательного заряда [16]. Из этого следует очевидный вывод о более высокой осмотической активности небольших белков плазмы с высоким отрицательным зарядом и о локализации таких белков в анодной зоне подвижности диск-электрофореграммы [14, 17].

В отличие от гипотезы Старлинга, которая в своем обновленном формате [18–23] согласуется с представлениями о максимально высоком вкладе альбумина в КОД плазмы у Mammalia [2], “безальбуминовая” гипотеза капиллярного обмена, разработанная на примере карповых рыб, исходит из того, что наибольшую осмотическую активность проявляют множественные белки разных функциональных классов, имеющие небольшие размеры, высокий отрицательный поверхностный заряд и высокое суммарное содержание в плазме (сыворотке) крови. Они могут быть не только внеклеточными, но и внутриклеточными белками, попавшими в кровотоки в результате разрушения клеток.

Цель работы – идентифицировать осмотически активные белки в сыворотке крови атлантической трески *Gadus morhua*; оценить их относительное содержание в сыворотке; с помощью аннотаций генной онтологии выяснить принадлежность кандидатов к внеклеточным и внутриклеточным белкам; а также обсудить состав осмотически активных сывороточных белков трески в формате “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Использовали индивидуальные образцы сыворотки крови от 6 экземпляров трески атлантической *Gadus morhua* (Teleostei, Paracanthopterygii, Gadiformes), отловленных в июне в районе мыса Картеш, Белое море. Для поиска и идентификации ОАБ использовали методы протеомного анализа – электрофорез и масс-спектрометрию MALDI.

Получение сыворотки крови

Для получения крови использовали каудотомию. Индивидуальные образцы крови, собранные из хвостовых сосудов рыб, собирали в отдельные пластиковые пробирки. Далее кровь отстаивали в холодильнике при 4°C в течение ночи, после чего жидкость над сгустком осторожно отбирали пипеткой. Отделенные образцы сыворотки собирали в чистые пластиковые пробирки и использовали для электрофореза.

Определение концентрации общего белка в сыворотке крови

Для определения концентрации белка в сыворотке использовали микробиуретовый метод [24].

Электрофорез

Белки сыворотки разделяли методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Для разделения белков по величине поверхностного заряда использовали диск-электрофорез (диск-Е) в 7.5%-ном ПААГ. Для разделения нативных белков по величине молекулярной массы использовали электрофорез в градиенте концентраций 5–40% ПААГ. Для разделения денатурированных белков использовали двумерный SDS-электрофорез (2D-Е) с диск-Е в первом направлении и SDS-электрофорезом (SDS-Е) в 12.5%-ном ПААГ (восстанавливающие условия) – во втором направлении [25]. Отдельные белковые пятна после SDS-Е вырезали для последующей идентификации с помощью MALDI масс-спектрометрии. Для приготовления разделяющего и концентрирующего геля использовали трис-НСl буфер с рН 8.9 и 6.9 соответственно. В лунки концентрирующего геля вносили 1.5–2 мкл сыворотки (~6–8 мкг белка), разведенной таким же количеством 40%-ного раствора сахарозы. После диск-Е гели фиксировали 10%-ной ТХУ и после отмывания окрашивали 0.01%-ным раствором Coomassie R-250 на смеси этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 10:1:30. После SDS-Е гели фиксировали 70%-ным изопропиловым спиртом и далее окрашивали 0.04%-ным раствором Coomassie R-250, приготовленным на смеси изопропанол – этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 2 : 1 : 1 : 6. Величину Mг нативных белков в градиенте концентраций ПААГ определяли с помощью маркеров молекулярной массы – полимерных форм бычьего сывороточного альбумина БСА (67, 134, 201, 268, 335, 402 kDa) и овальбумина ОА (45, 90, 135, 190 kDa). Для определения величин молекулярной массы тестируемых белков в SDS-Е (M_{г obs}) использовали маркеры в составе набора PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (10, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa) (Fermentas, США).

Определение положения фракции из ОАБ на электрофореграмме

При определении положения фракции из ОАБ на электрофореграмме сыворотки трески мы ориентировались на сопоставимые с альбумином человека показатели молекулярной массы белков и их поверхностного заряда, оцениваемого по величине электрофоретической подвижности (Rf). В соответствии с этими критериями, в диск-Е фракция из ОАБ должна располагаться в анодной области. Четкое определение ее границ у костистых рыб затрудняется фактом множественности белков в этой зоне подвижности, что подтверждают многочисленные примеры [26]. В.С. Кирпичников [26]

обозначил эту фракцию как низкомолекулярную (НМФ), не давая определения ее границ. Для проведения четких границ фракции мы предложили использовать белок-“навигатор” трансферрин (Tf) [27–30]. В диск-Е сыворотки он ограничивает НМФ со стороны катода, в то время как со стороны анода ее ограничивает фронт бромфенолового синего (БФС). Таким образом, по положению на диск-электрофореграмме, фракция из ОАБ совпадает с НМФ, условные границы которой заданы трансферрином и БФС. Ввиду использования Tf для обозначения “верхней” границы фракции ОАБ на диск-электрофореграмме, условную “верхнюю” границу M_r для этой фракции мы также установили по Tf (76–80 kDa).

Масс-спектрометрия MALDI

Пробоподготовку белков проводили по протоколу: кусочек геля, содержащего тестируемый белок, дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05 М NH₄HCO₃ в концентрации 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 4 ч при 40°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты в 10%-ном водном ацетонитриле и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения масс-спектров. Масс-спектры (ms) получали на тандемном MALDI TOF-TOF масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в тандемном режиме; обрабатывали с помощью программного пакета Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция “пептидный фингер-принт”, www.matrixscience.com) устанавливали расчетные величины молекулярной массы M_{r,calc} (Da) и проводили поиск в DB NCBI среди белков всех организмов. При необходимости получали спектры фрагментации ms/ms отдельных пептидов в тандемном режиме. С использованием программ Biotoools 3.0 и Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия) проводили поиск по ms/ms. Если кандидаты обнаруживались в неаннотированной базе данных в виде библиотек кДНК, сконструированных на основе популяций мРНК, то аминокислотную последовательность реконструировали на основе мРНК, используя Protein BLAST; поиск проводили среди белков всех позвоночных. В этом случае значение расчетной M_{r,calc} представляли в виде количества аминокислотных остатков в соответствии с PDB NCBI.

Для определения принадлежности кандидатов к внеклеточным или внутриклеточным белкам использовали аннотации геномной онтологии (Gene Ontology, GO) с использованием базы данных UniProt. В случае отсутствия GO-аннотаций для кандидатных белков использовали гомологичные им белки человека (*Homo sapiens*) или модельных видов рыб – карпозубой рыбы *Cyprinodon variegatus* и карпа *Cyprinus carpio*.

Статистические методы

Денситометрирование, расчет относительного содержания отдельных белков и фракции ОАБ, а также величин молекулярной массы белков (M_{r,obs}) проводили с помощью программы ONE-Dscan, Ver 1.31 (Scananalytic Inc.). Результаты расчета относительного содержания белков в анодной области диск-электрофореграммы сыворотки крови трески в выборке из 6 рыб представляли в виде средних значений и стандартной ошибки ($\pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение положения анодной фракции на электрофореграмме сыворотки трески

В анодной области диск-электрофореграммы сыворотки трески было выявлено ~10 белковых полос (рис. 1a); в 2D-E им соответствовали ~40 белков (рис. 1b). ~7 белковых пятен имели M_r > 80 kDa; их не считали ОАБ и не использовали для идентификации с помощью MALDI. Молекулярные массы остальных белков соответствовали критерию ОАБ. 17 ОАБ вырезали из геля и идентифицировали с помощью MALDI масс-спектрометрии (рис. 1b; табл. 1).

Определение концентрации общего белка и относительного содержания ОАБ в сыворотке крови

Концентрация общего белка в сыворотке составила 4.6 ± 0.3 г%. Относительное содержание ОАБ составило $51.2 \pm 6.5\%$ от общего белка (~2.4 г%). На протеомной карте (SDS-E) имеется мощное пятно ApoA-I (пятно 12, рис. 1b); его относительное содержание составило $25.4 \pm 4.3\%$ от общего белка (~1.2 г%). В градиенте ПААГ, ApoA-I вместе с Apo-II (пятно 17, рис. 1b) обнаруживались в зоне подвижности α_1 -глобулинов в области пятна с M_r ~100–140 kDa, соответствующего положению липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) на электрофореграмме. Идентификация с помощью MALDI белков в составе этих нативных частиц выявила кандидаты в виде ApoA-I *Danio rerio* (NP_571203.14, score 220) и Apo-II *Oncorhynchus mykiss* (NP_001154920.1, score 159). Отдельно от дорожки ApoA-I и Apo-II, на протеомной карте выявлено четкое пятно ApoA-IV (пятно 15, рис. 1b).

Помимо ApoA-I, на протеомной карте сыворотки трески (рис. 1b) представлены мощные пятна

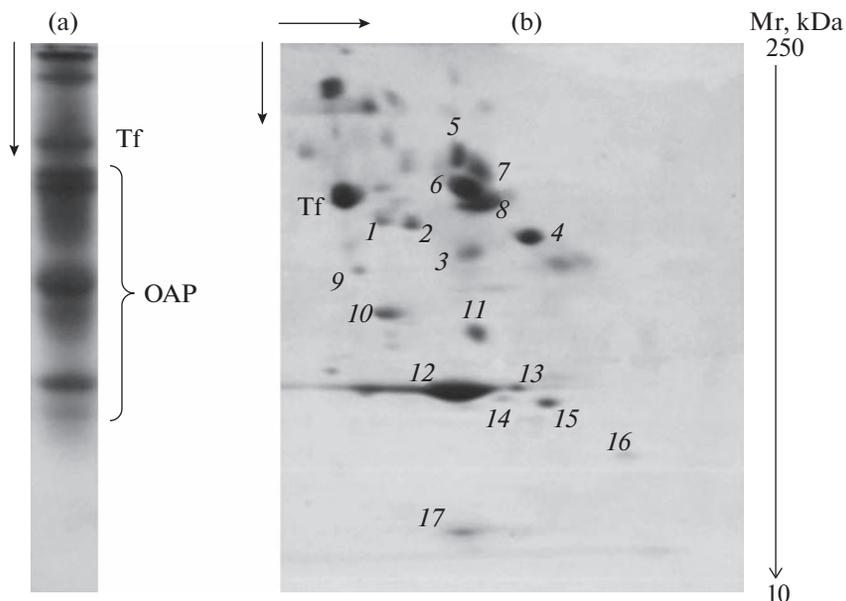


Рис. 1. Электрофорез сыворотки крови трески атлантической *Gadus morhua*: (a) – диск-Е; Tf – трансферрин; ОАБ – фракция из осмотически активных белков; (b) – фрагмент 2D-SDS-электрофореграммы сыворотки, содержащий трансферрин (Tf) и фракцию из ОАБ (1–17); справа дана шкала Mr, построенная по маркерам PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Стрелки указывают направление электрофореза.

внутриклеточного белка гемопексина (пятна 6 и 8), пятна ингибиторов протеиназ (пятна 1, 4 и 5), а также внутриклеточные белки в виде низкомолекулярных фрагментов тяжелой цепи миозина (пятна 10, 11); идентифицированы “следы” коактозина (пятно 16), на который приходится $0.8 \pm 0.1\%$ от общего белка или $\sim 0.04\%$, и бета-Ala-His дипептидаза (пятно 2).

Разделение кандидатов на внеклеточные и внутриклеточные белки с помощью аннотаций геной онтологии

6 из 17 белков (1, 3, 4, 7, 16, 17) из табл. 1 не имели аннотаций GO в UniProtKB. Для определения их принадлежности к внеклеточным или внутриклеточным белкам использовали гомологичные белки человека (*Homo sapiens*) и модельных видов рыб – карпозубой рыбы *Cyprinodon variegatus* и карпа *Cyprinus carpio* (табл. 2). С учетом их аннотаций GO, 13 кандидатов (76% от пула из 17 ОАБ) относятся к внеклеточным белкам, а 4 кандидата (24%) – к внутриклеточным белкам (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты указывают на то, что белковый состав фракции ОАБ в сыворотке трески, с одной стороны, отличается от таковой у млекопитающих, а с другой стороны, имеет общие с ней черты. Сходство заключается в том, что расчитанное нами суммарное относительное содержание ОАБ у трески оказалось сопоставимым с относительным содержанием альбумина в крови млекопитающих. В то же время множественность

ОАБ, их принадлежность к разным функциональным классам, а также повышенное содержание внутриклеточных белков, – являются отличительными чертами этой фракции у трески. Рассмотрим эти черты более подробно.

Множественность ОАБ в сыворотке трески

Характерный для млекопитающих белок альбумин из суперсемейства альбуминоидов (cl00031, PDB NCBI) в анодной области диск-электрофореграммы сыворотки трески не обнаружен. Вместо него выявлено более 30 белков, соответствующих критериям осмотически активных белков. Среди них доминирует аполипопротеин ApoA-I, на который приходится четверть общего белка сыворотки ($25.4 \pm 4.3\%$). Другой аполипопротеин – Apo-II – на протеомной карте представлен минорным пятном; у костистых часто идентифицируют его гомолог – 14 kDa apolipoprotein (Apo-14); оба белка являются гомологами Apo-II млекопитающих [31]. На диск-электрофореграмме они находятся в зоне подвижности ЛПВП. Относительное содержание этих частиц, рассчитанное по белку, в сыворотке костистых может достигать 30–36% [32–34]. Это более чем в 3 раза превышает относительное содержание ЛПВП в плазме человека. ApoA-I и Apo-II относятся к суперсемействам “Apolipoprotein superfamily A1/A4/E domain” (cl27567, PDBNCBI) и “ApoA-II superfamily” (cl04697, PDBNCBI) соответственно. ApoA-I присутствует в сыворотке в виде разных изоформ; оба белка в составе ЛПВП участвуют в транспорте липидов к клеткам и регулируют отток холестерина от них [35].

Таблица 1. Идентификация трансферрина и осмотически активных белков из сыворотки крови трески

№*	Candidate proteins	Mascot Search Results	Mr _{calc} /Mr _{obs} , Da	Score
Tf	serotransferrin [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030218894.1	73516/70000	280
1	alpha-2-HS-glycoprotein-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030228808.1	32309/54500	95
2	beta-Ala-His dipeptidase-like isoform X1 [<i>Lepisosteus oculatus</i>]	XP_015212653.1	54227/54000	128
3	stonustoxin subunit beta-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030206226.1	28266/40000	102
4	alpha-1-antitrypsin homolog [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030201052.1	47082/44000	173
5	fetuin-B-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030228824.1	53059/72000	96
6	hemopexin-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030199795.1	48611/60000	194
7	n-1-like isoform X2 [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030227991.1	38746/68000	49
8	hemopexin-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030210065.1	48611/55000	149
9	hemopexin-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030210065.1	47494/45000	140
10	myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like [<i>Anabas testudineus</i>]	XP_026220654.1	222030/31000	88
11	myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like [<i>Notolabrus celidotus</i>]	XP_034540808.1	221203/30000	81
12	apolipoprotein A-I-2-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030236469.1	29769/26000	260
13	apolipoprotein A-I-2-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030236469.1	29769/26000	232
14	apolipoprotein A-I-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030216412.1	27807/26000	129
15	apolipoprotein A-IV-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030203246.1	28610/25000	182
16	coactosin-like protein [<i>Channa argus</i>]	KAF3689264.1	16060/17000	75
17	apolipoprotein A-II [<i>Sander lucioperca</i>]	XP_035862199.1	143aa**/12000	171

*Обозначение (Tf) и нумерация (1–17) белков даны в соответствии с рис. 1.

**Количество аминокислотных остатков (aa) по PDB NCBI.

Таблица 2. Список аннотированных последовательностей, гомологичных кандидатным белкам, не имеющих аннотации генной онтологии в UniProtKB

№*	Candidate proteins without GO annotation	Homologous proteins with GO annotation
1	alpha-2-HS-glycoprotein-like [<i>Gadus morhua</i>] XP_030228808.1	alpha-2-HS-glycoprotein [<i>Homo sapiens</i>] UniProtKB: P02765, FETUA_HUMAN
3	Stonustoxin subunit beta-like [<i>Gadus morhua</i>] XP_030206226.1	Stonustoxin subunit beta-like [<i>Cyprinodon variegatus</i>] UniprotKB: A0A3Q2CPI0, 0A3Q2CPI0_CYPVA
4	alpha-1-antitrypsin homolog [<i>Gadus morhua</i>] XP_030201052.1	Alpha-1-antitrypsin homolog [<i>Cyprinus carpio</i>] UniprotKB: P32759, A1AT_CYPVA
7	kininogen-1-like isoform X2 [<i>Gadus morhua</i>] XP_030227991.1	Kininogen-1 [<i>Homo sapiens</i>] UniprotKB: P01042, KNG1_HUMAN
16	coactosin-like protein [<i>Channa argus</i>] KAF3689264.1	Coactosin-like protein [<i>Homo sapiens</i>] UniprotKB: Q14019, COTL1_HUMAN
17	apolipoprotein A-II [<i>Sander lucioperca</i>] XP_035862199.1	Apolipoprotein A-II [<i>Homo sapiens</i>] UniprotKB: P02652, APOA2_HUMAN

*Нумерация дана по рис. 1b.

Еще один аполипопротеин из суперсемейства “Apolipoprotein superfamily A1/A4/E domain” – Apo-IV, – обнаружен на электрофореграмме сыворотки трески в виде минорного компонента. У человека, как правило, он ассоциирован с хиломикронами, но может присутствовать и в виде минорного компонента в составе ЛПВП или находиться в плазме в свободном состоянии [35], как это нами и обнаружено у трески.

Другой белок, представленный на электрофореграмме сыворотки мощным пятном, – гемопексин (Hx) – принадлежит суперсемейству гемопексинов (cl02471, PDB NCBI). У костистых, как правило, он представлен гомологичным белком тепловой ак-

климации (warm temperature acclimated 65 kDa protein, Wap65) [36]. И Hx, и Wap65 рыб гомологичны гемопексину млекопитающих. Его основные функции – связывание гема, попавшего в плазму при деструкции гем-содержащих белков, и транспортировка его в печень; участие в воспалительных процессах как белка острой фазы [37]. В организме представлен двумя изоформами [36]. Его концентрация в плазме меняется при повышении температуры и бактериальной и вирусной инфекциях [38, 39].

Другой широко представленной у трески группой белков являются ингибиторы протеиназ. К ним относятся 4 белка: alpha-2-HS-glycoprotein-like, fetuin-B-like, kininogen-1-like и alpha-1-anti-

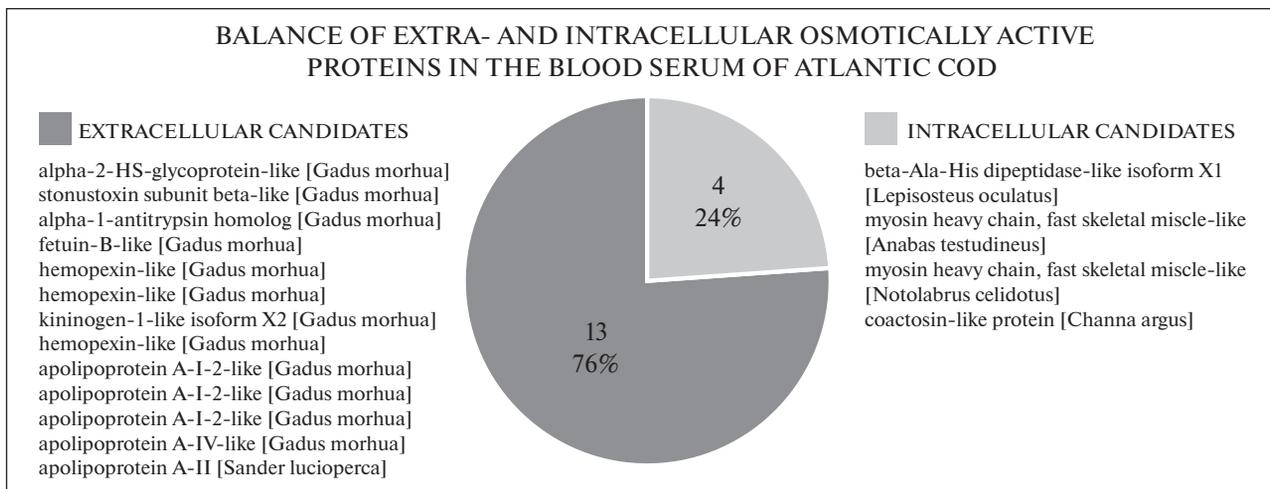


Рис. 2. Дифференциация осмотически активных белков из сыворотки крови атлантической трески *Gadus morhua* на внеклеточные (13 белков или 76% от пула из 17 белков) и внутриклеточные (4 белка или 24% от пула из 17 белков) в соответствии с аннотациями генной онтологии кандидатов.

trypsin homolog. Первые три являются ингибиторами цистеиновых протеиназ, или фетуинами, из суперсемейства “Cystatin (CY)” (cl09238, PDBNCBI). Они участвуют в остром воспалении, иммунном ответе на бактериальные инфекции и органогенезе [40]. Кининоген-подобный белок в составе кининкаликреиновой системы участвует в свертывании крови, регуляции артериального давления и воспалении. Alpha-1-antitrypsin относится к ингибиторам сериновых протеиназ серпинам из суперсемейства “Serine proteinase inhibitors” (cl38926, PDBNCBI); они регулируют различные физиологические процессы, реагируют на воспаление и вирусный патогенез [41].

Белок стонустоксин (cl02614, PDBNCBI) идентифицирован у трески в виде бета-подобной субъединицы (stonustoxin subunit beta). Он участвует в процессах апоптоза, в регуляции клеточного цикла, росте клеток, мейозе, клеточной дифференцировке и везикулярном транспорте (PDB NCBI).

Перечисленные сывороточные белки трески относятся к внеклеточным. Кроме них, среди ОАБ обнаружены и внутриклеточные белки. Один из них – beta-Ala-His dipeptidase из суперсемейства цинковых пептидаз “Zinc_reptidase_like Superfamily” (cl14876, PDB NCBI), – участвует в метаболических и сигнальных путях во всех царствах организмов. Остальные прямо или косвенно связаны с мышечным сокращением. Два низкомолекулярных пятна на протеомной карте идентифицированы как низкомолекулярные фрагменты N-цепи сократительного белка миозина (myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like) с различными Mr. Различают несколько функциональных классов миозина (I–XVIII). Обнаруженные фрагменты могут принадлежать миозину класса II (MYH), состоящему из 2 пар неидентичных L- и пары H-цепей. Моторные домены последних сгруппированы в 35 классов [42]. Еще один внутриклеточный белок трески – коактозин-подобный белок (coactosin-likeprotein),

из семейства actin-depolymerizing factor homology (ADF-H) domain, вероятно, как и у других эукариот, участвует в сократительной активности путем взаимодействия с F-актином [43].

Таким образом, множественность ОАБ создается не только за счет принадлежности того или иного белка разным функциональным классам, но и за счет представленности белка разными изоформами, “свободными” и связанными в составе частиц молекулами, а также разноразмерными фрагментами – продуктами деградации – исходного белка. Множественность аполипопротеинов и гемопексинов у позвоночных, включая рыб, подтверждают литературные данные [35, 36, 44].

Высокое суммарное относительное содержание ОАБ в сыворотке трески

Особенностью трески, сближающей ее с млекопитающими, является высокое суммарное относительное содержание в ее сыворотке белков с высоким электроотрицательным потенциалом. У трески оно составляет половину от общего белка сыворотки ($51.2 \pm 6.5\%$). Этот вклад, хотя и уступает, но все же сопоставим с относительным содержанием альбумина в плазме млекопитающих (~60% от общего белка) [3–5]. Таким образом, если у млекопитающих ~80% КОД плазмы создает один осмотически активный белок – альбумин [1], то у трески за создание КОД отвечают около трех десятков белков.

Баланс вне- и внутриклеточных ОАБ в сыворотке трески

Дифференцированный с помощью аннотаций генной онтологии на внеклеточные и внутриклеточные белки пул ОАБ трески показал доминирование в нем внеклеточных “истинных” белков. У позвоночных “истинными” белками плазмы считаются специализированные внеклеточные белки, выполняю-

щие в системе кровообращения функции транспорта, иммунной защиты, создания КОД и некоторые другие [2]. Именно такие белки и доминируют в протеоме плазмы высших позвоночных. У трески среди ОАБ нами идентифицированы 13 внеклеточных белков. Среди них доминируют аполипопротеины, гемопексины и ингибиторы протеиназ. Ранее эти группы белков были описаны в составе НМФ сыворотки карповых рыб [27–30]. И именно эти белки присутствуют в плазме человека [45].

Одной из отличительных особенностей трески является повышенное содержание внутриклеточных белков в составе ОАБ. Идентифицированные нами 4 внутриклеточных белка относятся к гидролазам (протеазам) и мышечному комплексу. Отметим, что у человека вклад внутриклеточных белков в общий белковый пул плазмы оценивается в “следовых” концентрациях \ll пкг/мл [45]. В то же время у трески концентрация в сыворотке только одного “вторичного” внутриклеточного белка коактозина составила ~ 400 мкг/мл. С учетом вклада других внутриклеточных белков, их общий вклад в КОД сыворотки трески может оказаться еще более значительным.

Состав ОАБ в сыворотке крови трески и человека в формате гипотезы Старлинга и “безальбуминовой” гипотезы

В соответствии с “обновленной” гипотезой Старлинга, прошедшей через ряд ревизий [18], основным осмотически активным белком плазмы у высших позвоночных считается альбумин, создающий $\sim 80\%$ ее КОД [1, 2]. Альбумин проявляет активность за счет небольших размеров и высокой концентрации в плазме. За счет этих свойств, а также из-за отсутствия ковалентных углеводов в структуре белка, поверхность альбуминовой глобулы имеет максимальную концентрацию отрицательного заряда. Вследствие этого белок эффективно связывает неорганические катионы, создавая их незначительный перевес в плазме относительно интерстициальной жидкости; этот эффект известен под названием Гиббса–Доннана [46]. В условиях низкой концентрации белка или его отсутствия в интерстиции, эффект Гиббса–Доннана усиливает связывание альбумином диполей воды. Таким образом, альбумин можно считать белком, идеально приспособленным для выполнения осмотической функции.

Поскольку, с одной стороны, альбумины в крови большинства костистых рыб отсутствуют [13], а с другой стороны, в интерстиции рыб содержится много общего белка, что мешает реализации эффекта Гиббса–Доннана [47], то существует мнение о незначительной роли белков плазмы в капиллярном обмене жидкости рыб [48]. К тому же оказалось, что в отличие от альбумина человека, идентифицированные нами внеклеточные и внутриклеточные ОАБ трески содержат ковалентно связанные углеводы (UniProtKB). Это предполагает меньшую, по сравнению с альбумином млекопитающих, кон-

центрацию отрицательного поверхностного заряда и, как следствие, меньшую эффективность в связывании неорганических катионов и диполей воды, характеризующих осмотическую активность белка. Вследствие этих причин, в рамках гипотезы Старлинга оказалось затруднительным объяснить, каким образом белки плазмы рыб реализуют свой осмотический потенциал.

Ответить на этот вопрос может “безальбуминовая” гипотеза капиллярного обмена [14, 17]. Первоначально она разрабатывалась на примере карповых рыб. Гипотеза предлагает рассматривать в качестве осмотически активных белков плазмы и сыворотки рыб не альбумины, а множественные белки с высоким электроотрицательным потенциалом, среди которых преобладают аполипопротеины, гемопексины, ингибиторы протеиназ, а также внутриклеточные белки, попавшие в кровь вследствие разрушения клеток. Полученные нами результаты показали, что именно эти группы белков, специализирующиеся не на осмотической функции, а на функциях транспорта и иммунной защиты, доминируют среди ОАБ трески.

Представленные в сыворотке в меньшем количестве внутриклеточные белки – гидролазы и компоненты сократительной системы – отвечают в клетках за протеолиз и работу сократительного аппарата. Будучи коллоидами, они также вносят вклад в КОД плазмы, но вклад этот значительно меньше, чем тот, который вносят “истинные” внеклеточные белки плазмы. Тем не менее результаты работы не исключают более значительный вклад внутриклеточных белков в КОД плазмы трески по сравнению с человеком. Проявление осмотической активности белков плазмы у рыб в условиях наличия белка в интерстиции, вероятно, можно объяснить обнаружением скоплений белка в субгликокаликсной зоне на примере модельных млекопитающих [49]. На силу фильтрации жидкости оказывает влияние белок из этой зоны, в то время как белок интерстиция вносит вклад в поддержание изотонии плазмы и интерстициальной жидкости [14, 22, 23, 49].

Нельзя не отметить, что специальные исследования по вопросу функционального замещения альбуминов в крови “безальбуминовых” костистых рыб в литературе отсутствуют. Имеется ряд единичных высказываний о возможном участии сывороточных липопротеинов в замещении транспортной функции альбумина [8, 9, 50] и аполипопротеина ApoA-I в осморегуляции рыб [51]. В то же время в начатых нами исследованиях обнаружена осмотическая активность ЛПВП [29, 30]. На примере серебряного карася *Carassius auratus* показано, что на фоне гипернатриемии сыворотки крупные формы ЛПВП распадаются на мелкие, которые при восстановлении нормонатриемии вновь формируют исходные крупные частицы [52]. Учитывая высокое содержание ЛПВП в крови костистых рыб и их гидрофильную природу, осмотический эф-

факт от их распада может влиять на осмотические свойства плазмы.

матирование рукописи в соответствии с правилами журнала проведены Д.В.Г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают, с одной стороны, на отсутствие в крови трески характерного для млекопитающих осмотически активного альбумина, и, с другой стороны, на наличие в ней множественных, заменяющих альбумины белков, чья основная специализация связана не с осморегуляцией, а с функциями транспорта и иммунной защиты. Будучи представленными в сыворотке трески сопоставимой с альбумином суммарной концентрацией и имея подходящие для осмотически активных белков параметры молекулярной массы и электроотрицательного потенциала, эти белки могут быть способными к поддержанию осмотических свойств плазмы.

Полученные результаты сложно объяснить с точки зрения гипотезы Старлинга. Однако они согласуются с положениями “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена у рыб, в соответствии с которой функцию потерянного в ходе эволюционного процесса в группе высших Teleostei альбумина взяли на себя множественные “истинные” внеклеточные белки плазмы и, отчасти, внутриклеточные белки, которые по своим физико-химическим и структурным характеристикам оказались способными к выполнению осмотической функции.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания 121050500046-8.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с объектом соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ИБВВ РАН (протокол № 2 от 19.01.2021).

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и организация работы, анализ всех данных, написание статьи принадлежат А.М.А.; отлов рыб, отбор крови и получение сыворотки проведены А.С.В.; электрофорез проведен А.С.В. и Р.А.Ф.; трипсинолиз белков, MALDI масс-спектрометрия и поиск кандидатов проведены З.М.Б. и И.Ю.Т.; анализ аннотаций геномной онтологии кандидатов проведены А.М.А., З.М.Б. и П.А.П.; денситометрирование электрофореграмм, фор-

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику ИБВВ РАН И.П. Рябцевой за участие в полевых работах по сбору материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Levitt D, Levitt M* (2016) Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med* 9: 229–255. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S102819>
2. *Schulz GE, Schirmer RH* (1979) Principles of Protein Structure. New York. Springer-Verlag.
3. *Dziewielewska KM, Evans CA, Fossan G., Lorscheider FL, Malinowska DH, Møllgård K, Reynolds ML, Saunders NR, Wilkinson S* (1980) Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *J Physiol* 300: 441–455. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013171>
4. *Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, Chruszcz M, Minor W* (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol* 52 (3–4):174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>
5. *Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Hoy KS, Wa C* (2013) Review: glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 425: 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.013>
6. *Gray JE, Doolittle RF* (1992) Characterization, primary structure, and evolution of lamprey plasma albumin. *Protein Sci* 1 (2): 289–302. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010211>
7. *Byrnes L, Gannon F* (1990) Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum albumin: cDNA sequence, evolution, and tissue expression. *DNA Cell Biol* 9 (9): 647–655. <https://doi.org/10.1089/dna.1990.9.647>
8. *Metcalf V, Brennan S, Chambers G, George P* (1998) The albumins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and brown trout (*Salmo trutta*) appear to lack a pro-peptide. *Arch Biochem Biophys* 350 (2): 239–244. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0509>
9. *Metcalf VJ, Brennan SO, Chambers GK, George PM* (1998) The albumin of the brown trout (*Salmo trutta*) is a glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1386 (1): 90–96.
10. *Xu Y, Ding Z* (2005) N-terminal sequence and main characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar*) albumin. *Prep Biochem Biotechnol* 35 (4): 283–290. <https://doi.org/10.1080/10826060500218081>
11. *Li S, Cao Y, Geng F* (2017) Genome-wide identification and comparative analysis of albumin family in vertebrates. *Evol Bioinf Online* 13: 1. <https://doi.org/10.1177/1176934317716089>
12. *Ballantyne JS* (2016) Some of the most interesting things we know, and don't know, about the biochemistry and physiology of elasmobranch fishes (sharks, skates and rays). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 199:

- 21–28.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.03.005>
13. *Andreeva AM* (2022) Evolutionary transformations of albumin using the example of model species of jawless Agnatha and bony jawed fish (review). *Inland Water Biol* 15 (5): 641–658.
<https://doi.org/10.1134/S1995082922050029>
 14. *Andreeva AM* (2020) Structural organization of plasma proteins as a factor of capillary filtration in Pisces. *Inland Water Biol* 13 (4): 664–673.
<https://doi.org/10.1134/S1995082920060036>
 15. *Michelis R, Sela S, Zeitun T, Geron R, Kristal B* (2016) Unexpected normal colloid osmotic pressure in clinical states with low serum albumin. *PLoS One* 11 (7): e0159839.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159839>
 16. *Gaal O, Medgyesi GA, Vereczkey L* (1980) Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Chichester, John Wiley & Sons, 83–87.
 17. *Andreeva AM* (2021) Organization and function of osmotically active fraction of fish (Pisces) plasma proteome. *Inland Water Biol* 14 (4): 449–460.
<https://doi.org/10.1134/S1995082921040039>
 18. *Michel CC* (1997) Starling: the formulation of his hypothesis of microvascular fluid exchange and its significance after 100 years. *Exp Physiol* 82: 1–30.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004000>
 19. *Weinbaum S* (1998) Whitaker distinguished lecture: model to solve mysteries in biomechanics at the cellular level; a new view of fiber matrix layers. *Ann Biomed Eng* 26: 627–643.
<https://doi.org/10.1114/1.134>
 20. *Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE* (2004) Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *J Physiol* 557 (3): 889–907.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058255>
 21. *Rosengren BI, Carlsson O, Venturoli D, Rayyes O, Rippe B* (2004) Transvascular passage of macromolecules into the peritoneal cavity of normo- and hypothermic rats *in vivo*: active or passive transport? *J Vasc Res* 41: 123–130.
<https://doi.org/10.1159/000077131>
 22. *Curry FE, Adamson RH* (2012) Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng* 40: 828–839.
<https://doi.org/10.1007/s10439-011-0429-8>
 23. *Chappell D, Jacob M* (2014) Role of the glycocalyx in fluid management: small things matter. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 28: 227–234.
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2014.06.003>
 24. *Itzhaki RF, Gill DM* (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem* 9: 401–410.
 25. *Laemmli UK* (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
 26. *Kirpichnikov VS* (1987) Genetics and selectics of fish. Leningrad. Nauka (In Russ).
 27. *Andreeva AM, Lamash NE, Serebryakova MV, Ryabtseva IP, Bolshakov VV* (2015) Reorganization of low-molecular-weight fraction of plasma proteins in the annual cycle of Cyprinidae. *Biochemistry (Mosc)* 80 (2): 208–218.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915020078>
 28. *Andreeva AM, Serebryakova MV, Lamash N* (2017) Oligomeric protein complexes of apolipoproteins stabilize the internal fluid environment of organism in redfins of the Tribolodon genus [Pisces; Cypriniformes, Cyprinidae]. *Comp Biochem Physiol D* 22:90–97.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.02.007>
 29. *Andreeva AM, Vasiliev AS, Toropygin IY, Garina DV, Lamash N, Filippova A* (2019) Involvement of apolipoprotein A in maintaining tissue fluid balance in goldfish *Carassius auratus*. *Fish Physiol Biochem* 45 (5): 1717–1730.
<https://doi.org/10.1007/s10695-019-00662-1>
 30. *Andreeva AM, Toropygin IYu, Garina DV, Lamash NE, Vasiliev AS* (2020) The Role of High-Density Lipoproteins in Maintaining Osmotic Homeostasis in the Goldfish *Carassius auratus* L. (Cyprinidae). *J Evol Biochem Physiol* 56: 102–112.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020020027>
 31. *Choudhury M, Yamada S, Komatsu M, Kishimura H, Ando S* (2009) Homologue of mammalian apolipoprotein A-II in non-mammalian vertebrates. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41 (5): 370–378.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmp015>
 32. *Babin PJ, Vernier JM* (1989) Plasma lipoproteins in fish. *J Lipid Res* 30: 467.
 33. *Stoletov K, Fang L, Soo-Ho Choin, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C, Pattison J, Juliano J, Miller ER, Almazan F, Crosier Ph, Witztum J, Klemke R, Miller Yu* (2009) Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res* 104: 952–960.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.189803>
 34. *Andreeva AM* (2019) The strategies of organization of the fish plasma proteome: with and without albumin. *Russ J Mar Biol* 45 (4): 263–274.
<https://doi.org/10.1134/S1063074019040023>
 35. *Saito H, Lund-Katz S, Phillips M* (2004) Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Progress Lipid Res* 43 (4): 350–380.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.05.002>
 36. *Diaz-Rosales P, Pereiro P, Figueras A, Novoa B, Dios S* (2014) The warm temperature acclimation protein (Wap65) has an important role in the inflammatory response of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol* 41 (1): 80–92.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.012>
 37. *Sha Z, Peng Xu, Tomokazu T, Hong Liu, Terhune J* (2008) The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immuneresponse gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. *Mol Immunol* 45 (5): 1458–1469.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.08.012>
 38. *Sarropoulou E, Fernandes JMO, Mitter K, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre M, Figueras A, Novoa B* (2010) Evolution of a multifunctional gene: the warm temperature acclimation protein Wap65 in the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Mol Phylogen Evolut* 55 (2): 640–649.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.001>
 39. *Cho YS, Kim BS, Kim DS, Nam YK* (2012) Modulation of warm-temperature acclimation-associated 65-kDa protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments. *Fish Shellfish Immunol*

- 32 (5): 662–669.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.009>
40. *Li Ch, Gao Ch, Fu Q, Su B, Chen J* (2017) Identification and expression analysis of fetuin B (FETUB) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) mucosal barriers following bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunol* 68: 386–394.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.032>
41. *Janciauskiene S* (2001) Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta* 1535 (3): 221.
[https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(01)00025-4)
42. *Odrionitz F, Kollmar M* (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol* 8 (9): R196.
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r196>
43. *Poukkula M, Kremneva E, Serlachius M, Lappalainen P* (2011) Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68 (9): 471–490.
<https://doi.org/10.1002/cm.20530>
44. *Otis J, Zeituni EM, Thierer JH, Anderson JL, Brown AC, Boehm ED, Cerchione DM, Ceasrine AM, Avraham-David I, Tempelhof H, Yaniv K, Farber SA* (2015) Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis Model Mech* 8 (3): 295–309.
<https://doi.org/10.1242/dmm.018754>
45. *Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai R, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A* (2004) The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 3: 311–326.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M300127-MCP200>
46. *Nguyen MK, Kurtz I* (2006) Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *J Appl Physiol* 100: 1293–1300.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01274.2005>
47. *Olson KR* (1992) Blood and extracellular fluid volume regulation: role of the renin-angiotensin system, kallikrein-kinin system, and atrial natriuretic peptides. *Fish Physiol* 12 (B): 135–234.
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60010-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60010-2)
48. *Olson KR, Kinney DW, Dombrowski RA, Duff DW* (2003) Transvascular and intravascular fluid transport in the rainbow trout: revisiting Starling's forces, the secondary circulation and interstitial compliance. *J Exp Biol* 206 (3): 457–467.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00123>
49. *Sarin H* (2010) Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogen Res* 2 (1): 14.
<https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-14>
50. *De Smet H, Blust R, Moens L* (1998) Absence of albumin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio*: binding of fatty acids to high density lipoprotein. *Fish Physiol Biochem* 19 (1): 71–81.
51. *Chen J, Yu H Shi, Hai Q Hu, He Niu, Ming Y Li* (2009) Apolipoprotein A-I, a hyperosmotic adaptation-related protein in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Comp Biochem Physiol B* 152: 196–201.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.11.005>
52. *Andreeva AM., Martemyanov V, Vasiliev AS, Toropygin IYu., Lamash N, Garina DV, Pavlov D* (2022) Goldfish as a model for studying the effect of hypernatremia on blood plasma lipoproteins. *Bratisl Med J* 123 (3): 172–177.
https://doi.org/10.4149/BLL_2022_028

ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF OSMOTICALLY ACTIVE PROTEIN FRACTION IN BLOOD SERUM FROM ATLANTIC COD *GADUS MORHUA*

A. M. Andreeva^{a, #}, Z. M. Bazarova^a, I. Yu. Toropygin^{a, b}, A. S. Vasiliev^a,
 R.A. Fedorov^a, P. A. Pavlova^c, and D. V. Garina^a

^a Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Yaroslavl'skaya oblast, Russia

^b Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

[#] e-mail: aam@ibiw.ru

A search and identification of osmotically active proteins (OAP) in the composition of blood serum anodic fraction from Atlantic cod *Gadus morhua* were undertaken using polyacrylamide gel electrophoresis and MALDI mass-spectrometry. 17 OAP have been identified. According to the annotations of Gene Ontology for candidates, 13 OAP were classified as extracellular and 4 OAP- as intracellular proteins. The relative content of OAP in cod serum was ~50% of the total protein. Extracellular proteins apolipoproteins (in the composition of high-density lipoproteins) and hemopexin were dominated in OAP pool. Moreover, the relative content of ApoA-I was ~25% of the total serum protein. Of the intracellular proteins on the serum proteomic map, low molecular weight fragments of the myosin heavy chain were dominated. The results obtained are consistent with the provisions of the “albumin-free” hypothesis of capillary exchange, which considers multiple extracellular and intracellular proteins from different functional classes as osmotically active plasma proteins of “albumin-free” teleost fish.

Keywords: Atlantic cod, blood serum proteins, electrophoresis, MALDI

ОБЪЕМ ГИППОКАМПА И СПЕКТР НЕЙРОМЕТАБОЛИТОВ У ЗРЕЛЫХ СЕРЫХ КРЫС (*RATTUS NORVEGICUS*), СЕЛЕКЦИОНИРУЕМЫХ ПО РЕАКЦИИ НА ЧЕЛОВЕКА: ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ СОЦИАЛЬНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

© 2023 г. С. Г. Шихевич¹, А. Е. Акулов¹, Р. В. Кожемякина¹,
М. П. Мошкин¹, Ю. Э. Гербек¹, Р. Г. Гулевич^{1,*}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 15.11.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Ранее методом магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) было показано, что в дорзальном гиппокампе у самцов крыс, селекционируемых на агрессивное поведение по отношению к человеку, понижено содержание γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), N-ацетиласпартата и креатинина совместно с фосфокреатинином, но повышено содержание фосфорилэтаноламина по сравнению с самцами, селекционируемыми на ручное поведение. В данной работе исследовали влияние ранней социальной нестабильности на объем гиппокампа и спектр нейрометаболитов в дорзальном гиппокампе у взрослых агрессивных, ручных и неселекционируемых крыс. Условия социальной нестабильности состояли из более раннего отъема от матери, содержания самцов одного и того же поведения в парах до 3-х месячного возраста и ежедневной замены соседей по клетке с 19-го по 25-й день жизни. В контрольной группе крысят отнимали от матерей на 30 день, они содержались по 4–5 самцов в клетке до 3 мес. Показано, что у агрессивных крыс как абсолютный, так относительный объем гиппокампа был меньше, чем у ручных, тогда как условия социальной нестабильности не влияли на этот параметр. В экспериментальной группе только у агрессивных крыс отмечали понижение содержания фосфорилэтаноламина и повышение аланина в дорзальном гиппокампе по сравнению с контрольными животными, что может быть связано с понижением стресс-реакции у этих животных, которое наблюдали ранее. Из полученных результатов следует, что агрессивные крысы более чувствительны к условиям социальной нестабильности. Кроме того, условия ранней нестабильности и отбор на агрессивное поведение оказывали разнонаправленное влияние как на метаболизм фосфорилэтаноламина, так и на интегральные характеристики метаболического профиля в дорзальном гиппокампе.

Ключевые слова: крыса, агрессия, гиппокамп, магнитно-резонансная томография, нейрометаболит

DOI: 10.31857/S0044452923020055, **EDN:** BIN1QT

Известно, что гиппокамп вовлечен в регуляцию эмоционального состояния, стресс-реактивности и агрессивности [1, 2]. Согласно клиническим наблюдениям у пациентов с пограничным нарушением личности (BPD), для которых характерны импульсивная агрессия и эмоциональная дисрегуляция, меньше объем гиппокампа, чем в контроле [3, 4]. Уменьшение объема гиппокампа у пациентов, ментальные расстройства которых вызваны стрессом (депрессия, пост-травматический синдром и пограничное нарушение личности), связывают с повышенной активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [5, 6].

Исследования на двух линиях крыс показали, что у самцов с пониженной тревожностью (LAV) меньше относительный объем гиппокампа (или

нормализованный к объему мозга) и повышена межсамцовая агрессивность по сравнению с самцами, для которых характерна повышенная тревожность (HAB) [7, 8]. Согласно данным польских исследователей у диких Варшавских крыс (*Rattus norvegicus*) относительный объем гиппокампа меньше, чем у инбредных лабораторных крыс [9]. Поскольку после лабораторизации крыс агрессивность ослабевает, эти результаты могут свидетельствовать о меньшем объеме гиппокампа у более агрессивных диких, чем у лабораторных крыс.

Развитие гиппокампа, как миндалины и префронтальной коры, продолжается в подростковом периоде, для которого характерна повышенная уязвимость к разным стрессирующим воздействиям и, в частности, социальным нарушениям

[10]. С помощью магнитно-резонансной томографии и спектроскопии регистрируют морфометрические и нейрометаболические изменения в разных областях гиппокампа под влиянием стрессирующих условий на ранних этапах развития как у человека, так и животных [11, 12]. Так, после неблагоприятных событий, связанных с насилием в детском возрасте, наблюдали уменьшение размеров гиппокампа у взрослых [11]. У обезьян, содержащихся в раннем возрасте с матерями, которым периодически приходилось искать пищу, спустя несколько лет наблюдали понижение соотношения N-ацетил аспартата (NAA) к холину в левой медио-темпоральной области гиппокампа [13] и уменьшение левой половины гиппокампа [12]. Вместе с тем незначительные или непродолжительные изменения социальных условий в подростковом периоде могут приводить к привыканию и адаптации без каких-то отклонений у взрослых [14].

Исследования на серых крысах, селекционируемых на агрессивное и толерантное отношение к человеку, могут внести вклад в понимание особенностей влияния ранних социальных условий на функциональные параметры гиппокампа у взрослых животных с разными поведенческими фенотипами. Ранее было показано, что уровень активности гипофизарно-надпочечниковой системы и межсамцовой агрессии в тесте резидент-интродер у агрессивных самцов выше, чем у ручных [15–17]. С помощью магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) было обнаружено, что в дорзальном гиппокампе у агрессивных крыс понижено содержание γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), N-ацетиласпартата и креатинина совместно с фосфокреатинином, но повышено содержание фосфорилэтанолamina по сравнению с ручными [18]. Условия ранней социальной нестабильности, а именно парное содержание самцов и ежедневно меняющиеся соседи по клетке вызывали понижение реакции на стресс у агрессивных и пролонгацию латентного периода агрессии у неселекционированных самцов по сравнению с соответствующими контрольными крысами [19].

Можно было предполагать, что отбор по поведению, как и социальные условия влияют не только на метаболические, но и морфометрические параметры гиппокампа у взрослых животных. Целью данной работы было исследование влияния изменений ранних социальных условий на объем гиппокампа и спектр нейрометаболитов в дорзальном гиппокампе у взрослых ручных, агрессивных и неселекционированных крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили в Центре коллективного пользования (ЦКП) “Виварий конвенциональных животных” ИЦиГ, Новосибирск на

3-месячных самцах серых крыс (*Rattus norvegicus*) двух уникальных популяций, селекционируемых на повышение и отсутствие агрессивной реакции на человека в течение 78 поколений. Животные из этих популяций далее будут называться агрессивными и ручными соответственно. Поведение оценивали в баллах в так называемом тесте на перчатку. В качестве контроля использовали неселекционированных самцов 7–8 поколений разведения в условиях вивария. Животных содержали в металлических клетках (50 × 40 × 30 см) в условиях естественного фотопериода и свободного доступа к воде и пище.

Условия ранней социальной нестабильности заключались в более раннем отъеме от матери, парном содержании самцов в клетке и ежедневной замене соседей по клетке, что с небольшими модификациями представляли условия, описанные ранее [20, 21]. Экспериментальных самцов одного и того же поведенческого фенотипа, но из разных пометов рассаживали в клетки попарно на 19-й день жизни или первый день замены соседей (рис. 1). Были сформированы по 6 исходных пар ручных, агрессивных и неселекционированных самцов. Итого в условиях социальной нестабильности содержалось 36 опытных самцов. На ухо каждого животного наносили идентификационный номер. На второй день по одному самцу из каждой клетки пересаживали в соседние. На третий день в результате пересадки второго самца из исходной пары к своему прежнему соседу первоначальная пара восстанавливалась. Такие замены соседей проводили ежедневно в течение 6 дней с 10 до 14 ч. Экспериментальных самцов содержали в парах до 3-месячного возраста. Контрольных животных содержали в стандартных социальных условиях до 3-месячного возраста. По 12 контрольных самцов каждого поведенческого фенотипа отсаживали от матерей на 30-й день жизни по 4–5 в одну клетку, но не менее двух из одного помета. Всего в контрольных условиях содержалось 36 самцов.

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). За 15 мин до проведения процедуры сканирования животных наркотизировали внутрибрюшинным введением 10%-ного тиопентала (0.1 мл на 100 г массы тела). Для томографических исследований из каждой исходной группы были взяты случайным образом по 8–9 животных. Всего в томографических исследованиях участвовали 49 самцов крыс. Информация о морфологии головного мозга получена на основе T2-взвешенных изображений, зарегистрированных с использованием метода RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement). Сканирования выполнены в трех проекциях: аксиальной, сагитальной и коронарной. Измерение структур головного мозга проводили при помощи программы

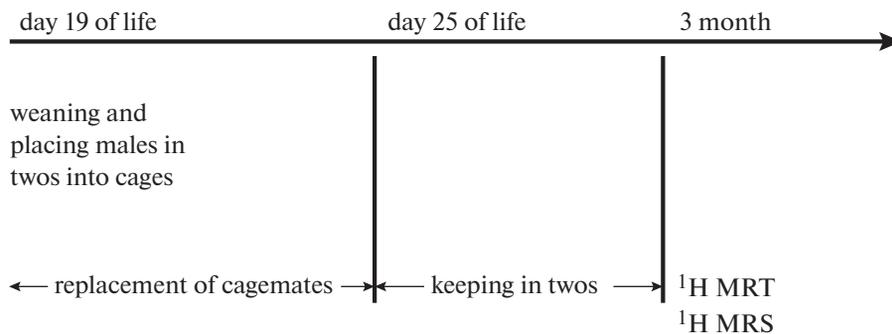


Рис. 1. Схема эксперимента.

ParaVision 5, опции ROI (Region of Interest). Площадь среза высчитывали по формуле: $S = (N_{\text{pixel}} \times 0.00013689) \times 10 \text{ см}^2$, где S – площадь, N_{pixel} – число пикселей. На снимках МРТ измеряли объемы мозга и гиппокампа.

Дорзальная область гиппокампа, исследуемая методом магнитно-резонансной спектроскопии (МРС), показана на рис. 2. МРС-исследования проводили на тех же самцах крыс, что и МРТ-исследования. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей, размер которых составлял $2 \times 3 \times 2.5$ мм, были использованы полученные на этих же животных изображения магнитно-резонансной томографии. Все протонные спектры получены с помощью одновоксельной спектроскопии методом STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode Spectroscopy). Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики Fast-Mar. Для обработки экспериментальных спектров МРС была разработана специализированная компьютерная программа. Принцип работы программы подробно описан в статье Мошкина и соавт. [22]. Полученные спектры содержали пики следующих соединений: мио–инозитол, креатинин совместно с фосфокреатинином, глутамат совместно с глутамином, таурин, холиновые компоненты, аспарат, N-ацетиласпарат, γ -аминомасляная кислота (ГАМК), лактат, аланин, фосфорилэтанол-амин. Содержание метаболитов оценивали в процентах от их общего количества.

Полученные данные анализировали с помощью программы Statistica 8. В основном значения исследуемых параметров представлены в виде средних и ошибок средних ($M \pm m$). Только на рис. 3 результаты представлены в виде box-plot с максимальными, минимальными и медианными значениями параметров, где в пределах границ бокса располагается 50% полученных результатов для данной выборки, от минимальных значений до нижней границы бокса – 25% результатов, как и от максимальных значений до верхней границы бок-

са. Влияние факторов поведенческого фенотипа и экспериментальных условий на исследуемые параметры определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность различий между группами животных оценивали с помощью post hoc-тестов (Fisher LSD). Число исходных переменных, характеризующих относительное содержание нейрометаболитов, уменьшали методом дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (PLS-DA). Корреляции осей PLS-DA с метаболитами оценивали методом Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные по массе тела представлены в табл. 1. Как в контрольных, так и в экспериментальных группах тела у 3-месячных неселекционированных крыс был, меньше, чем у агрессивных и ручных ($p < 0.001$), а у агрессивных меньше, чем у ручных ($p < 0.01$) (табл. 1). Условия ранней социальной нестабильности не влияли на массу тела у самцов разных поведенческих фенотипов.

Данные по объему мозга, абсолютному и относительному объему гиппокампа представлены на рис. 3. Факторы поведенческого фенотипа и экспериментальных условий достоверно влияли на объем мозга ($F_{2,43} = 6.72, p < 0.01$ и $F_{1,43} = 4.59, p < 0.05$ соответственно). Взаимодействие факторов также было достоверно ($F_{2,43} = 3.85, p < 0.05$).

В контрольной группе у агрессивных самцов объем мозга был меньше, чем у ручных ($p < 0.01$) и неселекционированных ($p < 0.001$) (рис. 3), тогда как экспериментальные условия вызывали увеличение объема мозга у агрессивных крыс по сравнению с контролем ($p < 0.01$), тем самым различия, наблюдаемые в контрольной группе между агрессивными и остальными поведенческими фенотипами, нивелировались.

Данные по относительному объему мозга представлены в табл. 1. Фактор поведенческого фенотипа достоверно влиял на относительный объем мозга ($F_{2,43} = 69.56, p < 0.001$), тогда как экспери-

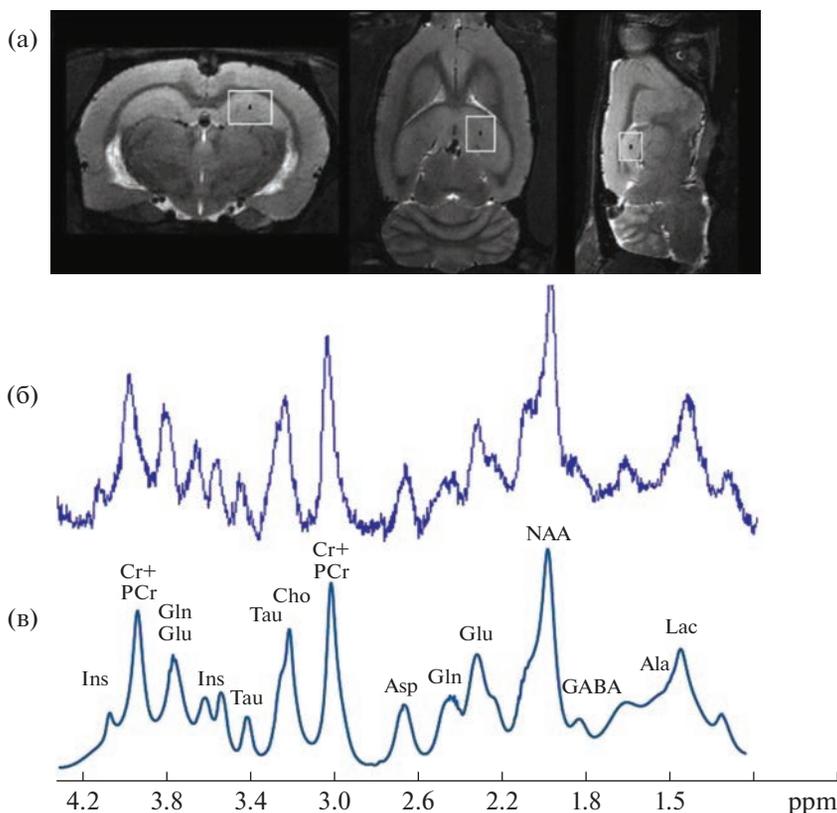


Рис. 2. Расположение области регистрации ¹H спектра нейрометаболитов в головном мозге крыс в трех ортогональных плоскостях (аксональной, сагитальной и корональной) (а), ¹H спектр до обработки (б), ¹H спектр после обработки (с). Обозначения: Ins – мио-инозитол; Cr – креатинин; PCr – фосфокреатинин; Glu – глутамат; Gln – глутамин; Tau – таурин; Cho – холин-производные; Asp – аспаргат; Ala – аланин; Lac – лактат; NAA – N-ацетиласпаргат; GABA – γ-аминомасляная кислота.

ментальные условия не влияли на этот параметр ($F_{1,43} = 2.39, p > 0.05$). Взаимодействие факторов было недостоверно ($F_{2,43} = 0.74, p > 0.05$). Как в контрольной, так и экспериментальной группах этот показатель был достоверно выше у неселекционированных крыс, чем у ручных и агрессивных ($p < 0.001$ в обоих случаях), но не отличался у ручных и агрессивных.

Фактор поведенческого фенотипа достоверно влиял на абсолютный объем гиппокампа ($F_{2,43} =$

$= 9.82, p < 0.001$), но не фактор экспериментальных условий ($F_{1,43} = 0.91, p > 0.05$). Взаимодействие этих факторов было недостоверно ($F_{2,43} = 2.58, p > 0.05$). В контрольной группе абсолютный объем гиппокампа у агрессивных самцов был меньше, чем у неселекционируемых и ручных ($p < 0.001$ – в обоих случаях).

Фактор поведенческого фенотипа достоверно влиял и на относительный объем гиппокампа ($F_{2,43} = 4.5, p < 0.05$), но не фактор эксперименталь-

Таблица 1. Масса тела и относительный объем мозга у 3-х месячных неселекционированных, агрессивных и ручных крыс в контрольной и экспериментальной группах

	Неселекционированные крысы		Агрессивные крысы		Ручные крысы	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Масса тела (г)	223.13 ± 13.09	210.00 ± 13.40	316.25 ± 11.81***	315.11 ± 14.57***	372.13 ± 12.49***&	379.50 ± 20.60***&&
Объем мозга/вес тела	8.89 ± 0.47	9.17 ± 0.42	4.99 ± 0.53***	5.96 ± 0.27***	5.00 ± 0.26***	5.15 ± 0.14***

*** – $p < 0.001$ по сравнению с неселекционированными самцами, & – $p < 0.05$ and && – $p < 0.01$ по сравнению с агрессивными самцами.

В каждой группе было по 8–9 животных.

ных условий ($F_{1,43} = 1.32, p > 0.05$). Взаимодействие этих факторов было недостоверно ($F_{2,43} = 1.69, p > 0.05$). В контрольной группе относительный объем гиппокампа у агрессивных самцов был меньше, чем у ручных ($p < 0.05$) (рис. 3).

PLS дискриминантный анализ процентов нейрометаболитов в гиппокампе показал, что в контроле агрессивные крысы значительно отличаются от ручных и неселекционируемых, тогда как последние не отличаются от ручных (рис. 4а). Судя по изменению нейрометаболитов в гиппокампе, исследуемые поведенческие группы отличаются по реакции на экспериментальные условия. Поскольку у агрессивных крыс такие изменения наиболее заметны, различия между агрессивными и другими поведенческими фенотипами, наблюдаемые в контроле, нивелируются (рис. 5а).

На рис. 4б и 5б представлены корреляции отдельных метаболитов по осям Y1 и Y2, которые показывают индивидуальный вклад каждого метаболита в интегральные характеристики метаболического профиля. В контрольной группе N-ацетиласпартат, аланин, производные холина и креатинин совместно с фосфокреатином вносят положительный вклад по оси Y1, тогда как аспартат, лактат и фосфорилэтанолламин – отрицательный. По оси Y2 положительный вклад вносит ГАМК, а глутамат совместно с глутамином и таурин – отрицательный. Экспериментальные условия изменяют вклад отдельных метаболитов по оси Y1 и Y2 по сравнению с контролем. Отрицательного вклада метаболитов нет по обоим осям. Вклад аспартата, лактата и фосфорилэтанолламина по оси Y1 и глутамата совместно с глутамином по оси Y2 становится положительным, тогда как в контроле был отрицательным. Кроме того, N-ацетиласпартат и креатинин совместно с фосфокреатином вносят вклад по оси Y1 в контроле и по оси Y2 – в экспериментальной группе.

Данные по содержанию отдельных нейрометаболитов в дорзальном гиппокампе у крыс представлены в табл. 2. Фактор поведенческого фенотипа влиял на процент N-ацетиласпартата ($F_{2,43} = 12.38, p < 0.001$), ГАМК ($F_{2,43} = 8.01, p < 0.01$), креатинина совместно с фосфокреатином ($F_{2,43} = 13.41, p < 0.001$), лактата ($F_{2,43} = 5.38, p < 0.01$) и фосфорилэтанолламина ($F_{2,43} = 6.03, p < 0.01$). В то время как фактор экспериментальных социальных условий оказывал влияние только на процент фосфорилэтанолламина ($F_{1,43} = 5.39, p < 0.05$). Взаимодействие этих факторов было недостоверно. По данным однофакторного дисперсионного анализа экспериментальные социальные условия влияли на процент аланина у крыс независимо от поведенческого фенотипа ($F_{1,47} = 5.06, p < 0.05$).

На основании парных сравнений средние уровни всех исследуемых нейрометаболитов в кон-

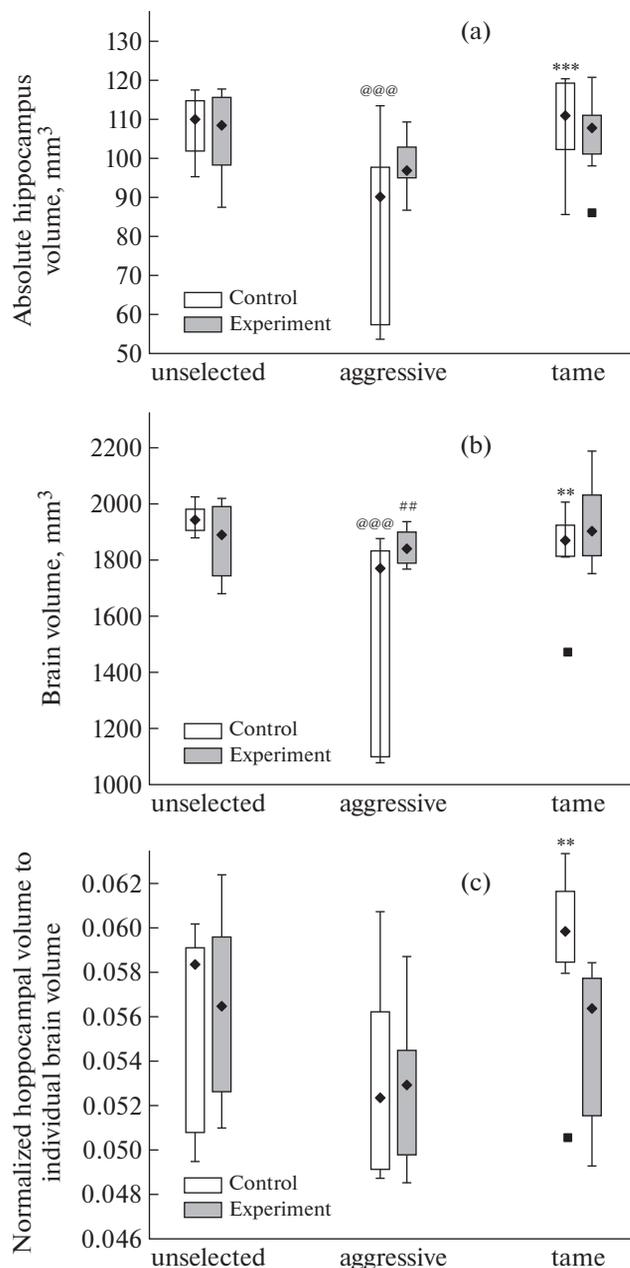


Рис. 3. Объем гиппокампа у неселекционированных, агрессивных и ручных крыс в контрольной и экспериментальной группах. (а) – абсолютный объем гиппокампа, (б) – объем мозга, (с) – относительный объем гиппокампа. @@@ – $p < 0.001$ to compare to unselected, *** – $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ as compared to aggressive, ## – $p < 0.01$ as compared to the control group. В каждой группе было по 8–9 животных.

трольной группе ручные крысы достоверно не отличались от неселекционированных. В контрольной группе у агрессивных крыс процент ГАМК, N-ацетиласпартата и производных холина был ниже, чем у ручных ($p < 0.05, p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно), тогда как процент фосфорилэтанолламина и аланина, наоборот, выше, чем у ручных

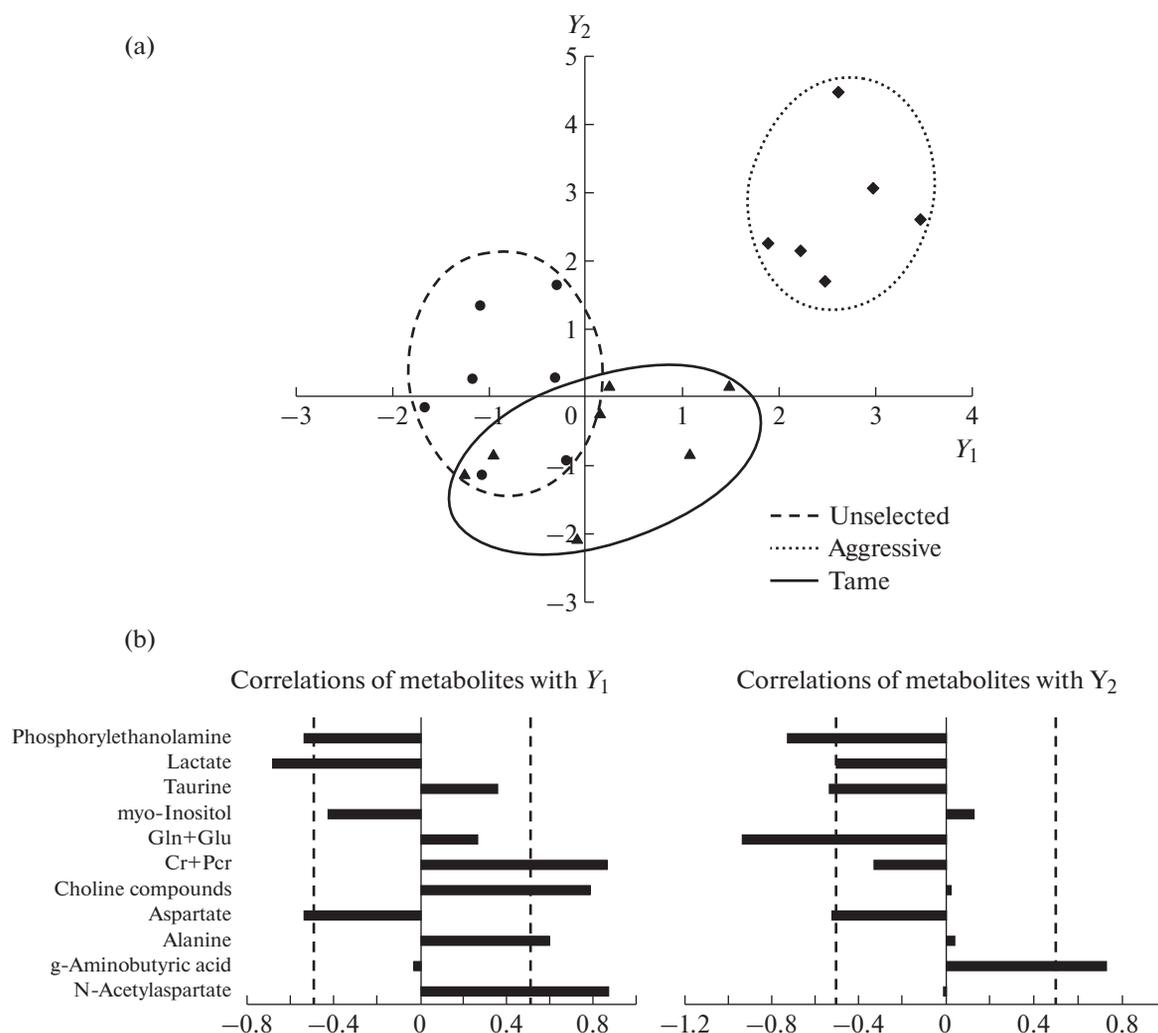


Рис. 4. (a) – интегральные характеристики метаболического профиля в дорзальном гиппокампе у неселекционируемых, агрессивных и ручных крыс из контрольной группы. В каждой группе было по 8 животных. (b) – корреляции уровня отдельных метаболитов с осями Y₁ и Y₂ в дорзальном гиппокампе у неселекционируемых, агрессивных и ручных крыс из контрольной группы. В каждой группе было по 8 животных.

($p < 0.05$ – в обоих случаях). По сравнению с неселекционированными крысами в контрольной группе у агрессивных был выше процент аспартата, фосфорилэтаноламина и лактата ($p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно), но ниже процент N-ацетиласпартата и креатинина совместно с фосфокреатинином ($p < 0.01$ – в обоих случаях). После экспериментальных социальных условий только у агрессивных самцов отмечали достоверное понижение процента фосфорилэтаноламина по сравнению с контрольной группой ($p < 0.01$), кроме того нивелировались различия, наблюдаемые в контрольной группе между агрессивными и неселекционированными, по проценту фосфорилэтаноламина, аспартата и таурина. Процент аланина у агрессивных самцов после экспериментальных социальных условий повышался по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные о меньшем объеме мозга у агрессивных крыс, чем у ручных и неселекционированных, согласуются с ранее опубликованными результатами на крысах дочерней популяции, исследуемой в Лейпциге, Германия, где было показано, что средний вес мозга у агрессивных крыс был меньше, чем у ручных, хотя вес тела при этом не отличался [23]. Однако в дочерней популяции отсутствовали неселекционированные крысы. В то же время относительный объем мозга у ручных и агрессивных крыс был меньше, чем у неселекционированных животных. По данным польских исследователей относительный объем мозга не отличался у диких Варшавских и инбредных лабораторных Brown Norway крыс [9]. Можно думать, что процесс лабораторизации в отличие от длительного отбора на ручное поведение не приводит к изме-

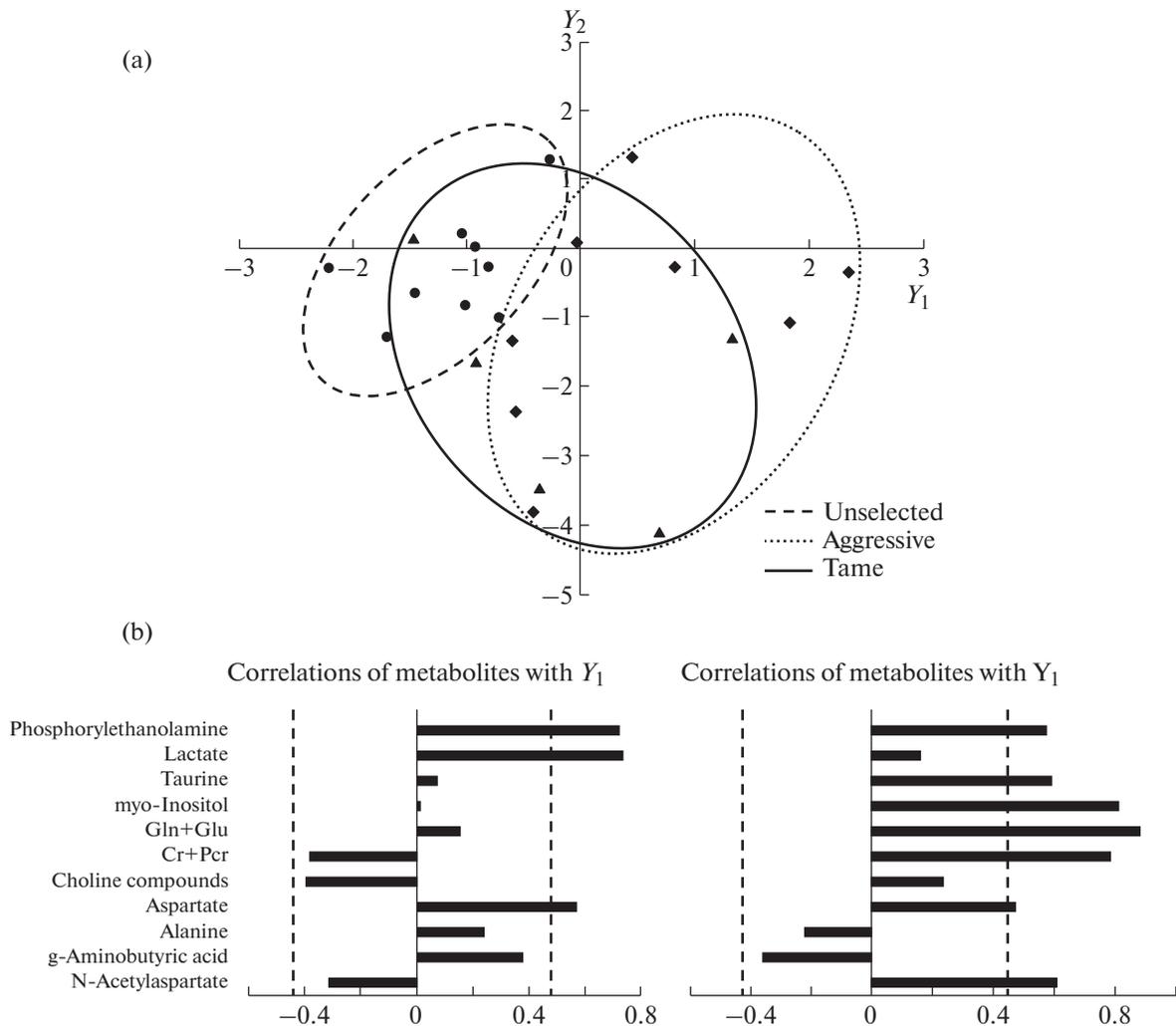


Рис. 5. (a) – интегральные характеристики метаболического профиля в дорзальном гиппокампе у неселекционируемых, агрессивных и ручных крыс крыс из экспериментальной группы. В каждой группе было по 8–9 животных. (b) – корреляции уровня отдельных метаболитов с осями Y_1 и Y_2 в дорзальном гиппокампе у неселекционируемых, агрессивных и ручных крыс из экспериментальной группы. В каждой группе было по 8–9 животных.

нению этого показателя. Отмечаемые нами повышенный вес тела и пониженный относительный объем мозга у ручных крыс по сравнению с неселекционированными (табл. 1) согласуются с данными о том, что у многих domesticiрованных животных больше вес тела и меньше относительный вес мозга, чем у их диких сородичей [24].

Уменьшение объема мозга наблюдали у пациентов с синдромами гиперактивности и дефицита внимания [25], а также у крыс с пре- и постнатальным гипотиреозом, индуцированным блокадой синтеза тироксина и трийодтиронина [26]. При этом Hasegawa и соавт. [26] отмечали дефекты в развитии радиальной глии, обеспечивающей миграцию нейрональных клеток в коре мозга, и в процессе миелинизации. Снижение веса мозга и содержания миелина в мозге наблюдали также после неонатальной тироидэктомии [27]. Возможно,

уменьшение относительного объема мозга у агрессивных и ручных по сравнению с неселекционированными также связано с изменением тироидной функции и/или процесса миелинизации.

Полученные нами результаты о меньшем относительном объеме гиппокампа в контрольной группе у агрессивных крыс по сравнению с ручными (рис. 3) согласуются с данными о том, что у диких Варшавских крыс этот показатель меньше, чем у лабораторных Brown Norway крыс [9]. Поскольку агонистическое поведение у крыс ослабевает не только в процессе отбора на ручное поведение [17], но и в процессе лабораторизации, можно думать, что для крыс с более выраженным агонистическим поведением (таких как диких Варшавских или селекционируемых на агрессивное поведение) характерно уменьшение относительного объема гиппокампа по сравнению с животными, агонистиче-

Таблица 2. Уровни метаболитов в дорзальном гиппокампе у 3-х месячных неселекционированных, агрессивных и ручных крыс в контрольной и экспериментальной группах

Нейро-метаболиты	Неселекционированные крысы			Агрессивные крысы			Ручные крысы		
	контроль	опыт	<i>p</i>	контроль	опыт	<i>p</i>	контроль	опыт	<i>p</i>
фосфорил-этанол-ламин	6.62 ± 0.56	5.05 ± 0.82	n.s.	11.14 ± 2.00**	6.79 ± 0.86	<i>p</i> < 0.01	5.73 ± 0.79&&	5.78 ± 1.00	n.s.
аланин	15.06 ± 1.64	17.02 ± 2.14	n.s.	12.04 ± 3.18	20.75 ± 3.13	<i>p</i> < 0.05	14.42 ± 2.57	17.58 ± 2.52	n.s.
ГАМК	4.95 ± 0.58	5.12 ± 0.45	n.s.	4.27 ± 0.38	5.53 ± 0.38	n.s.	6.52 ± 0.76&&	7.42 ± 0.69***&	n.s.
аспаргат	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.05	n.s.	0.50 ± 0.18*	0.09 ± 0.02	n.s.	0.11 ± 0.06&	0.28 ± 0.24	n.s.
N-ацетил-аспаргат	19.37 ± 0.61	19.82 ± 0.29	n.s.	14.92 ± 0.89***	16.14 ± 1.02**	n.s.	18.39 ± 1.18&&	18.94 ± 0.84&	n.s.
креатин и фосфо-креатин	15.02 ± 0.63	15.46 ± 0.29	n.s.	11.73 ± 0.79**	11.98 ± 0.72***	n.s.	13.69 ± 0.64&	13.46 ± 0.72*	n.s.
таурин	3.16 ± 0.16	3.06 ± 0.19	n.s.	3.26 ± 0.33	2.44 ± 0.24	n.s.	2.87 ± 0.25	2.87 ± 0.30	n.s.
холин и производные	2.02 ± 0.11	1.99 ± 0.08	n.s.	1.62 ± 0.13	1.84 ± 0.14	n.s.	2.04 ± 0.17&	2.03 ± 0.17	n.s.
миоинозитол	7.13 ± 0.32	8.12 ± 0.46	n.s.	6.90 ± 0.37	6.55 ± 0.45	n.s.	8.25 ± 1.28	7.08 ± 0.50	n.s.
лактат	2.71 ± 1.12	1.57 ± 0.81	n.s.	11.04 ± 2.83*	7.53 ± 2.29	n.s.	6.13 ± 3.26	4.03 ± 1.76	n.s.
глутамат и глутамин	23.89 ± 1.29	22.71 ± 0.80	n.s.	22.58 ± 0.81	20.35 ± 0.86	n.s.	21.86 ± 1.02	20.94 ± 1.32	n.s.

* – *p* < 0.05, ** – *p* < 0.01, and *** – *p* < 0.001 по сравнению с неселекционированными самцами, & – *p* < 0.05, and && – *p* < 0.01 по сравнению с агрессивными самцами.

В каждой группе было по 8–9 животных.

ское поведение которых проявляется в меньшей степени (таких как лабораторных Brown Norway или селекционируемых на ручное поведение). Это подтверждается и результатами, полученными на крысах, селекционируемых на контрастное тревожно-подобное поведение, которые свидетельствуют, что у крыс с пониженным тревожно-подобным поведением (LAV), но повышенной межсамцовой агрессией относительный объем гиппокампа меньше, чем у крыс с повышенным тревожно-подобным поведением (HAV) [7, 8].

Ранее было показано, что в контрольной группе агрессивные крысы медленнее обучаются находить платформу под водой в тесте Морриса по сравнению с ручными животными [28]. Ослабление обучаемости и памяти на фоне уменьшения объема гиппокампа отмечали также у крыс под влиянием непредсказуемого мягкого стресса [29], а после обогащения среды, наоборот, объем гиппокампа увеличивался и улучшалась обучаемость в разных тестах [30]. Эти данные позволяют думать, что понижение когнитивных способностей у агрессивных крыс в тесте Морриса также может быть связано с меньшим объемом гиппокампа по сравнению с ручными животными.

Уменьшение объема гиппокампа связывают с укорочением дендритов, более медленным нейрогенезом, уменьшением размера и числа глиальных клеток, а также межклеточного пространства [31–33]. Ранее было показано, что в гиппокампе у

агрессивных крыс выше уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF) и его предшественника pro-BDNF, а отношение BDNF/pro-BDNF, наоборот, ниже, чем у ручных [34]. Поскольку BDNF участвует в иницировании нейрогенеза, а pro-BDNF – апоптоза, то высказывается мнение, что у ручных крыс фактор нейрогенеза в большей степени превалирует над фактором апоптоза, чем у агрессивных. Эти различия могут в какой-то мере объяснять меньший объем гиппокампа у агрессивных крыс по сравнению с ручными.

Уменьшение объема гиппокампа у пациентов, болезни которых связаны со стрессом (пограничное нарушение личности, депрессия и пост-травматический синдром) связывают с повышенной активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [5, 6]. Показано, что кортикостероиды влияют на регуляцию процессов нейрогенеза и апоптоза [35]. При повышенном уровне этих гормонов, как и при стрессе, отмечают уменьшение объема гиппокампа и атрофию нейронов [36]. Эти данные согласуются с полученными нами, поскольку у агрессивных крыс не только меньше объем гиппокампа, но и выше базальный уровень кортикостерона в крови, чем у ручных, о чем упоминалось ранее [15]. Можно предполагать, что более слабая пролиферация клеток и меньшая плотность нейронов обуславливают отставание агрессивных крыс от ручных по объему гиппокампа в контрольной группе. Хотя нельзя исключать, что такое отставание может быть связано и с особенностями

миелинизации аксонов, поскольку в дорзальном гиппокампе ранее были найдены различия между ручными и агрессивными крысами по процентам NAA и фосфорилэтаноламина [18], которые участвуют в этом процессе [37, 38]. Так, в контрольной группе у агрессивных крыс относительно ручных и неселекционированных повышен процент фосфорилэтаноламина, но понижен процент NAA. Известно, что фосфорилэтаноламин входит в состав сфингомиелина, необходимого для клеточных мембран и, особенно, миелиновых оболочек [38], а NAA является донором ацетильных групп в синтезе миелина [37].

В данной работе не обнаружено влияния экспериментальных социальных условий на абсолютный и относительный объем гиппокампа у агрессивных, ручных и неселекционированных крыс.

Судя по полученным данным, уровень фосфорилэтаноламина в дорзальном гиппокампе у агрессивных крыс под влиянием условий социальной нестабильности становится ниже, чем у соответствующих контрольных животных (табл. 2). Тогда как уже упоминалось, что в контрольной группе у агрессивных крыс его уровень повышен по сравнению с ручными и неселекционированными [18]. Из этого следует, что условия ранней социальной нестабильности и отбор на агрессивное поведение действуют в противоположных направлениях, и различия, наблюдаемые по этому показателю в контрольной группе, нивелируются у экспериментальных животных. Таким же образом изменяются интегральные характеристики метаболического профиля, которые в контрольной группе у агрессивных крыс значительно отличаются от ручных и неселекционированных (рис. 4а), а под влиянием ранних социальных условий эти различия нивелируются (рис. 5а). К тому же только в контрольной, но не в экспериментальной группе агрессивные и ручные крысы отличаются по объему мозга, а также абсолютному и относительному объему гиппокампа (рис. 3).

Показано ингибирующее дозозависимое влияние фосфорилэтаноламина на окислительное фосфорилирование в митохондриях в условиях *in vitro* [39]. По мнению авторов, митохондриальная дисфункция у пациентов с депрессией и биполярными расстройствами, часто сопровождающимися агрессией, связана с изменением фосфолипидного метаболизма. В связи с этим повышенный процент фосфорилэтаноламина у агрессивных самцов в контроле относительно ручных и неселекционированных животных также может быть одним из показателей митохондриальной дисфункции в гиппокампе у этих животных, которая может ослабевать с понижением уровня этого нейрометаболита у экспериментальных агрессивных крыс по сравнению с соответствующей контрольной группой и с приближением его к значениям,

характерным для ручных и неселекционированных животных. Исследование на крысах по влиянию материнской депривации в течение 24 ч на 9-й день жизни свидетельствует, что у крысят на 13-й день повышается уровень фосфорилэтаноламина в гиппокампе у 13-х дневных крысят [40]. Тогда как исследуемые нами ранние социальные условия, наоборот, вызывают понижение процентов фосфорилэтаноламина в гиппокампе у агрессивных в 3-х месячном возрасте, т.е. спустя 2 мес после экспериментальных воздействий. По-видимому, условия ранней социальной нестабильности у агрессивных крыс не вызывают такой стресс, как материнская депривация, и/или эти животные успевают адаптироваться к ним.

Условия ранней социальной нестабильности вызывали повышение уровня аланина в гиппокампе у агрессивных крыс по сравнению с соответствующими контрольными животными (табл. 2). В литературе есть свидетельства о том, что аланин, участвуя в переносе аммония к глиальным клеткам, обеспечивает тем самым нейротрансмиттерный цикл – глутамат/глутамин, который связывает нейрональные и глиальные клетки [41]. К тому же при дезаминировании аланина в глиальных клетках образуется лактат, который поступает в нейроны. Связь между уровнями аланина и лактата в гиппокампе просматривается и по нашим данным у агрессивных крыс. Так, если в контрольной группе уровень лактата в гиппокампе у агрессивных крыс в 4 раза выше, чем у неселекционированных, то это различие нивелируется у экспериментальных животных, возможно, за счет повышения уровня аланина у первых после экспериментальных воздействий по сравнению с контрольными животными.

В результате изменения интегральных характеристик метаболического профиля в дорзальном гиппокампе и, в частности, уровней фосфорилэтаноламина и аланина у агрессивных крыс под влиянием ранней социальной нестабильности могут быть связаны с понижением стресс-реактивности у этих животных, о чем свидетельствуют ранее полученные данные [19]. Судя по клиническим исследованиям, у детей, выросших в благоприятных условиях, также отмечается ослабление реакции на стресс и даже агрессивности, несмотря на высокий наследственный риск их развития [42].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Содержание использованных линий крыс в виварии конвенциональных животных ИЦиГ (Новосибирск) поддерживалось бюджетным проектом FWNR-0259-2022-0019. Исследование влияния ранней социальной нестабильности на функциональные параметры гиппокампа проводилось при поддержке гранта РНФ 21-44-04405. Оборудование Центра коллективного пользования “Генетические ресурсы лабораторных животных” обеспечивалось за счет Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект RFME-F162117X0015.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Р.Г.Г., А.Е.Ф. и М.П.М. Сбор данных – С.Г.Ш., А.Е.А., Р.Г.Г. и Р.В.К. Обработка данных – С.Г.Ш., А.Е.А., Ю.Э.Г. Написание и редактирование манускрипта – Р.Г.Г., А.Е.А., М.П.М. и Ю.Э.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang Y, Glenn AL, Raine A, Phil D (2008). Brain abnormalities in antisocial individuals: implications for the law. *Behav Sci Law* 26: 65–83. <https://doi.org/10.1002/bsl.788>
2. Kohl C, Riccio O, Grosse J, Zanoletti O, Fournier C, Schmidt MV, Sandi C (2013) Hippocampal neuroigin-2 overexpression leads to reduced aggression and inhibited novelty reactivity in rats. *PNAS* 8 (2): e56871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056871>
3. Zetsche T, Preuss U, Frodl T, Schmitt G, Seifert D, Munchhausen E, Tabrizi S, Leinsinger G (2007) Hippocampal volume reduction and history of aggressive behaviour in patients with borderline personality disorder. *Psychiatry Res: Neuroimaging* 154: 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2006.05.010>
4. Ruocco AC, Amirthavasagam S, Zakzanis KK (2012) Amygdala and hippocampal volume reductions as candidate endophenotypes for borderline personality disorder: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Psychiatry Res: Neuroimaging* 201: 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2012.02.012>
5. Bremner JD, Randal P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, Capelli S, McCarthy G, Innis RB, Charney DS (1997) Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse—a preliminary report. *Biol Psychiatry* 41: 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(96\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(96)00162-X)
6. Woon FL, Sood S, Hedges DW (2010) Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: A meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 1181–1188. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.016>
7. Kalisch R, Schubert M, Jacob W, Kesler M, Hemauer R, Wigger A, Landgraf R, Auer DP (2006) Anxiety and hippocampus volume in the rat. *Neuropsychopharmacology* 31: 925–932. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300910>
8. Veenema AH, Neumann ID (2007) Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain Behav Evol* 70 (4): 274–285. <https://doi.org/10.1159/000105491>
9. Welniak–Kaminska M, Fiedorowicz M, Orzel J, Bogorodzki P, Modlinska K, Stryjek R, Chrzanowska A, Pisula W, Grieb P (2019) Volumes of brain structures in captive wildtype and laboratory rats: 7T magnetic resonance *in vivo* automatic atlas-based study. *PLoS One* 14 (4): e0215348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215348>
10. Eiland L, Romeo RD (2013) Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience* 249: 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.048>
11. Vythilingam M, Heim C, Newport J, Mille, A, Anderson E, Bronen R, Brummer M, Staib L, Vermetten E, Charney DS, Nemeroff CB, Bremner JD (2002) Childhood Trauma Associated With Smaller Hippocampal Volume in Women With Major Depression. *Am J Psychiatry* 159: 2072–2080. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.12.2072>
12. Jackowski A, Perera TD, Abdallah CG, Garrido G, Tang CY, Martinez J, Mathew SJ, Gorman JM (2011) Early-life stress, corpus callosum development, hippocampal volumetrics, and anxious behavior in male nonhuman primates. *Psychiatry Res: Neuroimaging* 192: 37–144. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2010.11.006>
13. Coplan JD, Mathew SJ, Abdallah CG, Mao X, Kral JG, Smith ELP, Rosenblum LA, Perera TD, Dwork AJ, Hof PR, Gorman JM, Shungu DC (2010) Early-life stress and neurometabolites of the hippocampus. *Brain Res* 1358: 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.02>
14. Veenema AH (2009) Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front Neuroendocrinol* 30: 497–518. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.03.003>
15. Oskina I, Herbeck Y, Shikhevich S, Plyusnina I, Gulevich R (2008) Changes in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the immune system in animals selected for domestic behavior. *The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists* 12: 39–49.
16. Plyusnina I, Solov’eva M (2010) Intraspecific intermale aggression in tame and aggressive Norway rats. *Zhurn Vyssh Nervn Deiat Im IP Pavlova* 60: 175–183.

17. Plyusnina IZ, Solov'eva MY, Oskina IN (2011) Effect of domestication on aggression in gray rats. *Behav Genet* 41: 583–592.
<https://doi.org/10.1007/s10519-010-9429-y>
18. Gulevich RG, Akulov AE, Shikhevich SG, Kozhemyakina RV (2016) Proton-magnetic resonance spectroscopy of neurometabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats. *Rus J Genetics: Applied Res* 6: 430–436.
<https://doi.org/10.1134/S2079059716040079>
19. Gulevich RG, Shikhevich SG, Konoshenko MY, Kozhemyakina RV, Herbeck YuE, Prasolova LA, Oskina IN, Plyusnina IZ (2015) The influence of social environment in early life on the behavior, stress response, and reproductive system of adult male Norway rats selected for different attitudes to humans. *Physiol Behav* 144: 116–123.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.018>
20. McCormick CM, Green MR, Cameron NM, Nixon F, Levy MJ, Clark RA (2013) Deficits in male sexual behavior in adulthood after social instability stress in adolescence in rats. *Horm Behav* 63: 5–12.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.11>
21. Sachser N, Kaiser S, Hennessy MB (2013) Behavioural profiles are shaped by social experience: when, how and why. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368 (1618): 20120344.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0344>
22. Moshkin MP, Akulov AE, Petrovski DV, Saik OV, Petrovskiy ED, Savelov AA, Koptyug IV (2014) Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D- glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed* 27: 399–405.
<https://doi.org/10.1002/nbm.3074>
23. Albert FW, Schepina O, Winter C, Rompler H, Teupser D, Palme R, Ceglarek U, Kratzsch J et al. (2008) Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards human. *Horm Behav* 53: 413–421.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.010>
24. Kruska DC (2005) On the evolutionary significance of encephalization in some eutherian mammals: effects of adaptive radiation, domestication, and feralization. *Brain Behav Evol* 65 (2): 73–108.
<https://doi.org/10.1159/000082979>
25. Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Vauss YC, Snell JW, Lange N, Kaysen D, Krain AL, Ritchie GF, Jagath C, Rajapakse JC, Rapoport JL (1996) Quantitative Brain Magnetic Resonance Imaging in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53: 607–616.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1996.01830070053009>
26. Hasegawa M, Kida I, Wada H (2010) A volumetric analysis of the brain and hippocampus of rats rendered perinatal hypothyroid. *Neurosci Lett* 479: 240–244.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.070>
27. Balazs R, Brooksbank BWL, Davison AN, Eayrs JT, Wilson DA (1969) The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res* 15: 219–232.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(69\)90321-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(69)90321-7)
28. Plyusnina IZ, Shchepina OA, Os'kina IN, Trut LN (2008) Some features of learning in the Morris water test in rats selected for responses to humans. *Neurosci Behav Physiol* 38: 511–516.
29. Luo Y, Cao Z, Wang D, Wu L, Li Y, Sun W, Zhu Y (2014) Dynamic study of the hippocampal volume by structural MRI in a rat model of depression. *Neurol Sci* 35: 1777–1783.
<https://doi.org/10.1007/s10072-014-1837-y>
30. Jenks KR, Lucas MM, Duffy BA, Robbins AA, Gimi B, Barry JM, Scott RC (2013) Enrichment and Training Improve Cognition in Rats with Cortical Malformations. *PLoS One* 8 (12): e84492.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084492>
31. Wennstrom M, Hellsten J, Ekstrand J, Lindgren H, Tingstrom A (2006) Corticosterone-Induced Inhibition of Gliogenesis in Rat Hippocampus is Counteracted by Electroconvulsive Seizures. *Biol Psychiatry* 59: 178–186.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.08.032>
32. Czéh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? *Eur Arc. Psychiatry Clin Neurosci* 257: 250–260.
<https://doi.org/10.1007/s00406-007-0728-0>
33. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342: 373–377.
<https://doi.org/10.1126/science.1241224>
34. Ilchibaeva TV, Kondaurova EM, Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Popova NK, Naumenko VS (2015) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav Brain Res* 290: 45–50.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.041>
35. Riedemann T, Patchev AV, Cho K, Almeida OF (2010) Corticosteroids: way upstream. *Mol Brain* 3: 2.
<https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-2>
36. Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006) Hippocampal neurogenesis: Opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239–249.
<https://doi.org/10.1002/hipo.20156>
37. Madhavarao CN, Arun P, Moffet JR, Szucs S, Surendran S, Matalon R, Garbern J, Hristova D, Johnson A, Jiang W, Nambodiri MAA (2005) Defective N-acetylaspartate catabolism reduces brain acetate levels and myelin lipid synthesis in Canavan's disease. *PNAS* 102: 5221–5226.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0409184102>
38. Myller AT, Karhe JJ, Pakkanen TT (2010) Preparation of aminofunctionalized TiO₂ surfaces by binding of organophosphates. *Appl Surface Sci* 257: 1616–1622.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.08.109>
39. Modica-Napolitano JS, Renshaw PF (2004) Ethanolamine and phosphoethanolamine inhibit mitochondrial function in vitro: implications for mitochondrial dysfunction hypothesis in depression and bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 55: 273–277.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00784-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00784-4)

40. *Llorento R, Villa P, Marco EM, Viveros MP* (2012) Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience* 201: 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011>
41. *Zwingmann C, Richter-Landsberg C, Brand A, Leibfritz D* (2000) NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-(13)C]alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia* 32 (3): 286–303.
[https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200012\)32:3<286::aid-glia80>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200012)32:3<286::aid-glia80>3.0.co;2-p)
42. *Kim-Cohen J, Turkewitz R* (2012) Resilience and measured gene-environment interactions. *Dev Psychopathol* 24 (4): 1297–1306.
<https://doi.org/10.1017/S0954579412000071>

HIPPOCAMPAL VOLUME AND THE SPECTRUM OF METABOLITES IN ADULT GRAY RATS (*RATTUS NORVEGICUS*) SELECTED FOR DIFFERENT ATTITUDES TO HUMANS AND EXPOSED TO SOCIAL DISTURBANCE IN EARLY LIFE

S. G. Shikhevich^a, A. E. Akulov^a, R. V. Kozhemyakina^a, M. P. Moshkin^a,
Y. E. Herbeck^a, and R. G. Gulevich^{a,#}

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

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

Previous magnetic resonance studies of the dorsal hippocampus of male rats selected for aggressive attitude to humans revealed lower contents of γ -aminobutyric acid (GABA), N-acetylaspartate, and creatine+phosphocreatine and an elevated content of phosphorylethanolamine as compared to males selected for tame behavior. We investigated the influence of early social instability environment on the hippocampal volumes and spectrum neurometabolites in the dorsal hippocampi of adult tame, aggressive, and unselected rats. The experimental social instability included early weaning, subsequent housing in twos till the age of 3 months, a daily replacement of cagemates from days 19 to 25. Animals of the control groups were weaned at the age of 30 days and kept in fours or fives until the age of 3 months. Control aggressive males were inferior to tame in hippocampal volumes, absolute and normalized to individual brain volumes. The early social instability showed no effect on these indices. In the experimental groups, lower content of phosphorylethanolamine and higher content of alanine in the dorsal hippocampus as compared to control animals were recorded only in aggressive rats. This fact may be related to the formerly observed lower level of stress response in these animals. It follows from the results that aggressive rats are more sensitive to social instability conditions. Also, the early instability conditions and selection for aggressive behavior oppositely affect phosphorylethanolamine metabolism and the integral parameters of the metabolic profile in the dorsal hippocampus.

Keywords: rat, aggression, hippocampus, magnetic resonance imaging, neurometabolite

Работа посвящается памяти Д.В. Лычакова

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ АСИММЕТРИЯ АНТЕНН И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ АСИММЕТРИИ ПРИ ГРУМИНГЕ У ТАРАКАНА *PERIPLANETA AMERICANA* L.

© 2023 г. М. И. Жуковская¹, Е. С. Новикова^{1,*}

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

*e-mail: os_sacrum@list.ru

Поступила в редакцию 30.10.2022 г.

После доработки 20.12.2022 г.

Принята к публикации 23.12.2022 г.

Для многих форм поведения животных характерна функциональная асимметрия, или латерализация поведенческих реакций, которая может быть обусловлена наличием морфологической асимметрии тела и/или мозга. Чтобы проверить гипотезу о связи функциональной асимметрии груминга с морфологической асимметрией антенн, измеряли длину антенн американского таракана *Periplaneta americana*, диаметр скапуса, диаметр и длину педицеллума и сегментов флагеллума и анализировали изменения в поведении тараканов при предъявлении компонента полового феромона, перипланона Б. Полученные данные свидетельствуют о статистически значимых различиях в морфологии антенн: длина сегментов больше на левой антенне, а ширина – на правой, за исключением короткого участка вблизи основания. Корреляционный анализ позволил выявить следующие закономерности: более длинная правая антенна соответствует большему времени, затраченному на ее чистку; диаметр скапуса, больший на правой антенне, коррелирует с частотой чисток антенн, асимметрия сегментов флагеллума не влияет на асимметрию чисток. Предъявление полового феромона в надпороговой дозе увеличивало асимметрию груминга антенн, при этом асимметрия для чисток ног в целом не менялась. Таким образом, асимметрия груминга антенн, возникающая, по крайней мере, отчасти, вследствие морфологической асимметрии, существенно изменяется в присутствии биологически важного обонятельного стимула – полового феромона.

Ключевые слова: асимметрия, насекомые, *Periplaneta americana*, груминг, обоняние, перипланон Б

DOI: 10.31857/S0044452923020079, **EDN:** BITHCD

ВВЕДЕНИЕ

Поведенческие асимметрии или латерализация не являются чем-то необычным для животных, включая насекомых. Одни из них являются производными лево-правых асимметрий частей тела, возникших как видоспецифические признаки (крабы, птицы, улитки) [1–5], другие возникают у внешне симметричных животных [6–8], однако, при более тщательном изучении, в некоторых случаях обнаруживаются корреляции поведения с асимметрией мозга, сенсорных или моторных органов [9]. В некоторых случаях достоверные корреляции между морфологической и поведенческой асимметриями отсутствуют [10]. Асимметрии тела и мозга могут быть взаимосвязаны, например, сенсиллы антенн медоносной пчелы по-разному распределены на левой и правой антенне, что приводит к соответствующим различиям в структурах антеннальных долей [11, 12]. У самок таракана

Nauphoeta cinerea больше обонятельных гломерул (первичных образований обонятельного нейропиля, каждая из которых связана с обонятельными нейронами, несущими одинаковые рецепторы) в нейропиле правого дейтоцеребрума, а ампутация правой антенны приводит к нарушению ответов на половой феромон, выделяемый самцами [13]. Считается, что эти асимметрии имеют эволюционные преимущества и поддерживаются естественным отбором [14–18]. Другой вид асимметрии тела известен как флуктуирующая асимметрия и рассматривается как следствие несовершенного контроля билатеральной симметрии в процессе развития [19–21]. Флуктуирующая асимметрия характеризуется распределением коэффициента асимметрии по нормальному закону, отличаясь от направленной асимметрии и антисимметрии [22].

Антенны тараканов представляют собой сложные сенсорные придатки, несущие механочувстви-

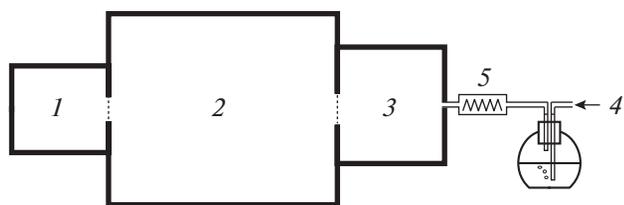


Рис. 1. Экспериментальная установка. 1 – затененное укрытие, 2 – основной вольер с водой, пищей и инвертированным режимом освещения 12:12 (свет : темнота), 3 – экспериментальная камера, 4 – подача искусственной воздушной смеси, 5 – диспенсер с перипланом Б (гексаном в контроле). Пунктиром обозначены дверцы.

тельные, вкусовые и обонятельные сенсиллы, более того, примерно половина всех антеннальных сенсилл у взрослых самцов американского таракана чувствительны к половым феромонам самок. Антенны развиваются постепенно, добавляя новые сегменты при каждой линьке путем деления меристона, первого флагеллярного сегмента и нескольких соседних [23]. В имагинальных антеннах личиночный меристон становится частью педицеллума [24]. Таракан чистит флагеллум антенны, захватывая его лапкой контралатеральной передней ноги. Поскольку только первые два сегмента антенны, скапус и педицеллум, приводятся в движение мышцами [25], а длина и диаметр подвижных сегментов влияют на гибкость антенны, морфологические характеристики этих сегментов, наряду с другими параметрами, представляются функционально важными. Наши предыдущие данные доказывают, что уход за антеннами является очень важным механизмом, обеспечивающим высокую чувствительность и временное разрешение запаховых сигналов у таракана [26–28]. Показано, что тараканы достоверно чаще чистят флагеллум правой антенны, чем левой, а асимметрия чисток ног и оснований антенн была недостоверной [29].

Настоящая работа была спланирована с целью проверки предположения о том, что латерализация груминга антенн может быть следствием морфологической асимметрии этих парных сенсорных органов, а также выяснить, какие из морфологических признаков вносят наибольший вклад в поведенческие асимметрии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Личинки самцов последнего возраста *Periplaneta americana* L. были взяты из колонии инсектария ИЭФБ РАН и далее содержались в лаборатории при инвертированном фоторежиме 12 : 12 (свет : темнота) и температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$. После имагинальной линьки тараканов переносили в экспериментальную установку (рис. 1), где они находились не менее

двух недель до начала экспериментов в тех же условиях. Эксперименты начинались в первой половине темновой фазы. Вода и пища присутствовали постоянно.

Установка состояла из 3 компонентов: прозрачного пластикового вольера ($35 \times 25 \times 11$ см) с пищей и водой, укрытия ($15 \times 15 \times 7$ см), внутри которого было постоянно темно, и сменной тестовой камеры ($15 \times 15 \times 10$ см); последние 2 были отделены от вольера пластиковыми дверцами [29, 30]. В начале эксперимента дверь между укрытием и вольером закрывали, а дверь в тестовую камеру открывали на короткое время, пропуская в нее только одно насекомое. Искусственная воздушная смесь (21% O_2 и 79% N_2), увлажненная барботированием через дистиллированную воду, подавалась в тестовую камеру со скоростью потока 3.5 мл/мин для поддержания постоянной концентрации газов и влажности на протяжении всего исследования, необходимых для воспроизводимости поведенческих реакций [31]. Видеокамера VSC-756 USB (ЭВС, Россия с разрешением 740×576 пикселей и частотой 25 кадров/с) располагалась на высоте 30 см от пола тестовой камеры. Темно-красный светодиодный фотофонарь Рубин-3 создавал освещенность 0.13 мкВт/см^2 .

Две последовательных сессии видеозаписи продолжительностью 30 мин начинались после 10-минутного периода адаптации и следовали друг за другом с 10-минутным перерывом. Перед началом второй сессии увлажненную воздушную смесь начинали подавать через шприц с диспенсером, на который наносили растворенный в 10 мкл гексана главный компонент полового феромона, перипланон Б (ПБ), в подпороговой дозе 10^{-13} г (PB-13, $n = 13$) или в дозе, вызывающей поведенческий ответ у большинства самцов 10^{-11} г (PB-11, $n = 7$), как было определено ранее [32]. В контрольных экспериментах на диспенсер наносили 10 мкл гексана ($n = 5$). После эксперимента тестовую камеру убрали и тараканов в установку не возвращали. Эта схема была выбрана, чтобы избежать мечения тараканов, поскольку ранее было показано, что оно влияет на груминг [33]. После поведенческого тестирования насекомое помещали в специальный пенал [34], антенны закрепляли на столике (рис. 2) и измеряли штангенциркулем, а затем исследовали под бинокулярным микроскопом Micromed Stereo Zoom, соединенным с 3-мегапиксельной цифровой камерой DCM 300 (ScopeTek, Китай). Программное обеспечение ScopePhoto, прилагаемое к камере, использовалось для проведения следующих измерений: диаметр скапуса, диаметр и длина педицеллума, диаметр и длина флагелломеров № 1, 2, 10, 50, 90, 130. Для каждой антенны подсчитыва-



Рис. 2. Морфометрия члеников антенны. Показаны линии и их длина в пикселях. 1 – скапус, 2 – педицеллум, 3 – первый членик флагеллума.

ли количество флагелломеров. Поведенческие эксперименты с последующей морфометрией провели для 25 самцов.

Видеофайлы с поведенческими данными обрабатывались вручную с покадровым просмотром для точного определения начала и конца поведенческих актов. Определяли частоты и тайминг груминга антенн и других органов. Полученные значения переносили в MS Excel для дальнейшей обработки данных. Коэффициент асимметрии (K_{ac}) рассчитывали следующим образом $K_{ac} = (R - L)/(R + L)$, где R и L – измерения для правой и левой стороны тела соответственно.

Статистическую обработку проводили с помощью статистического пакета IBM SPSS statistics 22 и онлайн-калькулятора (<http://vassarstats.net>). Выборки проверяли на нормальность их распределения с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение не отличалось от нормального, применяли параметрическую статистику – критерий Стьюдента и ANOVA. С помощью корреляционного анализа Спирмена оценивали

связь морфологических параметров между собой и с поведенческими данными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения морфологических параметров антенн были проведены для 25 взрослых самцов. Длина правой антенны составляла 42.3 ± 1.2 мм, левой 40.1 ± 1.9 мм, разница статистически не достоверна ($p > 0.05$, критерий Стьюдента для парных данных). Длина левой и правой антенн одного и того же насекомого значительно коррелировала (коэффициент корреляции рангов Спирмена $r = 0.6$, $p < 0.001$), хотя у нескольких животных была отмечена большая разница между антеннами (табл. 1).

K_{ac} , рассчитанные для длины антенны, и количества сегментов на антеннах достоверно коррелировали (табл. 2). Предполагаемой связи между коэффициентами асимметрии для базального сегмента и длины антенны обнаружено не было. Однако асимметрия флагеллярных сегментов антенн и педицеллума положительно коррелировала, а именно, K_{ac} для диаметров флагелломеров достоверно положительно коррелировал с K_{ac} для диаметров педицеллума, а K_{ac} для длины флагелломеров – соответственно с этим параметром, рассчитанным для педицеллумов. Асимметрию скапуса удалось рассчитать только для диаметра этого сегмента ($K_{ac} = 0.014 \pm 0.008$) из-за его неправильной формы. Усредненные по выборке K_{ac} для длин антеннальных сегментов были отрицательными для базальной половины антенны до 50-го сегмента, начиная с педицеллума, что означает большие значения для левой антенны по сравнению с правой. Диаметр сегмента был в среднем одинаковым для правой и левой антенн, что давало значения K_{ac} , близкие к нулю. Небольшой подъем K_{ac} на конце антенны, флагелломеры № 50 и № 90, не был статистически значимым (рис. 3а). Нам не удалось обнаружить достоверные отличия K_{ac} от нуля ни для одного из морфологических параметров – длины или ширины антеннальных сегментов.

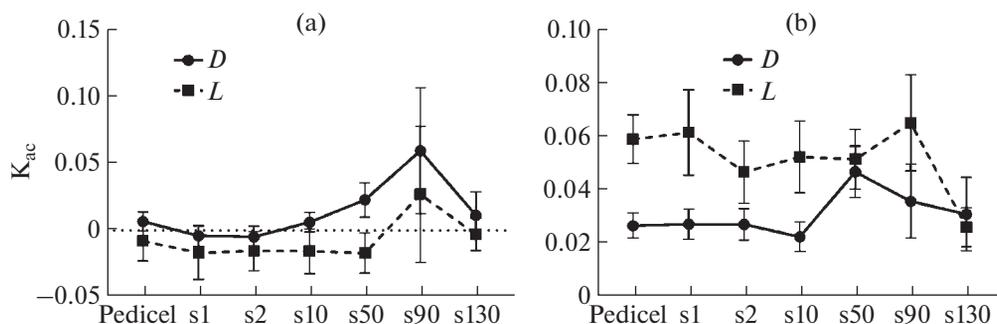


Рис. 3. Асимметрия сегментов антенны. (а) K_{ac} с учетом знака. (б) Абсолютные величины K_{ac} . D – диаметр сегмента, L – длина сегмента. S1-130 – порядковый номер сегмента флагеллума от основания.

Таблица 1. Морфологические параметры антенны

№ таракана	Длина антенны, мм		Число сегментов	
	R	L	R	L
1	44.7	50.8	116	139
2	48.4	49.8	138	148
3	48	10.8	126	46
4	35	34	113	112
5	41	42	136	131
6	41.2	40.6	137	123
7	37.3	30.3	112	85
8	49.5	40	126	121
9	42.1	45.2	129	146
10	44	43.4	138	126
11	43.5	45.2	144	146
12	46.4	42.2	133	142
13	51	51.5	143	146
14	48.3	43.6	144	107
15	40.3	39.5	144	132
16	47.9	46.3	142	144
17	33	43.7	102	136
18	34.1	28	115	74
19	39.4	39.1	126	128
20	33.5	23.2	93	52
21	28.1	34.9	99	117
22	47.3	51.5	131	128
23	42.5	36.3	143	122
24	39.1	39.8	132	129
25	51	50.7	145	144
Среднее ± ошибка	42.3 ± 1.2	40.1 ± 1.9	128 ± 3	121 ± 6

Однако несложно заметить, что K_{ac} ширины и длины антеннальных сегментов в целом по антенне различалась. Парный t-критерий, рассчитанный для средних значений K_{ac} между длиной и диаметром одноименного сегмента, выявил значительную разницу ($p < 0.01$), т.е. левая антенна была чуть тоньше правой, но с немного более длинными сегментами. Полученные измерения показывают небольшую направленную морфологическую асимметрию антенн у тараканов. Наиболее симметричной оказалась толщина антенны вблизи основания – K_{ac} диаметра скапуса, педицеллума и первых флагелломеров был близок к нулю.

Абсолютные значения K_{ac} , рассчитанные для оценки флуктуирующей асимметрии, были выше для длины сегмента, чем для его диаметра ($p < 0.05$, рис. 3b).

Поведенческая асимметрия, рассчитанная для числа чисток антенн, показала незначительное преобладание числа чисток правой антенны в течение получасового наблюдения ($K_{ac} = 0.08 \pm 0.04$; $n = 22$), сходно с обнаруженной ранее [29], однако в настоящем исследовании различия оказались недостоверными ($p = 0.15$, t-критерий Стьюдента). Достоверная правосторонняя асимметрия показана для частоты и времени чисток средних ног ($p < 0.05$). В целом, частота ($K_{ac} = 0.16 \pm 0.06$; t-критерий Стьюдента, $p < 0.01$) и суммарное время ($K_{ac} = 0.11 \pm 0.04$; t-критерий Стьюдента, $p < 0.05$) чисток придатков правой стороны тела имели достоверную правостороннюю асимметрию.

Далее, K_{ac} менялся в зависимости от стимуляции во второй сессии (рис. 4). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), рассчитанный для трех групп (контроль, РВ-13 и РВ-11) показал достоверные различия ($p < 0.05$) для вторых сессий экспериментов, в то время как предшествующих по K_{ac} различий для первых сессий не наблюдалось ($p > 0.05$). Последующий апостериорный анализ по Геймс-Хоуэлу выявил, что асимметрия при предъявлении надпороговой дозы ПБ была достоверно больше, чем для подпороговой дозы ПБ ($p < 0.05$), тогда как значения для контроля и подпороговой дозы ПБ не различались.

Несмотря на то что при груминге антенн используется контралатеральная передняя нога, K_{ac} для частот и длительности груминга передних ног и антенн достоверно не коррелировал ($r = -0.13$ для частоты и $r = -0.07$ для длительности). Поскольку основание антенны таракан чистит лапкой ипсилатеральной передней ноги, мы ожидали корреляцию для K_{ac} передних ног и основания антенн, которая, однако, составила лишь -0.14 ($p = 0.55$).

Корреляционный анализ свидетельствует о том, что морфологическая асимметрия антенны связана с некоторыми поведенческими асимметриями (рис. 5). Так, K_{ac} длительности чисток антенн положительно коррелирует с асимметрией длины антенн ($r = 0.75$, $p < 0.001$) и числа сегментов ($r = 0.73$, $p < 0.001$). Никаких достоверных корреляций поведенческих асимметрий во вторых сессиях экспериментов с морфологическими асимметриями не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Морфометрия антенн американского таракана показала, что длина сегментов в целом имеет большую асимметрию, чем их диаметр. При этом сегменты, расположенные вблизи основания антенны, наиболее симметричны. Поскольку сегменты в

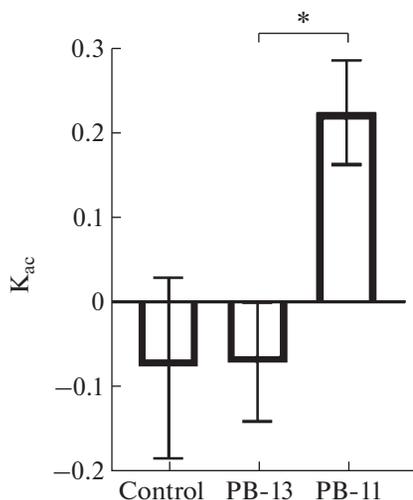


Рис. 4. K_{ac} частот груминга антенн во вторых сессиях экспериментов. Показаны средние и стандартные ошибки. Звездочкой обозначены достоверные различия ($p < 0.05$).

основании антенны наиболее молодые [23], можно заключить, что чем старше насекомое, тем более эффективно оно контролирует наиболее важные для функций антенны параметры. Поскольку количество линек, через которое проходят сегменты, увеличивается от основания к кончику, случайные процессы при каждой линьке могут вносить дополнительный вклад в величину асимметрии. В некоторых случаях антенна обрывается при извлечении из экзувия, что приводит к резкой асимметрии

длины антенн. С другой стороны, известно, что уровень флуктуирующей асимметрии может контролироваться генетически, а значит, подвергаться отбору [35, 36], т.е. симметрия оснований антенн, вероятно, важна для выполнения сенсорных функций антенны, особенно механорецепторной, поскольку в педицеллуме находятся сложноустроенные механосенсорный Джонстонов и педицеллярный хордотональный орган, измеряющие отклонения флагеллума и реагирующий на вибрацию [24]. Вероятно, флуктуирующая асимметрия может рассматриваться как примитивный признак, который при благоприятных обстоятельствах может эволюционировать в сторону популяционной (видовой) асимметрии, проявляющейся у большинства особей, или антисимметрию, когда преимущество получают наиболее латерализованные индивидуумы, как, например, при переступании пропасти у саранчи [37].

Несколько больший диаметр сегментов антенн у самцов с правой стороны может быть связан с большим количеством сенсилл, в первую очередь, реагирующих на половой феромон, выделяемый самками американского таракана, на правой антенне, сходно с отмеченным ранее для самок мраморного таракана, антенны которых отвечают на половой феромон, выделяемый самцами этого вида [13].

Морфологическая асимметрия, хотя и не столь выраженная, как у внешне асимметричных животных, таких как манящие крабы или раковинные улитки, имеет некоторые последствия в поведении. Например, красный болотный рак *Procambar-*

Таблица 2. Коэффициенты корреляции морфологических параметров антенны

Коэффициент корреляции, r	Длина антенны	Диаметр скапуса	Диаметр педицеллума	Длина педицеллума
Длина антенны	1			
Диаметр скапуса	0.06	1		
Диаметр педицеллума	-0.09	0.2	1	
Длина педицеллума	-0.4	-0.2	-0.03	1
Число сегментов	0.9***	0.1	-0.1	-0.4
Ds1	0.02	-0.01	0.7***	0.01
Ls1	-0.1	-0.3	-0.2	0.7***
Ds2	0.02	0.04	0.8***	-0.1
Ls2	-0.01	-0.3	0.01	0.6***
Ds 10	0.1	0.03	0.7***	-0.3
Ls10	-0.01	-0.4	0.01	0.5**
Ds50	0.1	0.1	0.8***	-0.1
Ls50	-0.3	-0.3	-0.2	0.5*

Примечание: Ds – диаметр сегмента; Ls – длина сегмента, числом обозначен порядковый номер сегмента флагеллума. В таблице представлены только достоверные корреляции при: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

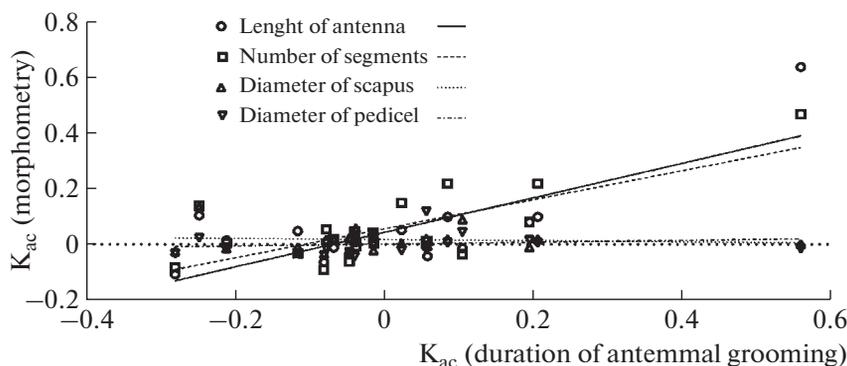


Рис. 5. K_{ac} длительности чисток антенн. Корреляция с морфологическими параметрами.

rus clarkii демонстрирует сильную корреляцию между асимметрией тела (антисимметрией) и направлением прыжка избегания [3]. Склонность американских тараканов выбирать правый рукав в лабиринте зависела в некоторой степени от сохранности антенн: при интактных антеннах насекомое чаще сворачивало вправо, при ампутации правой антенны 30% насекомых сохранило правостороннее предпочтение, в то время как ампутация левой антенны привела к тому, что только 7% особей сворачивали налево [38]. Наши данные подтверждают влияние морфологической асимметрии антенн на некоторые параметры асимметрии груминга, в особенности длительность чистки антенн, достоверно коррелировавшие с длиной антенны и количеством ее сегментов.

Поведенческие асимметрии у насекомых часто оказываются связаны с асимметрией сенсорных органов [39, 40] или функциональной, реже морфологической, асимметрией мозга [8, 41]. В целом мозг насекомых – симметричная структура, однако описанное у дрозофилы *Drosophila melanogaster* асимметричное тело в составе центрального комплекса [42, 43], затем было обнаружено и у двух других видов мух – *Neobellieria bullata* и *Calliphora erythrocephala* [44], однако для насекомых других таксономических групп подобные структуры не были описаны. Направленная правосторонняя асимметрия, обнаруженная в настоящем исследовании, для чисток придатков тела у американского таракана, может быть связана с функциональной асимметрией мозга этих насекомых. Асимметрия нервной системы позволяет увеличить эффективность решения задач, в некоторой степени за счет уменьшения общей надежности; явная морфологическая асимметрия отмечается при миниатюризации насекомых со сложным поведением [45, 46]. Функциональная асимметрия может проявляться и в морфологически симметричных структурах, как, например, в симметричных нейронах грибовидных тел у пчелы *Apis mellifera* в ходе обучения обнаруживается неоди-

наковый уровень метилирования гистона H3 по лизину 4 [47]. Нельзя исключить, что латерализованное поведение в отдельных случаях может быть связано с асимметричным распределением внутриклеточного симбионта *Wolbachia*, как показано у мухи *Drosophila paulistorum* [48].

Изменения латерализации у контрольных животных, такие как ее уменьшение или изменение знака с течением времени, могут быть связаны с изменением функционального состояния организма: ориентировочно-исследовательской реакцией, стрессом новизны [49]. Увеличение K_{ac} груминга антенн, отмеченное в наших экспериментах, при предъявлении полового феромона логично было бы связать с выбросом нейрогормона октопамина в гемолимфу, которое происходит у самцов при половом возбуждении [50], для проверки этой гипотезы планируется отдельное исследование.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента М.И.Ж., сбор данных (М.И.Ж., Е.С.Н.), обработка данных (М.И.Ж., Е.С.Н.), написание и редактирование манускрипта (М.И.Ж., Е.С.Н.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weissburg M* (1991) Morphological correlates of male claw asymmetry in the fiddler crab *Uca pugnax* (Smith) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana* 61 (1): 11–20.
<https://doi.org/10.1163/156854091X00461>
2. *Hart NS, Partridge JC, Cuthill IC* (2000) Retinal asymmetry in birds. *Curr Biol* 10 (2): 115–117.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00297-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00297-9)
3. *Tobo S, Takeuchi Y, Hori M* (2012) Morphological asymmetry and behavioral laterality in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecol Res* 27 (1): 53–59.
<https://doi.org/10.1007/s11284-011-0867-7>
4. *Malashichev YB* (2006) One-sided limb preference is linked to alternating-limb locomotion in anuran amphibians. *J Comp Psychol* 120 (4): 401.
<https://doi.org/10.1037/0735-7036.120.4.401>
5. *Palmer AR* (2009) Animal asymmetry. *Curr Biol* 19 (12): R473–R477.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.006>
6. *Удалова ГП, Карась АЯ, Жуковская МИ* (1990) Асимметрия направления движения у гаммарусов (*Gammarus oceanicus*) в тесте открытого поля. Журн высш нервн деят 40 (1): 93–101. [*Udalova GP, Karas' AY, Zhukovskaya MI* (1990) Asymmetry of the direction of movement in gammarus (*Gammarus oceanicus*) in the open field test. *Zhurn Vyssh Nervn Deyat Im IP Pavlova* 40 (1): 93–101. (In Russ)].
7. *Удалова ГП, Жуковская МИ, Карась АЯ* (1992) Пространственно-моторная асимметрия у муравьев при множественных переделках лабиринтного навыка. Вестник СПбГУ 3 (1): 67–75. [*Udalova GP, Zhukovskaya MI, Karas AY* (1992) Spatial-motor asymmetry in ants with multiple modifications of the labyrinth skill. *Vestnik SPbGU* 3 (1): 67–75. (In Russ)].
8. *Мороз КО* (2010) Функціональна асиметрія нервової системи безхребетних на прикладі просторової орієнтації твердокрилих триби тентуриїни. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія Екологія Вип 18 (2): 39–45. [*Moroz KO* (2010) Functional asymmetry of invertebrates' nervous system on the example of spatial orientation of the Tentyriini tribe beetles. *Biosystems Diversity* 18 (2): 39–45. (In Ukr)].
9. *Niven JE, Frasnelli E* (2018) Insights into the evolution of lateralization from the insects. *Progress Brain Res* 238: 3–31.
<https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2018.06.001>
10. *Kostylev MA, Malashichev YB* (2007) Correlation of the shoulder girdle asymmetry with the limb skeleton asymmetry in *Xenopus laevis*. *Dokl Biol Sci Springer Nature* BV 416 (1): 374.
<https://doi.org/10.1134/S0012496607050146>
11. *Frasnelli E, Anfora G, Trona F, Tessarolo F, Vallortigara G* (2010) Morphofunctional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res* 209: 221–225.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.046>
12. *Frasnelli E, Vallortigara G, Rogers LJ* (2010) Response competition associated with right-left antennal asymmetries of new and old olfactory memory traces in honeybees. *Behav Brain Res* 209: 36–41.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.014>
13. *Sreng L* (2003) Sensory asymmetries in the olfactory system underlie sexual pheromone communication in the cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Neurosci Lett* 351: 141–144.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00909-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00909-1)
14. *Møller AP, Swaddle JP* (1997) Asymmetry, developmental stability and evolution. Oxford Univ Press. UK.
15. *Vallortigara G* (2000) Comparative neuropsychology of the dual brain: a stroll through animals' left and right perceptual worlds. *Brain and Language* 73: 189–219.
<https://doi.org/10.1006/brln.2000.2303>
16. *Güntürkün O, Diekamp B, Manns M, Nottelmann F, Prior H, Schwarz A, Skiba M* (2000) Asymmetry pays: visual lateralization improves discrimination success in pigeons. *Curr Biol* 10 (17): 1079–1081.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00671-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00671-0)
17. *Toki W, Togashi K* (2011) Exaggerated asymmetric head morphology of female *Doubledaya bucculenta* (Coleoptera: Erotylidae: Languriinae) and ovipositional preference for bamboo internodes. *Zool Sci* 28 (5): 348–354.
<https://doi.org/10.2108/zsj.28.348>
18. *Frasnelli E* (2017) Lateralization in Invertebrates. In *Lateralized Brain Functions*. Humana Press, New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6725-4_6
19. *Zakharov VM* (2001) Ontogeny and population: Developmental stability and population variation. *Russ J Ecol* 32 (3): 146–150.
<https://doi.org/10.1023/A:1011397725175>
20. *Zakharov VM, Trofimov IE* (2014) Homeostatic mechanisms of biological systems: Development homeostasis. *Russ J Dev Biol* 45 (3): 105–116.
<https://doi.org/10.1134/S1062360414030096>
21. *Lychakov DV* (2013) Behavioral lateralization and otolith asymmetry. *J Evol Biochem Physiol* 49: 441–456.
<https://doi.org/10.1134/S0022093013040099>
22. *Trubyanov AB, Glotov NV* (2010) Fluctuating asymmetry: Trait variation and the left-right correlation. *Dokl Biol Sci Springer Nature* BV 431 (1): 103.
<https://doi.org/10.1134/S0012496610020092>
23. *Schafer R, Sanchez TV* (1973) Antennal sensory system of the cockroach, *Periplaneta americana*: Postembryonic development and morphology of the sense organs. *J Comp Neurol* 149: 335–353.
<https://doi.org/10.1002/cne.901490304>
24. *Toh Y* (1981) Fine structure of sense organs on the antennal pedicel and scape of the male cockroach, *Periplaneta americana*. *J Ultrastruct Res* 77 (2): 119–132.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(81\)80036-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(81)80036-6)
25. *Baba Y, Comer CM* (2008) Antennal motor system of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* 331: 751–762.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0545-9>
26. *Böröczky K, Wada-Katsumata A, Batchelor D, Zhukovskaya M, Schal C* (2013). Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (9): 3615–3620.
<https://doi.org/10.1073/pnas.121246611>

27. Жуковская МИ (2011) Одорантзависимые изменения поверхностных кутикулярных выделений на антенне таракана *Periplaneta americana*. Сенс сист 25 (1): 78–86. [Zhukovskaya MI (2011) Odorant-dependent changes in surface cuticular secretions on the antennae of the cockroach *Periplaneta americana*. Sens syst 25 (1): 78–86. (In Russ)].
28. Zhukovskaya MI (2014) Grooming behavior in American cockroach is affected by novelty and odor. Scientific World J 2014: 329514. <https://doi.org/10.1155/2014/329514>
29. Жуковская МИ, Лычаков ДВ (2014) Асимметрия груминга антенн тараканов *Periplaneta americana*. Рос физиол журнал им ИМ Сеченова 100 (7): 829–840. [Zhukovskaya MI, Lychakov DV (2014) Asymmetry of antennal grooming in the cockroach (*Periplaneta americana*). Russ J Physiol 100 (7): 829–840. (in Russ)].
30. Novikova ES, Zhukovskaya MI (2015) Octopamine, the insect stress hormone, alters grooming pattern in the cockroach *Periplaneta americana*. J Evol Biochem Physiol 51 (2): 160. <https://doi.org/10.1134/S0022093015020118>
31. Martinez AS, Hardie J (2009) Hygroreception in olfactometer studies. Physiol Entomol 34 (3): 211–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2009.00675.x>
32. Капицкий СВ, Жуковская МИ (1994) Поведенческие ответы самцов таракана *Periplaneta americana* на структурные аналоги полового феромона. Журн эволюц биохим физиол 30 (4): 558–566. [Kapitsky SV, Zhukovskaya MI (1994) Behaviour of male *American cockroaches* as a response to structural analogs of the sex pheromone. J Evol Biochem Physiol 30: 558–566. (In Russ)].
33. De Souza AR, Ribeiro B, José N, Prezoto F (2012) Paint marking social wasps: an evaluation of behavioural effects and toxicity. Entomol Exp Appl 144: 244–247. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01285.x>
34. Zhukovskaya MI, Kapitsky SV (2006) Activity modulation in cockroach sensillum: the role of octopamine. J Insect Physiol 52 (1): 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.09.005>
35. Гавриков ДЕ (2012) Анализ асимметрии в природной популяции *Drosophila melanogaster*. Изд-во Вост-сиб гос академии образ, Иркутск. [Gavrikov DE (2012) Analysis of asymmetry in the natural population of *Drosophila melanogaster*. Izd-vo Vost-sib gos akademii obraz, Irkutsk. (In Russ)].
36. Zakharov VM, Shadrina EG, Trofimov IE (2020) Fluctuating Asymmetry, Developmental Noise and Developmental Stability: Future Prospects for the Population Developmental Biology Approach. Symmetry 12: 1376. <https://doi.org/10.3390/sym1208137>
37. Bell ATA, Niven JE (2016) Strength of forelimb lateralization predicts motor errors in an insect. Biol Lett 12: 20160547. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0547>
38. Cooper R, Nudo N, Gonzales JM, Vinson SB, Liang H (2011) Side-dominance of *Periplaneta americana* persists through antenna amputation. J Insect Behav 24 (3): 175–185. <https://doi.org/10.1007/s10905-010-9246-4>
39. Letzkus P, Ribi WA, Wood JT, Zhu H, Zhang SW, Srinivasan MV (2006) Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. Curr Biol 16 (14): 1471–1476. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.060>
40. Hunt ER, Dornan C, Sendova-Franks AB, Franks NR (2018) Asymmetric ommatidia count and behavioural lateralization in the ant *Temnothorax albipennis*. Sci Rep 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23652-4>
41. Knebel D, Rigosi E (2021) Temporal and structural neural asymmetries in insects. Cur Opin Insect Sci 48: 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.10.002>
42. Pascual A, Huang K-L, Neveu J, Preat T (2004) Brain asymmetry and long-term memory. Nature 427: 605–606. <https://doi.org/10.1038/427605a>
43. Wolff T, Rubin GM (2018) Neuroarchitecture of the *Drosophila* central complex: A catalog of nodulus and asymmetrical body neurons and a revision of the protocerebral bridge catalog. J Comp Neurol 526 (16): 2585–2611. <https://doi.org/10.1002/cne.24512>
44. Phillips-Portillo J, Strausfeld NJ (2012) Representation of the brain's superior protocerebrum of the flesh fly, *Neobellieria bullata*, in the central body. J Comp Neurol 520 (14): 3070–3087. <https://doi.org/10.1002/cne.23094>
45. Polilov AA (2015) Small is beautiful: features of the smallest insects and limits to miniaturization. Annu Rev Entomol 60: 103–121. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020924>
46. Polilov AA (2016) Features of the structure of Hymenoptera associated with miniaturization: 1. Anatomy of the fairyfly *Anaphes flavipes* (Hymenoptera, Mymaridae). Entomol Rev 96 (4): 407–418. <https://doi.org/10.1134/S0013873816040035>
47. Швецов АВ, Лопатина НГ (2015) Молекулярно-генетическая основа латерализации долговременной памяти у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. Асимметрия 9 (4): 18–25. [Shvetsov AV, Lopatina NG. (2015) Molecular genetic basis of long-term memory lateralization in the honeybee *Apis mellifera* L. J Asymmetry 9 (4): 18–25. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18454/ASY.2015.34.733>
48. Strunov A, Schneider DI, Albertson R, Miller WJ (2017) Restricted distribution and lateralization of mutualistic Wolbachia in the *Drosophila* brain. Cell Microbiol 19 (1): e12639. <https://doi.org/10.1111/cmi.12639>
49. Фокин ВФ, Пономарева НВ (2004) Динамические характеристики функциональной межполушарной асимметрии. Функц межполуш асимм 17: 349. [Fokin VF, Ponomareva NV (2004) Dynamic characteristics of functional interhemispheric asymmetry. Funkc Mezhpolutsh Asimm 17: 349. (In Russ)].
50. Zhukovskaya MI (2008) Selective regulation of sensitivity to odours of different behavioural significance in the American cockroach, *Periplaneta americana*. Physiol Entomol 33 (2): 162–166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00615.x>

**MORPHOLOGICAL ASYMMETRY OF ANTENNAE
AND BEHAVIORAL ASYMMETRIES DURING GROOMING
IN THE COCKROACH *PERIPLANETA AMERICANA* L.**

M. I. Zhukovskaya^a, and E. S. Novikova^{a,#}

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

[#] *e-mail: os_sacrum@list.ru*

Animal behaviors are often characterized by behavioral asymmetry, or lateralization, which is caused in part by the morphological asymmetry of the body and/or brain. To test the hypothesis that functional asymmetry of grooming is connected with morphological asymmetry of the antennae in American cockroach *Periplaneta americana*, we measured the length of the antennae, scapus diameter, pedicel diameter and length, and segment's diameter and length. The data obtained indicate statistically significant differences: segment length is greater on the left antennae, and segment width is greater on the right antennae, except for a short region near the base. Correlation analysis revealed the following relationships: longer right antenna corresponds to more time spent cleaning it; scapus diameter larger on the right antenna correlates with antenna cleaning frequency; asymmetry of flagellum segments has no effect on cleaning asymmetry. Presenting sex pheromone at a suprathreshold dose increased asymmetry of antennal grooming, while asymmetry for leg grooming was generally unchanged. Thus, the asymmetry of antennal grooming, resulting at least in part from morphological asymmetry, significantly changes in the presence of a biologically important olfactory stimulus, the sex pheromone.

Keywords: asymmetry, insect, *Periplaneta americana*, grooming, olfaction, periplanone

ПРОФИЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОЗА У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ДОКСОРУБИЦИНА

© 2023 г. Е. Ю. Подъячева^{1,*}, Т. В. Шмакова¹, Д. Д. Андреева¹,
Р. И. Торопов¹, Ю. В. Чебуркин¹, М. С. Данильчук¹, С. А. Осипова¹,
М. О. Мартынов¹, Я. Г. Торопова¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ekaterinapodyachevaspb@gmail.com

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 10.12.2022 г.

Работа посвящена исследованию профиля молекулярных маркеров фиброза при введении крысам стока Wistar различных доз доксорубицина. Работа выполнена на 40 самцах крыс стока Wistar 260 ± 19 г. Животные были разделены на 4 группы: контроль и три опытные группы с определенной частотой введения (6 раз через два дня) и определенной дозой доксорубицина (5, 10, 15 мг/кг, внутривенно). По окончании введения химиопрепарата наблюдение за животными составляло 2 мес. На момент окончания исследования у наркотизированных животных осуществляли забор сердца для проведения молекулярных и морфологических исследований. Гистологический, эхокардиографический и молекулярный анализы выявили дозозависимые повреждающие изменения миокарда левого желудочка на фоне воздействия различных доз доксорубицина. Уровень экспрессии TGF- β не отличался от контрольных значений через 2 месяца после окончания введения всех кумулятивных доз химиопрепарата. Однако на данном этапе исследования сохраненная повышенная экспрессия коллагена I, II типа, ET-1, FGF4 и TNF- α была характерна для животных, получавших максимальную кумулятивную дозу доксорубицина, что может отражать незавершенность процесса формирования фиброзной ткани, а также их активное участие в развитии воспалительных процессов при выраженном кардиотоксическом повреждении на фоне воздействия химиопрепарата. Для животных, получавших 10 мг/кг, наблюдалось отсутствие изменений данных молекулярных маркеров фиброза по сравнению с контрольной группой, тогда как у группы животных с минимальной кумулятивной дозой препарата выявились снижение экспрессии COL I, II типа, ET-1, TNF- α и увеличение уровня FGF4.

Ключевые слова: антрациклиновая кардиомиопатия, доксорубицин, молекулярные маркеры, сердечная недостаточность, фиброз

DOI: 10.31857/S0044452923020043, **EDN:** BINEFH

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения онкологические заболевания занимают лидирующие позиции среди основных причин смертности в мировой популяции [1, 2]. Несмотря на стремительно развивающиеся новые подходы к лечению опухолевых заболеваний [3, 4], химиотерапия остается основным методом лечения [5–7]. При этом наиболее широко сегодня используются антибиотики антрациклинового ряда (доксорубицин) [8]. При наличии очевидных преимуществ химиопрепаратов данного ряда их использование сопряжено с развитием сердечно-сосудистых осложнений.

Выделяют острую доксорубицин-индуцированную кардиомиопатию, развивающуюся непосредственно в процессе лечения или в первый год

после его завершения, и хроническую, проявляющуюся в отдаленном промежутке времени после окончания противоопухолевой терапии [9]. Хронические сердечно-сосудистые осложнения имеют большое значение в прогнозе онкологических пациентов, успешно пролеченных по поводу злокачественных новообразований, поскольку могут приводить к значительному ухудшению качества и продолжительности их жизни. Хронические сердечно-сосудистые осложнения на фоне применения антрациклинов характеризуются дозозависимыми фиброзными изменениями миокарда левого желудочка, формированием отдаленной диастолической дисфункции [10, 11], приводящими, в конечном итоге, к развитию хронической сердечной недостаточности [12].

Таблица 1. Распределение животных по группам

Группы, количество животных	Дозы для введения	Частота введения	Кумулятивные дозы
DOX-15 ($n = 10$)	2.5 мг/кг (внутрибрюшинно)	6-кратное введение с интервалом в 2 дня	15 мг/кг
DOX-10 ($n = 10$)	1.67 мг/кг (внутрибрюшинно)	6-кратное введение с интервалом в 2 дня	10 мг/кг
DOX-5 ($n = 10$)	0.83 мг/кг (внутрибрюшинно)	6-кратное введение с интервалом в 2 дня	5 мг/кг
Контроль ($n = 10$)	1 мл 0.9% хлорида натрия (внутрибрюшинно)	6-кратное введение с интервалом в 2 дня	6 мл

Среди основных механизмов кардиотоксичности доксорубицина активно обсуждаются роль окислительного стресса, митохондриальной дисфункции [13], воспалительных процессов [14], стресс эндоплазматического ретикулума [15], нарушение регуляции ионов кальция, железа [16] и аутофагии [17]. Все перечисленные механизмы, в конечном итоге, приводят к гибели кардиомиоцитов, их замещению соединительной тканью с появлением рубцовых (фиброзных) изменений в миокарде, что способствует снижению растяжимости желудочков (снижение фракции выброса) и определяет переход от бессимптомной диастолической дисфункции к диастолической сердечной недостаточности [18]. Данные патологические изменения часто могут быть устойчивыми к медикаментозной терапии, и для пациентов с сердечной недостаточностью в терминальной стадии единственным приемлемым способом лечения является трансплантация сердца [19]. В рамках поиска профилактики сердечно-сосудистых осложнений на фоне лечения антрациклиновыми антибиотиками активно исследуются механизмы реализации их кардиотоксического действия. На сегодняшний день широко обсуждаются вовлеченность в развитие фиброзных изменений миокарда на фоне применения доксорубицина сигнального пути трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и его влияние на экспрессию генов коллагена (COL) типа I, II и III, взаимодействие TGF- β с факторами роста фибробластов (FGF) [20], вклад воспалительного фактора некроза опухоли (TNF- α) [21, 22], участие альфа-гладкомышечного актина (α -SMA) [23], роль матриксных металлопротеиназ (MMP) и их ингибиторов (TIMP) [24, 25], а также факторы, дополнительно регулирующие активность фибробластов, такие как эндотелин (ET)-1, адреналин, ангиотензин 2 [26]. Однако на сегодняшний день не сформировано однозначного представления о роли молекулярных маркеров фиброза и их сигнальных путях, участвующих в процессах формирования фиброзной ткани при применении различных доз доксорубицина.

Целью работы явилось исследование профиля молекулярных маркеров фиброза при использовании различных доз доксорубицина на модели лабораторных животных – крысах стока Wistar.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакологические препараты

В работе использовали Доксорубин-ЛЭНС®, 50 мг (ООО «ВЕРОФАРМ», Россия). Применяемые в работе кумулятивные дозы препарата были определены эмпирическим путем на предварительном этапе эксперимента (данные дозы обеспечивали развитие фиброзных изменений миокарда и снижение сократительной функции) с учетом литературных данных [25–28] и составили: 15, 10, 5 мг/кг (внутрибрюшинное введение). Дозу препарата, рассчитанную для одного животного, разводили стерильным 0.9%-ным физиологическим раствором непосредственно перед использованием (*ex tempore*). В ходе эксперимента проводились периодическое взвешивание животных и корректировка доз препарата.

Экспериментальная модель

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс стока Wistar SPF-категории массой 260 ± 19 г. Животные содержались в виварии барьерного типа в стандартных условиях со свободным доступом к воде и пище. Животные были случайным образом разделены на экспериментальные группы, различающиеся частотой введения и используемой кумулятивной дозой доксорубицина (табл. 1).

После достижения кумулятивной дозы наблюдение за животными составило 2 мес., что является достаточным для реализации отсроченных эффектов доксорубицина, фиброзного поражения миокарда и развития сократительной дисфункции. На момент окончания эксперимента животные подвергались наркотизации (10 мг/кг ксилазина +25 мг/кг золе-

тила, внутримышечно), затем осуществлялся забор сердца для проведения молекулярных и морфологических исследований. С этой целью в левый желудочек вводили 10%-ный раствор KCl до полной остановки сердечной деятельности в фазе диастолы. После извлечения сердца из грудной полости его верхушку отрезали и подвергали глубокой заморозке (-80°C) для дальнейшего проведения RT-qPCR.

Эхокардиографическое исследование

Перед проведением эхокардиографии животное наркотизировалось с использованием ингаляционной смеси – 1.7% изофлюрана – 98% кислорода. Эхокардиографические изображения были получены при стабилизации частоты сердечных сокращений на уровне 400 ± 30 ударов в мин. Эхокардиограмму регистрировали при помощи The Vevo® 2100 (VisualSonics Inc., Торонто, Канада) исходно (до начала введения химиопрепарата), а также через 2 мес. после достижения его кумулятивной дозы. Анализ объема и функции сердца проводили в M-режиме (одномерное сканирование). Измеряли конечно-диастолический внутренний диаметр левого желудочка (LVIDd, мм), конечно-систолический внутренний диаметр левого желудочка (LVIDs, мм). Фракцию укорочения (FS) рассчитывали следующим образом: $FS (\%) = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100$.

Морфологическое исследование

Сердце фиксировали в 10%-ном забуференном формалине. Обезживание и пропитывание парафином проводили по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Vip5Jr (Sakura, Япония) в готовом растворе Iso-PREP (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия). С использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, Уолтем, Массачусетс, США) изготавливали срезы толщиной 2–3 мкм, которые в дальнейшем депарафинировали, дегидратировали в соответствии с рекомендациями производителя (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия). Для определения степени коллагенового фиброза проводили гистохимическую окраску с набора красителей “по Маллори” (Биовитрум, Санкт-Петербург, Россия). Оценку площади фиброза проводили с использованием программ морфометрии Nis-Elements (Nikon, Токио, Япония) и Orbit. Случайно выбранные поля зрения фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclips 400i (Nikon, Токио, Япония) при увеличении в 400 раз, фотографии обрабатывали в программе NIS Elements 4.3 Br. На каждой фотографии подсчитывали площадь, занятую коллагеновыми во-

локнами (синий цвет), и затем вычисляли относительную площадь в процентах от общей площади среза. Обрабатывалось по 5 фотографий на каждое животное.

Количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR)

Суммарную РНК выделяли из тканей с помощью раствора ExtractRNA™ и набора CleanRNA Standard™ Kit (ЗАО Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту РНК измеряли с помощью спектрофотометра. Обратную транскрипцию и последующую количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR™ Kit (ЗАО Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. qRT-PCR проводили с использованием амплификатора Bio-Rad CFX96 Real-Time System C1000 Touch (Bio-Rad, США). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ и нормализовали по отношению к генам “домашнего хозяйства”: GAPDH, α -tubulin, β -actin и TBP. Параметры qRT-PCR были установлены следующим образом: 95°C в течение 1 мин, 40 циклов при 95°C в течение 15 с, при 60°C в течение 20 с и при 70°C в течение 60 с. Все реакции проводили в трехкратной повторности. При постановке qRT-PCR использовали пары праймеров (forward / reverse) для следующих генов: α -SMA (*caccgctgaacgtgaaattg/cttctccagagaggaggaag*); TGF β 1 (*gactctccacctgcaagacc/ggactggcgcagccttagttt*); FGF2 (*tccatcaaggagtggtgc/tccgtgaccggtaagtgttg*); FGF4 (*ctactctgtggcctcaaaa/cacaccccgctgctgtc*); COL1A1 (*gtggatggctgcacgagtc/gagttgggtgtgtgtctg*); COL2A1 (*gctgtggaagtggatgaaga/gaggaactgtggagagacg*); COL3A1 (*caggccaatggcaatgtaaag/catcctctagaactgtgtaag*); TNF α (*ggctccctcatcagttc/ctgcttgggtgtgtctac*); ET-1 (*tgattctctgcccctcttctg/tatggaatctcctgctctc*); TIMP-1 (*ctgagaaggctacacag/gtcaicgcagaccccaaggt*); TIMP-2 (*ggacctgacaaggacatcg/ttcttctccaacgtccag*); MMP-1 (*gatgaaaggtggaccaacaat/ccaagagaatggcaggtc*); MMP-2 (*tgggggagattctcactttg/ccatcagcgttcccatactt*); MMP-14 (*tggggtcatctgcttctt/tagggctcatatgcccgaag*); GAPDH (*caagttcaacggcacagtc/catactcagcaccagcatca*); α -Tubulin (*caattccatccaccacc/caacctgtttaagttagttag*); TBP (*tgcttgaatctcagttct/cttgcctgtagctggattg*); β -Actin (*gggtgatgggtggatgg/gttggtgacaatgccgtgt*) – все последовательности даны в ориентации 5' → 3'. Выбор молекулярных маркеров основан на данных литературы о вовлеченности конкретных маркеров в процессы фиброобразования миокарда при воздействии доксорубицина [23, 26, 31–33].

Статистический анализ

Расчеты проводились с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, 170 USA) для ОС Windows 10 (Microsoft Inc., США). Для определения нормаль-

Таблица 2. Результаты эхокардиографии

	DOX-15		DOX-10		DOX-5	
	Исходно	Через 2 мес.	Исходно	Через 2 мес.	Исходно	Через 2 мес.
LVIDs	2.37 [2.03; 2.73]	4.14 [3.97;4.38]***	2.50 [2.32; 2.73]	3.53 [3.16;3.84]***	2.63 [2.33; 2.77]	3.35 [3.17;3.55]***
LVIDd	5.51 [5.34; 5.99]	6.24 [6.13; 6.33]*	5.68 [5.54; 5.98]	6.66 [6.51;6.89]***	5.81 [5.63; 6.09]	6.51 [6.25; 7.27]**
FS	56.78 [51.87; 61.6]	32.73 [30.29;35.24]***	55.46 [53.62;57.76]	46.40 [43.89;51.35]**	54.01 [52.61;59.44]	47.27 [45.43;51.18]*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с исходным значением. LVIDs, конечно-систолический размер левого желудочка; LVIDd, конечно-диастолический размер левого желудочка; FS, фракция укорочения.

ности распределения использовался критерий Шапиро–Уилка. Для оценки различий между разными группами использовали непарный непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с критерием Данна. Значения в группах были проанализированы с использованием непараметрической статистики (медиана и 25-й и 75-й процентиля (Me (25–75%))). Для статистического анализа данных RT-qPCR использовали one-way ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки. Значения представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 45 суток после последнего введения химиопрепарата на фоне использования максимальной кумулятивной дозы (15 мг/кг) наблюдалась 30%-ная гибель животных.

У животных контрольной группы в динамике эксперимента не наблюдалось изменений параметров эхокардиографии. У животных опытных групп (DOX-5, DOX-10, DOX-15) после введения химиопрепарата отмечалось достоверное увеличение как конечно-систолического (LVIDs), так и диастолического размеров (LVIDd) левого желудочка. В связи с этим наблюдалось достоверное

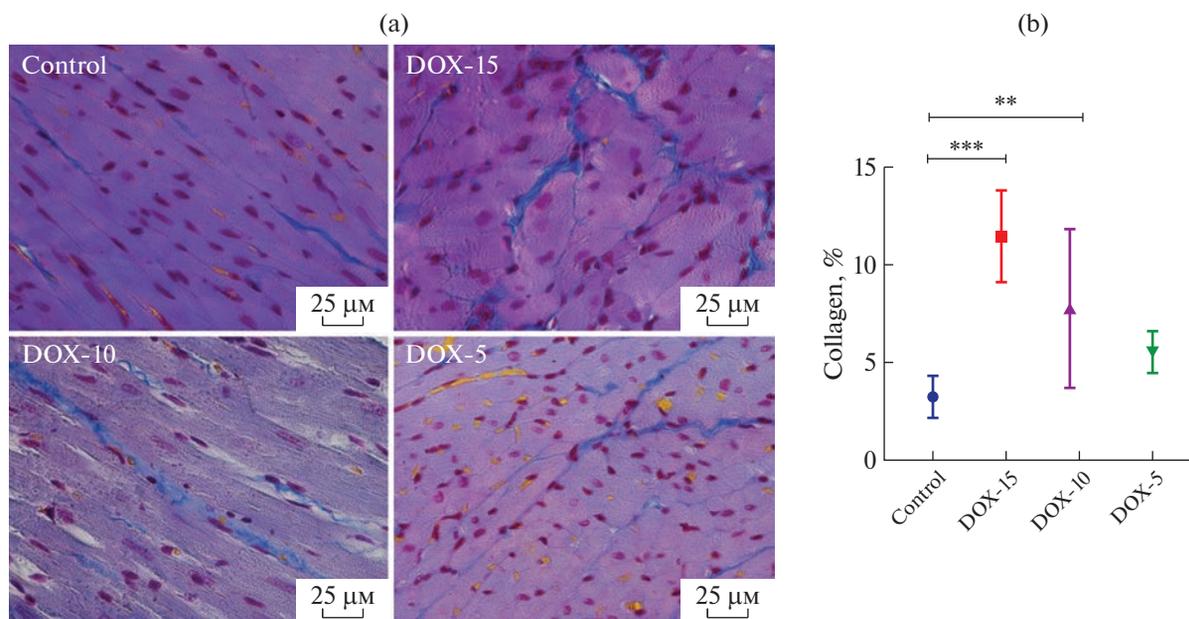


Рис. 1. (а) – Морфологические изменения миокарда левого желудочка крысы при использовании различных доз доксорубицина. Окраска по Маллори. Коллаген окрашен синим. Ув. 25 раз. (б) – Количество коллагена в миокарде левого желудочка крыс через 2 мес. после окончания введения доксорубицина, % (** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$).

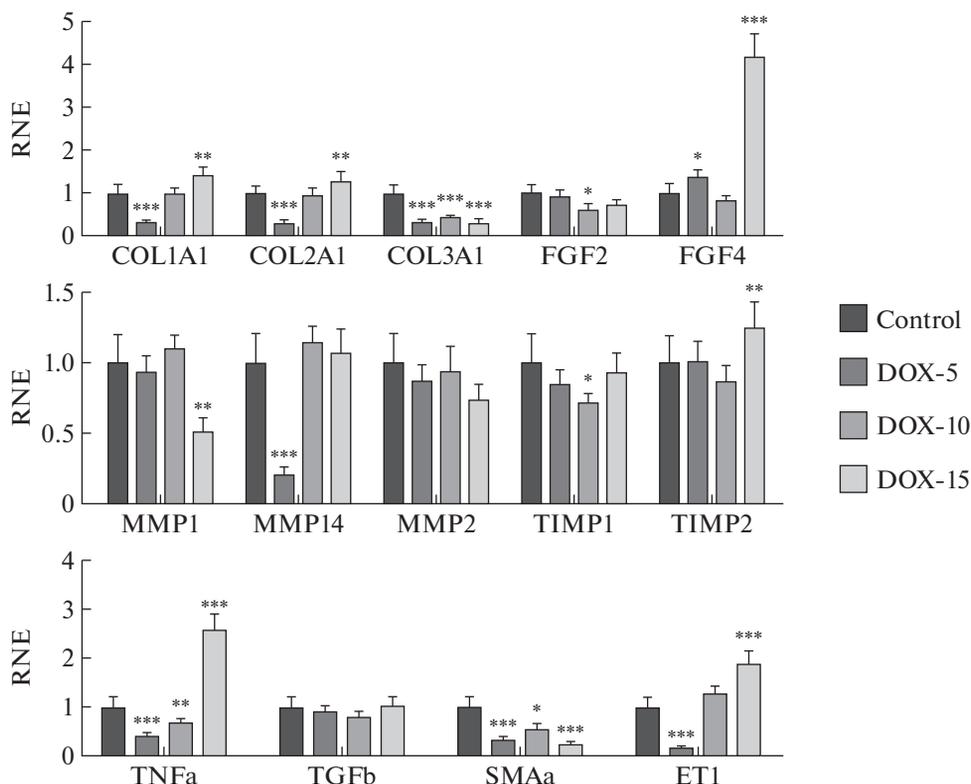


Рис. 2. Уровни экспрессии генов молекулярных маркеров фиброза в миокарде крыс с использованием различных доз доксорубицина. Гистограммы показывают средние значения и SD (* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$). RNE – Relative Normalized Expression.

снижение фракции укорочения (FS) (табл. 2). Наиболее выраженное снижение FS (41% от исходного значения, $p < 0.001$) отмечалось у животных после введения максимальной кумулятивной дозы препарата (DOX-15). Тогда как для группы животных, получавших 10 мг/кг, выявилось снижение FS на 15% ($p < 0.01$), а у группы животных DOX-5 – 14% ($p < 0.05$).

В миокарде крыс, получавших 15 и 10 мг/кг доксорубицина, наблюдалось значимое увеличение процента коллагена по сравнению с контрольной группой (DOX-15 – 11.42 [9.920; 13.61]; DOX-10 – 7.77 [4.35; 10.84]; DOX-5 – 5.42 [4.568; 6.408]; контроль – 3.23 [2.465; 3.620]) (рис. 1).

Через 2 мес после окончания введения доксорубицина наблюдалось увеличение экспрессии *COL1A1*, *COL2A1* у животных группы DOX-15; у животных группы DOX-10 – не изменялся уровень *COL1A1*, *COL2A1*, а у животных, получавших минимальную кумулятивную дозу доксорубицина (5 мг/кг), отмечалось значимое снижение коллагена типа I и II. Тогда как достоверное уменьшение *COL3A1* выявилось у всех животных, получавших химиопрепарат. Кроме того, наблюдалось отсутствие изменения миокардиального *TGF-β* у всех животных опытных групп по сравнению с контролем. Снижение экспрессии *FGF2* было характерно

для животных группы DOX-10. У крыс с максимальной (15 мг/кг) и минимальной (5 мг/кг) дозами доксорубицина наблюдалось достоверное увеличение уровня *FGF4*. Изменение экспрессии *MMP-2* не выявилось. Тогда как, в свою очередь, отмечалось снижение уровня *MMP-1* у животных группы DOX-15 и уменьшение *MMP-14* у животных группы DOX-5. В противоположность эффекта *MMP-1* увеличивалась экспрессия *TIMP-2*. Но при этом снижался уровень *TIMP-1* у животных группы DOX-10. Через 2 мес. наблюдались достоверное увеличение экспрессии *ET-1* у животных с максимальной кумулятивной дозой доксорубицина и значимое снижение данного маркера у животных, получавших минимальную дозу препарата. Увеличение уровня воспалительного фактора *TNF-α* было характерно для животных группы DOX-15, тогда как достоверное его снижение отмечалось у животных групп DOX-10 и DOX-5. Уменьшение уровня фиброзного маркера α -*SMA* наблюдалось у всех животных опытных групп (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование посвящено изучению молекулярного профиля маркеров фиброза при введении крысам различных доз доксорубицина.

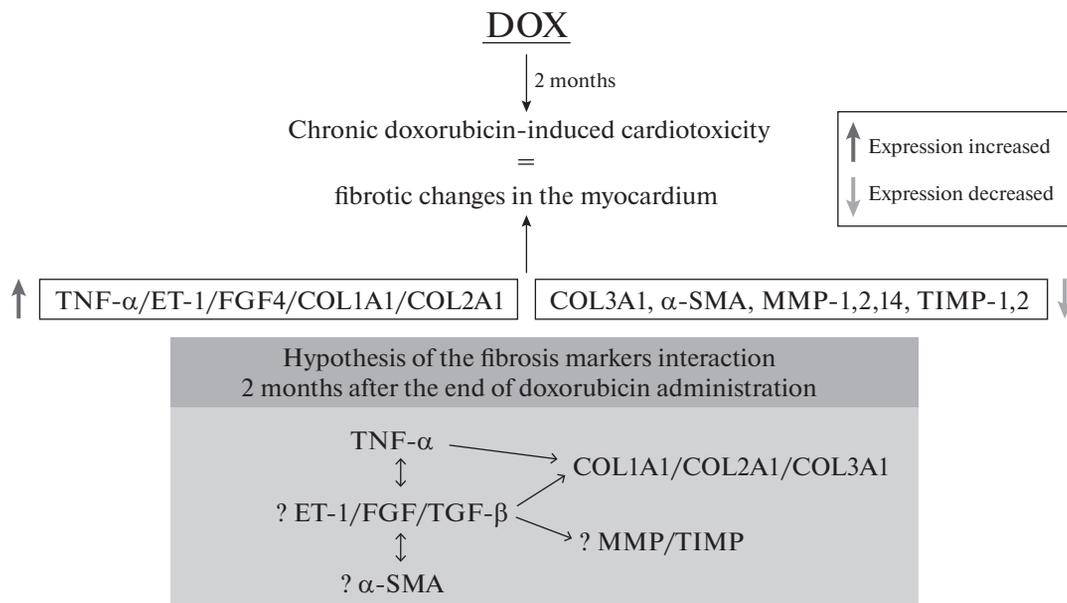


Рис. 3. Схематическое представление выявленных изменений молекулярных маркеров фиброза через 2 месяца после введения доксорубина.

Патогенез доксорубициновой кардиомиопатии характеризуется активным накоплением доксорубина в кардиомиоцитах, что приводит к избыточной генерации АФК, развитию воспалительных процессов, окислительного стресса, что, в свою очередь, нарушает работу митохондрий, саркоплазматического ретикулума, нарушается регуляция баланса ионов кальция, железа в клетке, блокирует работу топоизомеразы IIβ, в конечном итоге, вызывает гибель кардиомиоцитов [30]. Гибель кардиомиоцитов приводит к их постепенному замещению фиброзной тканью с развитием как диастолической, так и систолической дисфункции.

Выраженность фиброзирование миокарда зависит преимущественно от массивности гибели кардиомиоцитов. Биологический смысл процессов фиброзирование состоит в поддержании общей архитектоники органа. В физиологических условиях сердце способно компенсировать различные изменения, связанные с перегрузкой объема или давления, путем дилатации и гипертрофии. При развитии дилатационной кардиомиопатии, а также хронической сердечной недостаточности, сердечная мышца подвергается необратимому ремоделированию [34–37]. При этом наблюдается ремоделирование именно стенки левого желудочка, которая со временем становится тоньше (развивается дилатация) [38] и, в конечном счете, нарушается сократительная способность миокарда с развитием сердечной дисфункции, которая сопровождается аритмией, тромбоэмболией и может приводить к летальному исходу.

В целях подтверждения наличия фиброзных изменений был выполнен гистологический анализ.

Для изучения молекулярных маркеров фиброза был проведен генетический анализ дифференциальной экспрессии следующих генов: *TGF-β*, *COL1A1*, *COL2A1*, *COL3A1*, *FGF2*, *FGF4*, *α-SMA*, *TNF-α*, *ET-1*, *MMP-1,2,14*, *TIMP-1,2*. Схематическое изображение полученных результатов представлено на рис. 3.

Полученные результаты морфологического и эхокардиографического исследования показали наличие дозозависимых фиброзных изменений в миокарде левого желудочка и развитие диастолической дисфункции. Генетический анализ продемонстрировал, что экспрессия *TGF-β* через 2 месяца после окончания введения химиопрепарата не изменялась, при этом в литературе описана значимая роль данного маркера в запуске и развитии фиброза миокарда [26]. Однако наблюдалось увеличение *COL* типа I и II, *FGF4* у животных, получавших 15 мг/кг доксорубина. Уровень интерстициальной коллагеназы-1 (*MMP-1*) был значительно снижен у животных группы DOX-15, что, возможно, связано с активацией *TIMP2*. Известно, что *TGF-β* может также способствовать изменению уровня как *MMP*, так и их ингибиторов *TIMP* [39]. Можно предположить временную корректировку регуляции систем *TGF/FGF* и *MMP/TIMP* при формировании фиброзной ткани на фоне токсического действия доксорубина [19]. При стабилизации вызванных химиопрепаратом патологических процессов (через 2 мес.) в миокарде может происходить переключение сигнальных молекул с активной работы *TGF-β* на *FGF*, а также может изменяться активность *MMP* и *TIMP*.

Кроме того, полученные результаты продемонстрировали сохранение избыточной продукции миокардиального коллагена типа I и II (*COL1A1*, *COL2A1*) через 2 мес. у животных группы DOX-15. В то время, как у животных, получавших минимальную дозу (5 мг/кг), и у которых не было подтверждения гистологически наличие увеличенного содержания коллагена, экспрессия *COL1A1*, *COL2A1* была значительно снижена. Можно предположить, что, несмотря на отсутствие достоверных изменений *TGF-β* через 2 мес. после достижения максимальной кумулятивной дозы доксорубицина, формирование фиброза не является завершенным, и, вероятно, сохранившаяся экспрессия *FGF4* может играть большую роль в развитии хронических процессов доксорубициновой кардиотоксичности. Важно отметить снижение уровня миокардиального коллагена типа III у всех опытных групп. Основным следствием фиброза является снижение растяжимости желудочков. Растяжимость желудочков снижается как за счет увеличения числа волокон коллагена, так и в результате нарушения его свойств. То есть уменьшение содержания “эластичного” коллагена III типа и увеличение содержания “жесткого” коллагена I/II типа [18]. Таким образом, увеличение продуцирования фиброзной ткани ведет к прогрессированию диастолической дисфункции.

Избыточная продукция *ET-1* сохранялась через 2 мес. наблюдения у животных, получавших 15 мг/кг препарата, тогда как достоверно значимое уменьшение ее было характерно для животных группы DOX-5 аналогично коллагену типа I и II. Ряд исследований показывают, что *ET-1*, секретруемый эндотелиальными клетками, играет ключевую роль в ремоделировании сердца. *ET-1* через рецептор ET A (ETA) [40] может способствовать пролиферации фибробластов миокарда, усиливать синтез коллагена, влиять на работу *TGF-β* [33]. Эффект активации *ET-1* может быть аналогичен эффекту *TGF-β* [41, 42]. Полученные данные не только подтверждают ключевую роль *ET-1* в развитии фиброза в целом, но и позволяют предполагать, что данный маркер участвует в формировании сердечно-сосудистых осложнений при применении доксорубицина. Кроме того, выявилось повышение уровня *TNF-α* у группы животных, получавших 15 мг/кг препарата, что свидетельствует о сохраненной активной работе воспалительных процессов в сердечной мышце. Тогда как у животных групп DOX-10 и DOX-5 наблюдалось достоверно значимое снижение *TNF-α* спустя два месяца после окончания его введения. Данный факт коррелирует с дозой химиопрепарата и, следовательно, с тяжестью заболевания [32]. В другом исследовании также было показано, что гиперэкспрессия *TNF-α* стимулировала развитие процессов фиброобразования, которые, в конечном итоге, приводили к формированию дилатационной кардиомиопатии [32].

Следовательно, *TNF-α*, как и *ET-1*, играет ключевую роль в рубцевании миокарда при воздействии доксорубицина. Фиброзный фактор α -SMA был достоверно снижен у всех животных опытных групп, что может свидетельствовать о переключении его при формировании хронических процессов [43] или о том, что он, возможно, не является значимым маркером формирования фиброзной ткани при применении антрациклинов [23, 44].

В данной работе производилось исследование молекулярного профиля наиболее репрезентативных (по данным литературы) маркеров фиброза у крыс на фоне использования различных доз доксорубицина без оценки динамики изменения уровня маркеров. Это является ограничением данной работы. Полученные результаты по профилю молекулярных маркеров фиброза коррелируют с данными о развитии сократительной дисфункции, а также с данными морфологического анализа. Этот факт позволяет утверждать вовлеченность отдельных механизмов в реализацию эффектов на конкретном этапе исследования. Кроме того, авторами не производилась регистрация массы сердца. Для верификации повреждений миокарда авторы использовали такие критерии как степень снижения фракции укорочения, характеризующий насосную способность сердца, и наличие фиброзных изменений, подтвержденные гистологическим анализом.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Условия содержания и использования животных в исследовании были рассмотрены и одобрены комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных ФГБУ “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, IACUC (Номер протокола-заявки: 20-09ПЗ#V2).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема: “Создание новых препаратов для лечения и профилактики доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна (Я.Г.Т., Е.Ю.П.), сбор данных (Е.Ю.П., Т.В.Ш., Д.Д.А., М.С.Д., Р.И.Т., Ю.В.Ч., М.О.М., С.А.О.), анализ и интерпретация данных (Е.Ю.П., Т.В.Ш., Д.Д.А.), написание и редактирование манускрипта (Е.Ю.П., Ю.В.Ч., Я.Г.Т.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Markham MJ, Wachter K, Agarwal N, Bertagnolli MM, Chang SM, Dale W, Diefenbach CSM, Rodriguez-Galindo C, George DJ, Gilligan TD, Harvey RD, Johnson ML, Kimple RJ, Knoll MA, LoConte N, Maki RG, Meisel JL, Meyerhardt JA, Pennell NA, Rocque GB, Sabel MS, Schilsky RL, Schneider BJ, Tap WD, Uzzo RG, Westin SN* (2020) Clinical Cancer Advances 2020: Annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical oncology. *J Clin Oncol* 38: 1081–1101. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03141>
2. *de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM* (2020) Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Heal* 8: e180–e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
3. *Alam SR, Shah ASV, Richards J, Lang NN, Barnes G, Joshi N, MacGillivray T, McKillop G, Mirsadraee S, Payne J, Fox KAA, Henriksen P, Newby DE, Semple SIK* (2012) Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in patients with acute myocardial infarction early clinical experience. *Circ Cardiovasc Imaging* 5: 559–565. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.112.974907>
4. *Oudard S* (2013) Progress in emerging therapies for advanced prostate cancer. *Cancer Treat Rev* 39: 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.09.005>
5. *Weingart SN, Zhang L, Sweeney M, Hassett M* (2018) Chemotherapy medication errors. *Lancet Oncol* 19: e191–e199. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30094-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30094-9)
6. *Springfeld C, Jäger D, Büchler MW, Strobel O, Hackert T, Palmer DH, Neoptolemos JP* (2019) Chemotherapy for pancreatic cancer. *Press Medicale* 48: e159–e174. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.02.025>
7. *Knezevic CE, Clarke W* (2020) Cancer Chemotherapy: The Case for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit* 42: 6–19. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000701>
8. *Renu K, Abilash VG, Tirupathi TP, Arunachalam S* (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur J Pharmacol* 818: 241–253. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.043>
9. *Hole LD, Larsen TH, Fossan KO, Limé F, Schjøtt J* (2013) A short-time model to study relevant indices of cardiotoxicity of doxorubicin in the rat. *Toxicol Mech Methods* 23: 412–418. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.773391>
10. *Towbin JA, Bowles NE* (2002) The failing heart. *Nature* 415: 227–233. <https://doi.org/10.1038/415227a>
11. *Харина ВИ, Бережнова ТА, Резникова КМ, Брездынюк АД* (2017) Способ выявления начальных кардиотоксических эффектов доксорубицина. *Вестн новых мед технологий* 4: 165–170. [*Kharina VI, Berezhnova TA, Reznikova KM, Brezdynyuk AD* (2017) A method for detecting the initial cardiotoxic effects of doxorubicin. *Bull New Medic Technol* 4: 165–170. (In Russ)]. https://doi.org/10.12737/article_5a32124941-da88.60854778
12. *Mawad W, Mertens L, Pagano JJ, Riesenkampff E, Reichert MJE, Mital S, Kantor PF, Greenberg M, Liu P, Nathan PC, Grosse-Wortmann L* (2021) Effect of anthracycline therapy on myocardial function and markers of fibrotic remodelling in childhood cancer survivors. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 22: 435–442. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jeaa093>
13. *Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S* (2019) Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* 307: 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.013>
14. *Zhang YJ, Huang H, Liu Y, Kong B, Wang G* (2019) MD-1 deficiency accelerates myocardial inflammation and apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the TLR4/MAPKs/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway. *Med Sci Monit* 25: 7898–7907. <https://doi.org/10.12659/MSM.919861>
15. *Fu HY, Sanada S, Matsuzaki T, Liao Y, Okuda K, Yamato M, Tsuchida S, Araki R, Asano Y, Asanuma H, Asakura M, French BA, Sakata Y, Kitakaze M, Minamino T* (2016) Chemical endoplasmic reticulum chaperone alleviates doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circ Res* 118: 798–809. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307604>
16. *Minotti G, Recalcati S, Mordente A, Liberi G, Calafiore AM, Mancuso C, Preziosi P, Cairo G* (1998) The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J* 12: 541–552. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.7.541>
17. *Pan JA, Tang Y, Yu JY, Zhang H, Zhang JF, Wang CQ, Gu J* (2019) miR-146a attenuates apoptosis and modulates autophagy by targeting TAF9b/P53 pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis* 10: 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1901-x>
18. *Miklishanskaya SV, Mazur NA, Shestakova NV* (2017) Mechanisms for the formation myocardial fibrosis in norm and in certain cardiovascular diseases, how to diagnose it. *Russ Med Acad Contin post-graduate Stud* 75–81. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-12-75-81>
19. *Aharinejad S, Krenn K, Paulus P, Schäfer R, Zuckermann A, Grimm M, Abraham D* (2005) Differential role of TGF- β 1/bFGF and ET-1 in graft fibrosis in heart failure patients. *Am J Transplant* 5: 2185–2192. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01006.x>
20. *Pan X, Chen Z, Huang R, Yao Y, Ma G* (2013) Transforming Growth Factor β 1 Induces the Expression of Collagen Type I by DNA Methylation in Cardiac Fibroblasts. *PLoS One* 8: 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060335>
21. *Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL* (2020) Inflammation in Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 75: 1324–1340. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.01.014>
22. *Теляков АТ, Шилов СН, Попова АА, Березикова ЕН, Гракова ЕВ, Неупкоева МН, Копьева КВ, Ратуш-*

- няк *ET*, *Стеначев ЕИ* (2020) Роль провоспалительных цитокинов в развитии антрациклин-индуцированной сердечной недостаточности. *Клин исследов* 35: 66–74. [*Тепляков АТ*, *Шилов СН*, *По-пова АА*, *Бережикова ЕН*, *Гракова ЕВ*, *Неупокоева МН*, *Копева КВ*, *Ратуншнык ЕТ*, *Стеначев ЕИ* (2020) The role of pro-inflammatory cytokines in the development of anthracycline-induced heart failure. *Clinical Studies* 35: 66–74. (In Russ)].
<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2020-35-2-66-74>
23. *Zhao W*, *Wang X*, *Sun KH*, *Zhou L* (2018) A-Smooth Muscle Actin Is Not a Marker of Fibrogenic Cell Activity in Skeletal Muscle Fibrosis. *PLoS One* 13: 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191031>
 24. *Herrera J*, *Henke CA*, *Bitterman PB* (2018) Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest* 128: 45–53.
<https://doi.org/10.1172/JC193557>
 25. *Базылев ВВ*, *Канаева ТВ* (2020) Роль матриксных металлопротеиназ в ремоделировании миокарда. *CardioСоматика* 11: 22–28. [*Bazylev VV*, *Kanaeva TV* (2020) The role of matrix metalloproteinases in myocardial remodeling. *CardioSomatics* 11: 22–28. (In Russ)].
<https://doi.org/10.26442/22217185.2020.3.200374>
 26. *Ma ZG*, *Yuan YP*, *Wu HM*, *Zhang X*, *Tang QZ* (2018) Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci* 14: 1645–1657.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.28103>
 27. *Medeiros-Lima DJM*, *Carvalho JJ*, *Tibirica E*, *Borges JP*, *Matsuura C* (2019) Time course of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. *Pharmacol Rep* 71: 583–590.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.02.013>
 28. *Lončar-Turukalo T*, *Vasić M*, *Tasić T*, *Mijatović G*, *Glumac S*, *Bajić D*, *Japunžić-Žigon N* (2015) Heart rate dynamics in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Physiol Meas* 36: 727–739.
<https://doi.org/10.1088/0967-3334/36/4/727>
 29. *Merlet N*, *Piriou N*, *Rozec B*, *Grabherr A*, *Lauzier B*, *Trochu JN*, *Gauthier C* (2013) Increased Beta2-Adrenoceptors in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rat. *PLoS One* 8: 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064711>
 30. *Podyacheva EY*, *Kushnareva EA*, *Karpov AA*, *Toropova YG* (2021) Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiological and the Clinician. *Front Pharmacol* 12: 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.670479>
 31. *Rolski F*, *Błyszczuk P* (2020) Complexity of TNF- α signaling in heart disease. *J Clin Med* 9: 1–25.
<https://doi.org/10.3390/jcm9103267>
 32. *Sun M*, *Chen M*, *Dawood F*, *Zurawska U*, *Li JY*, *Parker T*, *Kassiri Z*, *Kirshenbaum LA*, *Arnold M*, *Khokha R*, *Liu PP* (2007) Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* 115: 1398–1407.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.643585>
 33. *Shi-wen X*, *Kennedy L*, *Renzoni EA*, *Bou-Gharios G*, *Du Bois RM*, *Black CM*, *Denton CP*, *Abraham DJ*, *Leask A* (2007) Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor β in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum* 56: 4189–4194.
<https://doi.org/10.1002/art.23134>
 34. *Podyacheva E*, *Toropova Y* (2022) SIRT1 activation and its effect on intercalated disc proteins as a way to reduce doxorubicin cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 13: 1–23.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1035387>
 35. *Сабиров ЛФ*, *Фролова ЭБ*, *Мухаметшина ГА*, *Сафар-галиева ЛХ*, *Мухитова ЭИ* (2012) Дилатационная кардиомиопатия. *Клин случай* 5:202–208. [*Sabirov LF*, *Frolova EB*, *Mukhametshina GA*, *Safargalieva LKh*, *Mukhitova EI* (2012) Dilated cardiomyopathy. *Clinical Case* 5: 202–208. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47870-0.00022-2>
 36. *Ahmedova DM*, *Hojakuliyev BG* (2014) Value of Volume Fraction of Collagen in Development of Myocardium Remodeling At the Patients With Inflammatory Cardiomyopathy. *Eurasian Hear J* 109–112.
<https://doi.org/10.38109/2225-1685-2014-1-109-112>
 37. *Найдич АМ* (2006) Структурная неоднородность левого желудочка и ремоделирование миокарда. *Бюл сибир мед* 5: 38–45. [*Naiditsch AM* (2006) Left ventricular structural heterogeneity and myocardial remodeling. *Bull of Siber Med* 5: 38–45. (In Russ)].
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-1-38-45>
 38. *Shishkova AV*, *Adonina EV*, *Duplyakov DV*, *Suslina EA*, *Ksenofontova LV* (2018) Course and outcome of dilated cardiomyopathy. *Cardiol News, Opin Training* 6: 92–96.
<https://doi.org/10.24411/2309-1908-2018-13010>
 39. *Schiller M*, *Javelaud D*, *Mauviel A* (2004) TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: Consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35: 83–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2003.12.006>
 40. *Hafizi S*, *Wharton J*, *Chester AH*, *Yacoub MH* (2004) Pro-fibrotic effects of endothelin-1 via the ET A receptor in cultured human cardiac fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 14: 285–292.
<https://doi.org/10.1159/000080338>
 41. *Neri Serneri GG*, *Cecioni I*, *Vanni S*, *Paniccia R*, *Bandinelli B*, *Vetere A*, *Janming X*, *Bertolozzi I*, *Boddi M*, *Lisi GF*, *Sani G*, *Modesti PA* (2000) Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy: Endothelin-1 system in the human failing heart. *Circ Res* 86: 377–385.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.4.377>
 42. *Remuzzi G*, *Perico N*, *Benigni A* (2002) New therapeutics that antagonize endothelin: Promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov* 1: 986–1001.
<https://doi.org/10.1038/nrd962>
 43. *Tanaka R*, *Umemura M*, *Narikawa M*, *Hikichi M*, *Osaw K*, *Fujita T*, *Yokoyama U*, *Ishigami T*, *Tamura K*, *Ishikawa Y* (2020) Reactive fibrosis precedes doxorubicin-induced heart failure through sterile inflammation. *ESC Hear Fail* 7: 588–603.
<https://doi.org/10.1002/ehf2.12616>
 44. *Sun KH*, *Chang Y*, *Reed NI*, *Sheppard D* (2016) α -smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 310: L824–L836.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00350.2015>

MOLECULAR MARKERS PROFILE OF FIBROSIS IN RATS EXPOSED TO DIFFERENT DOSES OF DOXORUBICIN

**E. Yu. Podyacheva^{a,#}, T. V. Shmakova^a, D. D. Andreeva^a, R. I. Toropov^a,
Yu. V. Cheburkin^a, M. S. Danilchuk^a, M. O. Martynov^a, and Ya. G. Toropova^a**

^a *Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russian Federation*

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

Text of the abstract. The study is devoted to the investigate of the molecular markers profile of fibrosis when various doses of doxorubicin are administered to Wistar drain rats. The study was performed on 40 male Wistar rats weighing 260 ± 19 g. Animals were divided into 4 groups: control and three experimental groups with a certain frequency of administration (6 times in two days) and a certain dose of doxorubicin (5, 10, 15 mg/kg, intraperitoneally). At the end of the administration of the chemotherapy drug, the animals were observed for 2 months. To solve this aim, the hearts were taken from anesthetized animals for molecular and morphological studies. Histological, echocardiographic and molecular analyses revealed dose-dependent damaging changes in the left ventricular myocardium against the background of exposure to various doses of doxorubicin. The expression level of TGF- β did not differ from the control values 2 months after the end of administration of all cumulative doses of the chemotherapy drug. However, at this stage of the study, the preserved increased expression of type I, type II collagen, ET-1, FGF4 and TNF- α was characteristic of animals receiving the maximum cumulative dose of doxorubicin, which may reflect the incompleteness of the fibrous tissue formation process, as well as their active participation in the development of inflammatory processes with pronounced cardiotoxic damage against the background of exposure the chemotherapy drug. For animals receiving 10 mg/kg, there were no changes in these molecular markers of fibrosis compared to the control group, whereas in the group of animals with the minimum cumulative dose of the drug, a decrease in the expression of COL I, II type, ET-1, TNF- α and an increase in FGF4 levels were revealed.

Keywords: anthracycline cardiomyopathy, doxorubicin, molecular markers, heart failure, fibrosis

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАНЫ И ПАРАМЕТРОВ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ ПАРЫ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ НЕЙРОНОВ *Lymnaea stagnalis* ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

© 2023 г. А. В. Сидоров^{1,*}, В. Н. Шаденко^{1,2}

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Беларусь

*e-mail: sidorov@bsu.by

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 15.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

При помощи микроэлектродного метода изучены реакции пептидергических нейронов VD1 и RPaD2 в составе изолированной ЦНС *Lymnaea stagnalis* в ответ на пролонгированное (не менее 2 ч) действие высоких концентраций D-глюкозы (10 мМ). Установлено, что электрические характеристики мембраны RPaD2, по сравнению с VD1, претерпевают существенные изменения в условиях гипергликемии – снижение сопротивления мембраны (R_m) на фоне возрастания ее емкости (C_m) и постоянной времени (τ_m). Несмотря на неизменность частотных характеристик данной пары нейронов, отмечается деполяризация мембраны VD1, в то время как изменения потенциала покоя для RPaD2 не носят статистически достоверного характера. Изменения временных, но не амплитудных характеристик потенциала действия VD1 и RPaD2 носят схожий характер, выражающийся в увеличении длительности основных его фаз (де- и реполяризации, следовой гиперполяризации). Предполагается, что “унификация” электрических свойств мембраны нейросекреторных (VD1/RPaD2) нейронов ЦНС *Lymnaea* в условиях гипергликемии, является адаптацией, направленной на преодоление возможной десинхронизации спайковой активности этих клеток как результат ослабления, инициированного высоким содержанием глюкозы в интерстиции, электрического сопряжения между ними.

Ключевые слова: глюкоза, электрический синапс, нервная система, гомеостаз, моллюски, беспозвоночные

DOI: 10.31857/S0044452923020067, **EDN:** BISOGU

Пейсмейкерные нейроны составляют основу центральных генераторов ритма (ЦГР) осцилляторного типа в нервной системе как позвоночных, так и беспозвоночных организмов [1, 2]. Их неизменной чертой является способность к постоянной генерации потенциалов действия даже в отсутствие внешних по отношению к ним синаптических входов. Как правило, эта особенность обусловлена особыми электрическими свойствами их мембран, обеспечивающих повторяющиеся серии спайков [3]. В сочетании с электрическими синапсами, которыми такие центры связаны со многими окружающими их нейронами, это позволяет синхронизировать электрическую активность крупных ассоциаций нервных клеток в пределах той или иной области мозга [4, 5].

Традиционно считается, что несмотря на свою автономность, ЦГР подвержены модуляторному

влиянию внешних факторов, в том числе и опосредованному различными сигнальными молекулами [6]. Среди их множества особое положение занимает глюкоза, представляя собой универсальный нутриент, используемый нервными клетками как для удовлетворения своих метаболических потребностей, так и в качестве сигнала, чувствительность к которому характерна не только для нейронов, связанных с контролем пищевого поведения, но и всего мозга в целом [7, 8]. Другими словами, она способна выступать в качестве фактора объемной передачи сигнала, ответная реакция на который не ограничивается небольшим числом специализированных клеток.

Ведущее значение в реакции нервных клеток имеет частотная составляющая генерируемых ими потенциалов действия (спайков), представляющих собой волну возбуждения, периодически возника-

ющую на мембране нейрона. Известно, что характеристики спайка (временные и амплитудные) могут существенно различаться как в нейронах разного типа, так и в одной и той же клетке в зависимости, например, от частоты ее импульсации [9]. Эта так называемая пластичность потенциала действия имеет важное значение для функционирования нейронных сетей, поскольку предопределяет деполяризацию (степень и длительность) нервного окончания, что в свою очередь напрямую опосредует количество выбрасываемого нейромедиатора и эффективность синаптической передачи между клетками нервного центра [10]. Однако степень наших знаний в отношении пластичности спайков в нейронах в зависимости от их функциональной принадлежности и/или нейромедиаторной специфичности достаточно ограничена, прежде всего вследствие недостаточной картированности мозга высших позвоночных.

В составе центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis* имеется пара электрически связанных нервных клеток (VD1/RPaD2), относящихся к пептидергическим, мультифункциональным нейронам, входящим в состав как минимум кардиорегуляторной нейронной сети [11, 12]. Ранее была показана чувствительность этих, равно как и других пептидергических нейронов ЦНС *Lymnaea* к действию глюкозы, при быстром (минуты) изменении ее содержания во внешней по отношению к этим клеткам среде [13]. При этом колебания уровня глюкозы в крови (гемолимфе) данного моллюска достигают существенных размахов, от базального уровня, исчисляемого в 0.2–0.3 мМ, до 5 мМ и возможно более, если речь идет о различных функциональных состояниях, связанных с активацией пищевого поведения [14]. Каждое из них характеризуется своим собственным репертуаром поведенческих реакций, что заставляет предполагать изменения и на нейронном уровне организации, вызванные пролонгированным (часы) действием повышенного уровня глюкозы. Оценить наличие или отсутствие возможности модификации электрических характеристик спайка при гипергликемии в отношении идентифицированных нейронов ЦНС *Lymnaea*, а также мембранных механизмов такой чувствительности или устойчивости и было задачами данной работы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на представителе пресноводных моллюсков прудовике обыкновенном – *Lymnaea stagnalis*. Сбор особей осуществлялся в летне-осенний период в мелких водоемах бассейнов рек Вабич и Друть (Могилевская область, Беларусь). В лаборатории их содержали в аквариумах с отстоявшейся водопроводной водой (не менее 1 л на особь) при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Пищей служили молодые листья салата (питание *ad libi-*

tum). Экспериментальные (контрольные и опытные) группы комплектовались животными одинакового размерного класса: высота раковины от 3.5 до 4.5 см, масса от 2 до 4 г.

Электрофизиологические исследования. Животных наркотизировали (5 мин в 0.2 М растворе MgCl_2), доставали центральное кольцо нервных ганглиев, которые обрабатывали (1 мг/мл, 5 мин) раствором проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США). К регистрации электрической активности приступали не ранее 30 мин после отмывки препарата раствором Рингера для *Lymnaea* (в мМ): $\text{NaCl} - 44$; $\text{KCl} - 1.7$; $\text{CaCl}_2 - 4$; $\text{MgCl}_2 - 1.5$; HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота) – 10, pH 7.5 ± 0.1 . Растворы D-глюкозы (ч.д.а., “Анализ X”, Беларусь) готовили на его основе. Для оценки пролонгированных эффектов гипергликемии препараты ЦНС инкубировали не менее 2 ч в 10 мМ растворе глюкозы. Контролем были препараты, находившиеся равновеликое время в “чистом” растворе Рингера.

Пару электрически связанных нейронов висцерального и правого париетального (VD1/RPaD2) ганглиев идентифицировали по расположению в пределах нервного узла (рис. 1а), размеру, цвету, показателям и паттерну спонтанной электрической активности [15].

Для регистрации электрической активности нейронов использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные 2.5 М раствором KCl (сопротивление 10–15 МΩ). В качестве индифферентного электрода выступала хлорированная серебряная проволока. Усиление внутриклеточных сигналов, подача де- или гиперполяризующих импульсов тока осуществляли с помощью микроэлектродного усилителя MC-01M (Линтех, Беларусь). Электрические сигналы нейронов после предварительной оцифровки записывали на жесткий диск компьютера. Текущий мониторинг, запись и последующий обсчет сигналов осуществляли при помощи программы электронного осциллографа InputWin [16].

Частоту импульсации определяли для 4 последовательных 30 с участков нейрограммы длительностью 2 мин (шаг квантования 5 мс). Параметры потенциала действия (ПД), включая длительность и амплитуду отдельных его фаз (рис. 1б), для 4 произвольно выбранных спайков, оценивали по 30 с отрезкам нейрограммы, выполненным с шагом квантования 0.5 мс. Амплитуду порога отсчитывали от уровня потенциала покоя до регенеративного возрастания натриевой проводимости (точка А), ПД – до положительного (точка В), а следовой гиперполяризации (СГ) – до отрицательного (точка С) пикового значения спайка. За положительную фазу ПД принимали участок от точки А до момента пересечения кривой записи с уровнем мембранного потенциала

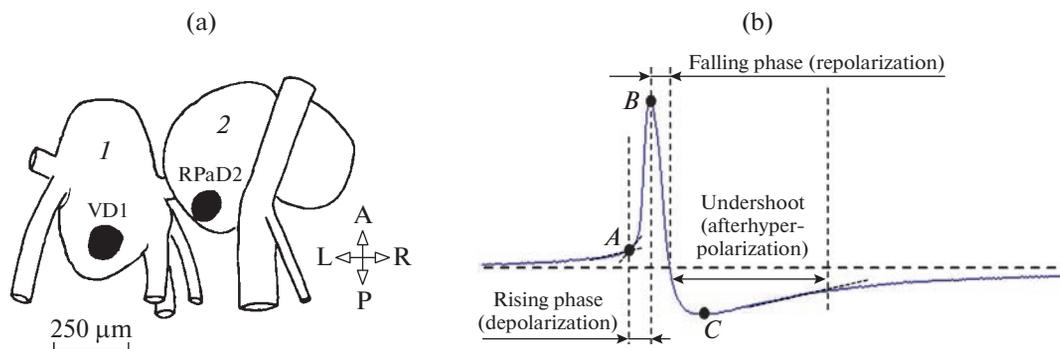


Рис. 1. Расположение исследованных нейронов в ЦНС *Lymnaea stagnalis* (a) и амплитудно-временные характеристики потенциала действия (b). Для (a): 1 – висцеральный, 2 – правый париетальный ганглий; А – вперед, Р – назад, L – влево, R – вправо. Для (b): Rising (Falling) phase – фазы де- и реполяризации, Undershoot – следовая гиперполяризация. А – порог, В, С – положительное и отрицательное пиковое значение потенциала действия.

(его общая (S) и средняя (S/t), рассчитанная с учетом длительности фазы, площадь, выражаются в условных, машинных единицах, м.е.), за отрицательную фазу – участок СГ.

Постоянную времени мембраны (τ_m) определяли по изменению мембранного потенциала, вызванного толчком тока (-0.5 нА), как время, когда оно достигнет $1/e$ от максимально наблюдаемого, значение мембранной емкости (C_m) вычисляли по формуле: $\tau_m = R_m \times C_m$, где R_m – сопротивление мембраны. При этом R_m определяли, исходя из входного сопротивления клетки, при толчке тока (-0.5 нА), за вычетом сопротивления микроэлектрода, без учета сопротивления аксоплазмы и внеклеточной среды. Для построения кривой вольт-амперной характеристики (ВАХ) мембраны последовательно подавали импульсы тока в диапазоне от -2 до $+2$ нА (с шагом 0.5 нА) и длительностью 3 с, одновременно фиксируя значение мембранного потенциала исследованных клеток. Полученные данные представляли в графической форме.

Статистическая обработка. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро–Уилка. В случае подтверждения нормальности распределения сравниваемых показателей использовали параметрические методы оценки: *t*-критерий Стьюдента для независимых пар и дисперсионный анализ для повторных измерений (repeated measures ANOVA). Если нормальность распределения показателей не была подтверждена для всех без исключения групп данных – использовали непараметрические методы: *U*-критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney *U*-test, *z*) для попарного сравнения независимых выборок. Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего (нормальное распределение) или медиана (верхний; нижний квартили), в случае его непараметрического характера. Число наблюдений (*n*) указано для каждого массива данных отдельно.

Данные обрабатывали посредством программы Statistica 6.0. Достоверными считались результаты при уровне значимости (*p*), равном или меньшем 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрические свойства мембраны. В контрольных условиях сопротивление мембраны (R_m) нейрона VD1 в 2.5 раза меньше ($t = 3.99$; $p < 0.01$), а емкость (C_m) в 5.2 раза больше ($t = 2.59$; $p = 0.02$) аналогичных показателей для RPaD2. Различия в постоянной времени мембраны (τ_m) были статистически не значимы ($t = 1.39$; $p = 0.19$). При гипергликемии отмечается достоверное возрастание (в 1.79 раза) τ_m для VD1 при неизменности других электрических характеристик мембраны этого нейрона. Напротив, в отношении RPaD2 отмечено 2.1 -кратное уменьшение сопротивления, сопровождаемое многократным (в 5.5 раза) увеличением емкости, происходящих на фоне умеренного (в 1.2 раза) снижения постоянной времени мембраны по сравнению с контролем. В этих условиях различий между R_m ($t = 1.18$; $p = 0.26$), C_m ($t = 1.28$; $p = 0.23$) и τ_m ($t = 0.31$; $p = 0.76$) нейронов VD1 и RPaD2 выявлено не было (табл. 1).

Различия в потенциале покоя между VD1 и RPaD2 как в контроле ($t = 0.40$; $p = 0.70$), так и в условиях гипергликемии ($t = 0.91$; $p = 0.38$) не были статистически достоверными. В то же время повышение содержания глюкозы в интерстиции приводит к деполяризации нейрона VD1 (на 10 – 15 мВ, т.е. в 1.3 раза по сравнению с контролем), но не изменяет уровень мембранного потенциала RPaD2 (рис. 2а). Частота генерации потенциала действия между исследованными клетками, очевидно, не различалась как в контрольных ($z = 1.30$; $p = 0.19$), так и экспериментальных ($z = 1.73$; $p = 0.08$) условиях. Развитие гипергликемии не изменяет частотные характеристики этой пары электрически свя-

Таблица 1. Электрические характеристики мембраны нейронов VD1 и RPaD2

Показатель	VD1		RPaD2	
	Контроль (n = 9)	Глюкоза, 10 мМ (n = 7)	Контроль (n = 5)	Глюкоза, 10 мМ (n = 5)
Сопротивление (R_m), МΩ	25.1 ± 5.3	21.0 ± 3.6 $t = 0.63; p = 0.54$	63.0 ± 8.5	30.0 ± 8.0* $t = 2.83; p = 0.02$
Емкость (C_m), нФ	14.1 ± 3.2	26.4 ± 5.5 $t = 2.04; p = 0.06$	2.7 ± 0.4	14.8 ± 2.1* $t = 5.71; p < 0.001$
Постоянная времени (τ_m), мс	261 ± 54	468 ± 83* $t = 2.17; p < 0.05$	127.0 ± 11.3	388 ± 64* $t = 3.53; p < 0.01$

Примечание: Данные представлены в виде среднее ± ошибка среднего. Для опытной группы указано значение t -критерия Стьюдента и уровня значимости (p) в сравнении с контролем, отдельно для каждого показателя и по каждому нейрону. Статистически достоверные изменения дополнительно отмечены астериском (*).

занных клеток (рис. 2b), в том числе и по каждому исследованному нейрону отдельно (рис. 2с).

В контрольных условиях кривая вольт-амперной характеристики (ВАХ) мембраны нейрона RPaD2 оказывается сдвинутой, относительно таковой для VD1, — вправо, в области положительных (выходящих) токов и влево, в области отрицательных (входящих) токов (рис. 3а). В условиях гипергликемии статистически достоверных различий в ВАХ между исследованными нейронами выявлено не было (рис. 3б). Анализ, проведенный по каждому нейрону отдельно, выявил статистическую неизменность ВАХ для VD1 (рис. 3с) и ее смещение влево для выходящих и вправо для входящих токов в отношении RPaD2 (рис. 3) при гипергликемии по сравнению с контролем.

Параметры потенциала действия. В нормальных условиях существуют выраженные различия, преимущественно во временных, характеристиках спайка между нейронами VD1 и RPaD2 (рис. 4). Речь идет о возрастании длительности фаз де- и реполяризации в 1.36 ($z = 2.03; p = 0.04$) и 2.44 ($z = 4.83; p < 0.001$), уменьшении длительности следовой гиперполяризации в 1.65 ($z = 3.79; p < 0.001$) раза соответственно, для нейрона RPaD2 по отношению к VD1. Значения амплитуды потенциала действия ($z = 0.94; p = 0.35$) и его порога ($z = 1.64; p = 0.10$), в отличие от 2.22-кратного снижения значения следовой гиперполяризации ($z = 4.02; p < 0.001$), статистически достоверно не различались. В условиях гипергликемии как временные — длительность фаз ДП ($z = 1.81; p = 0.07$), РП ($z = 1.62; p = 0.11$) и СГ ($z = 1.60; p = 0.11$), так и ам-

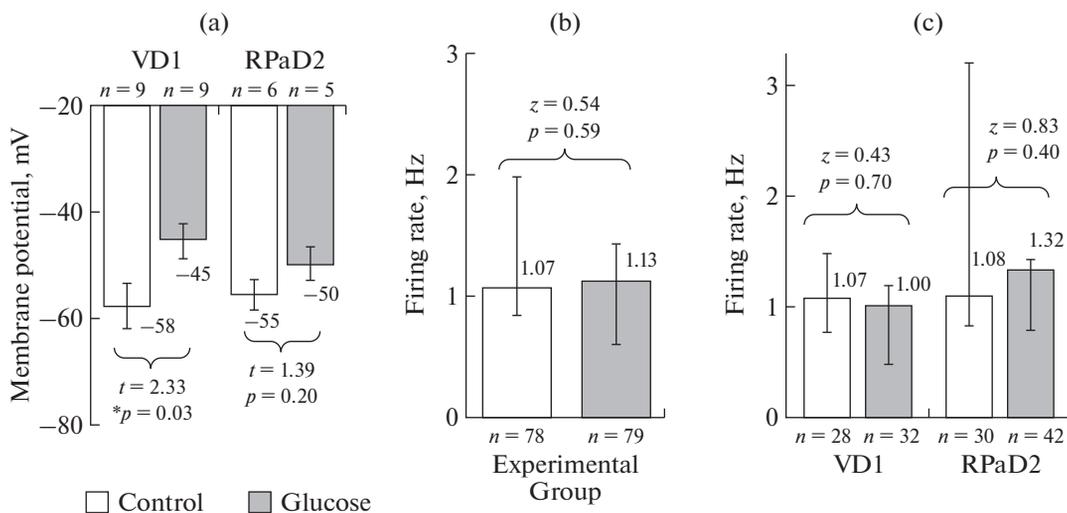


Рис. 2. Мембранный потенциал (а — потенциал покоя) и частота генерации потенциала действия (б — суммарно для пары, с — отдельно по каждому нейрону) парой электрически связанных нейронов VD1/RPaD2 в контроле (Control) и в условиях экспериментальной гипергликемии (Glucose). Представлено значение показателя — числа над столбиками (среднее, для а или медиана, для б, с) и планки погрешностей (ошибка среднего, для а или нижний, верхний квартили, для б, с), число проанализированных нейронов (а) или участков нейронограммы (б, с) — n . Для каждой группы сравнения указаны значения t (t -критерий Стьюдента, для а) или z (U -критерий Манна-Уитни, для б, с) и уровня значимости (p). * — Статистически достоверные изменения.

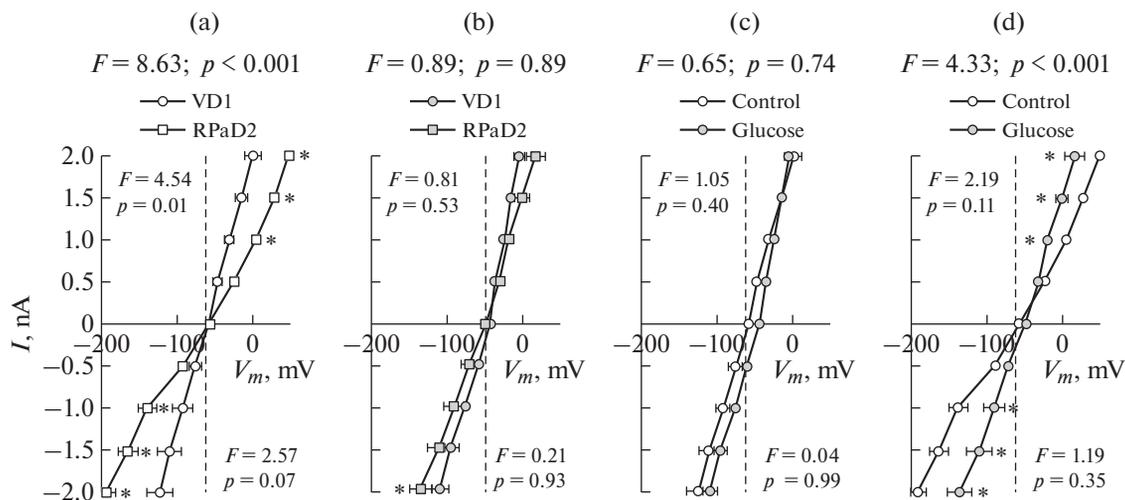


Рис. 3. Вольт-амперная характеристика мембраны пары электрически связанных нейронов VD1/RPaD2. (a) – контроль, (b) – гипергликемия, (c) – нейрон VD1, (d) – нейрон RPaD2. Указаны значения *F*-критерия (Фридмана) и уровни значимости (*p*) в случае дисперсионного анализа для повторных измерений, в том числе отдельно для положительных (левый верхний угол диаграммы) и отрицательных (правый нижний угол диаграммы) токов. Вертикальная пунктирная линия представлена для наглядности изменений вольт-амперной характеристики. * – Статистически достоверные изменения, при попарном сравнении данных.

плитудные – величины порога ($z = 0.71$; $p = 0.48$), спайка ($z = 1.40$; $p = 0.16$), СГ ($z = 1.24$; $p = 0.21$) характеристики потенциала действия VD1 и RPaD2 не отличались друг от друга.

В ходе более детального анализа, для нейрона VD1 выявлено значительное, статистически достоверное, в 1.43 раза, возрастание длительности фазы ДП (рис. 4а), и гораздо более существенное (в 2.0 раза) увеличение длительности фазы РП (рис. 4б), не носящее, тем не менее, статистически значимого характера, потенциала действия в условиях экспериментальной гипергликемии по сравнению с контролем. Достоверное увеличение отмечено и в отношении длительности фазы СГ – в 1.33 раза для опытных (гипергликемия) условий по сравнению с контролем (рис. 4с). В отношении амплитуды фаз спайка, статистически достоверные изменения не были выявлены ни для одного из исследованных показателей – потенциала действия, порога его генерации и следовой гиперполяризации (рис. 4d–f) в условиях экспериментальной гипергликемии по сравнению с контролем. Для клетки RPaD2 речь идет о 1.21- и 2.02-кратном увеличении длительности фаз ДП (рис. 4а) и СГ (рис. 4с), при тенденции к снижению продолжительности фазы РП (рис. 4б). При этом статистически значимые отличия были зафиксированы лишь в отношении амплитуды СГ (увеличение в 2.25 раза, рис. 4f), при неизменности значений амплитуд спайка (рис. 4d) и порога (рис. 3е).

Изменения формы потенциала действия, наблюдаемые при гипергликемии, были отмечены для VD1 и RPaD2 как по отношению к потенциа-

лам действия 1-го типа, “узким”, с приблизительно одинаковой длительностью фаз де- и реполяризации, характерные для низких или умеренных (в среднем, 0.5 Гц и меньше), частот импульсации (рис. 5а, 6а), так и спайкам 2-го типа, “широкие”, с небольшим плато во время реполяризации, что делает ее более продолжительной по сравнению с фазой деполяризации, преимущественно регистрируемые при высоких (1.0 Гц и выше) частотах (рис. 5б, 6б). Следует отметить увеличение скорости медленной деполяризации мембраны в условиях гипергликемии (области А рис. 5, 6), а также выраженности следовой гиперполяризации (область В рис. 5, 6), преимущественно для спайков 2-го типа (в отношении VD1).

Отсутствие статистической значимости для изменений длительности фазы РП (рис. 4б), несмотря на существенное, порой двукратное различие в значениях медианы, связано с использованием для расчета параметров потенциала действия спайков как первого, так и второго типов, соотношение (встречаемость) которых в препаратах контрольной и опытной групп различаются (примерно 1:3 и 1:1 соответственно). Как следствие, величина статистического разброса, особенно в отношении контрольной группы, нивелирует достоверность наблюдаемых различий. Нормализовывать эти данные (т.е. фактически выбраковывать те или иные значения) мы посчитали некорректным с точки зрения дизайна эксперимента.

Такие интегральные показатели спайка, как площадь (общая и средняя) его фаз, статистически достоверно отличались друг от друга при сравне-

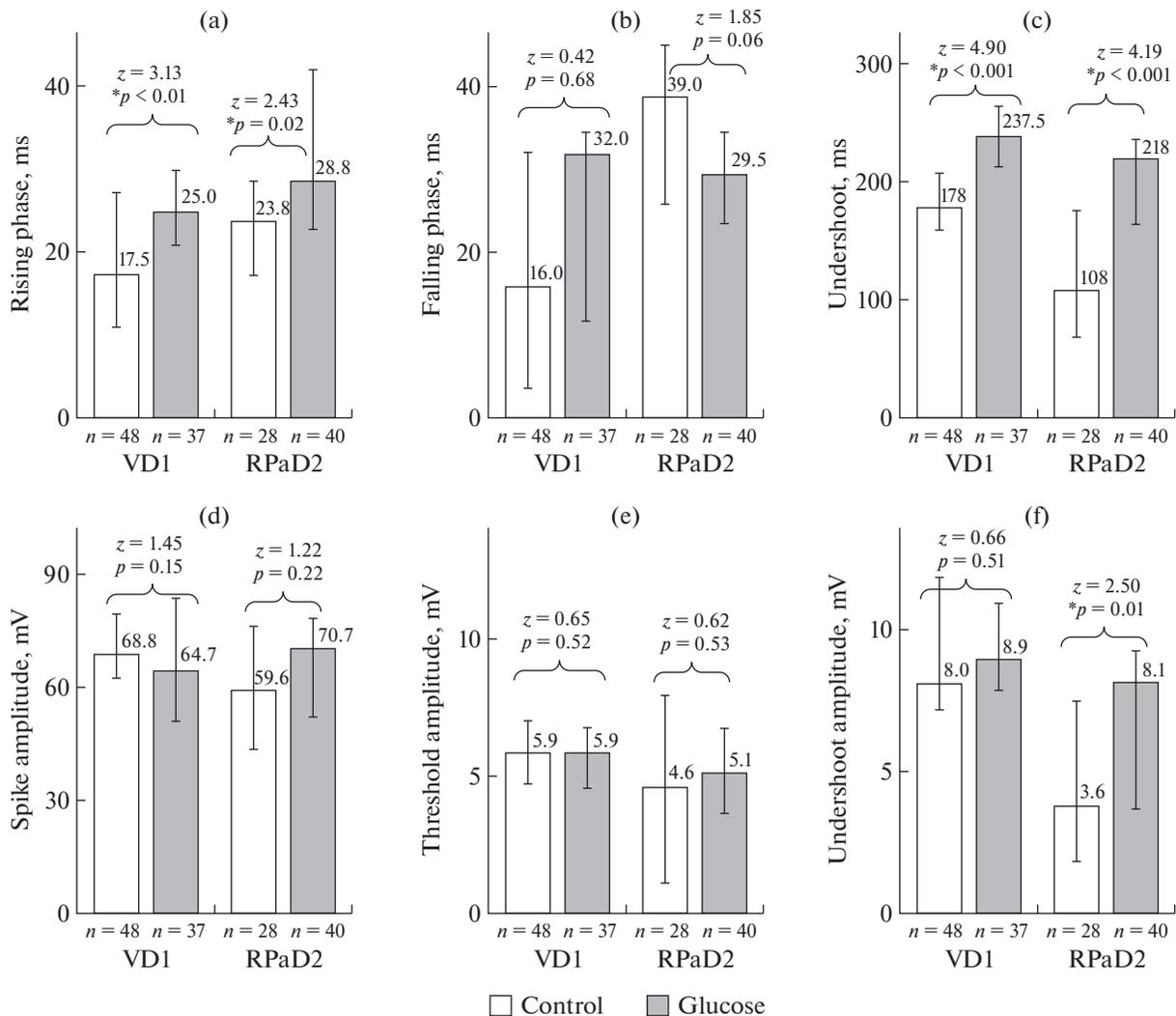


Рис. 4. Амплитудно-временные характеристики спайка в нейронах VD1/RPaD2 в контроле (Control) и в условиях экспериментальной гипергликемии (Glucose). (a) – длительность фазы деполяризации (Rising phase); (b) – длительность фазы реполяризации (Falling phase); (c) – длительность фазы следовой гиперполяризации (Undershoot); (d) – амплитуда потенциала действия (Spike amplitude); (e) – амплитуда порога потенциала действия (Threshold amplitude); (f) – амплитуда следовой гиперполяризации (Undershoot amplitude). Представлено значение показателя – числа над столбиками (медиана) и планки погрешностей (нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (*n*). Для каждой группы сравнения указаны значения *z* (*U*-критерий Манна–Уитни) и уровня значимости (*p*). * – Статистически достоверные изменения.

нии данных по нейронам VD1 и RPaD2 (рис. 7). В контрольных условиях, для RPaD2, отмечено 1.77-кратное увеличение ($z = 2.12$; $p = 0.03$) и 2.75-кратное ($z = 2.36$; $p = 0.02$) уменьшение общей площади положительной и отрицательной фаз его спайков соответственно, по отношению к потенциалам действия VD1. При этом средняя площадь фаз спайка в RPaD2 была ниже по сравнению с таковыми для VD1 – в 1.10 ($z = 4.76$; $p < 0.001$) и 2.11 ($z = 5.09$; $p < 0.001$) раза для положительной и негативной фазы соответственно. В условиях гипергликемии эти различия и их направленность между VD1 и RPaD2 в целом сохранялись, за исключением значений для общей площади положительной фазы

($z = 0.02$; $p = 0.98$). Для спайков RPaD2, по сравнению с потенциалами действия VD1, отмечено снижение общей площади положительной фазы в 1.94 раза ($z = 2.97$; $p < 0.01$), средних площадей положительной и отрицательной фаз в 1.27 ($z = 2.80$; $p < 0.01$) и 1.75 ($z = 3.88$; $p < 0.001$) раза соответственно.

При гипергликемии, для нейрона VD1, по сравнению с контрольными условиями, речь идет об увеличении общей площади спайка в 1.32 и 2.49 раза для положительной и негативной фаз соответственно (рис. 7а), а также возрастании средней площади фазы в 1.26 (положительная) и 1.29 (негативная) раза (рис. 7б). В отношении RPaD2 справедливо говорить о неизменности значений общей и средней

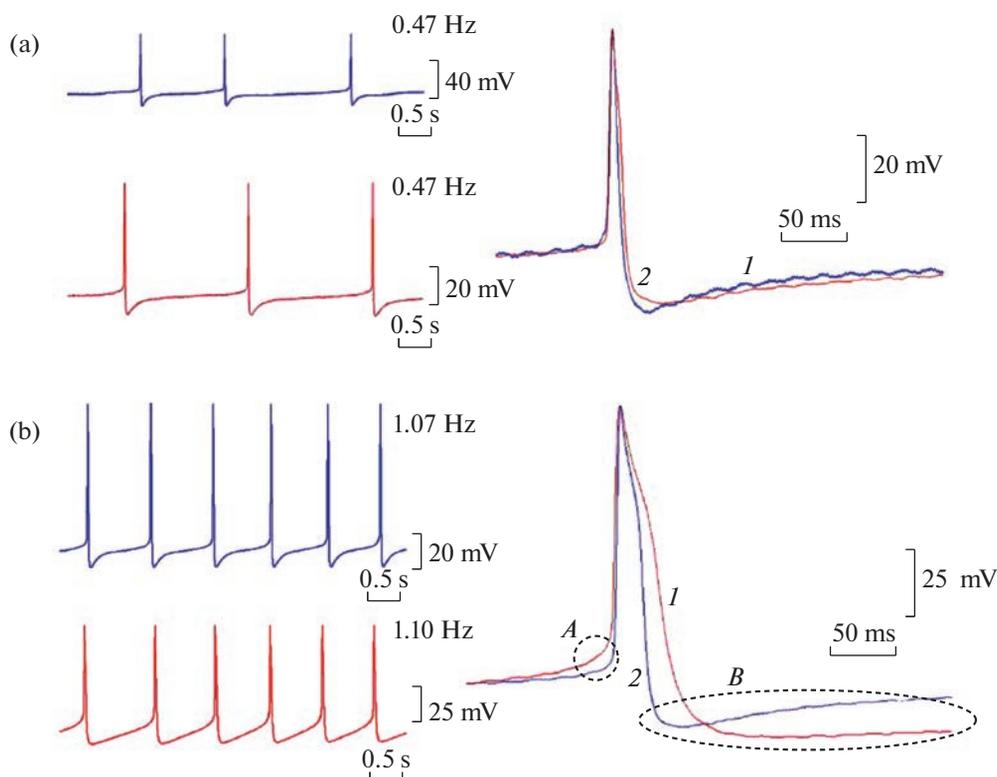


Рис. 5. Спонтанная электрическая активность нейрона VD1 и форма его спайков разного типа в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии. (а) – потенциалы 1-го типа, (б) – потенциалы 2-го типа. Для всех частей (а–б) рисунка: слева – фрагмент записи (5 с) электрической активности нейрона, где верхняя (синего цвета) полоса – контроль, нижняя (красного цвета) – гипергликемия (глюкоза, 10 мМ); справа – наложение отдельных спайков (синего цвета (1) – контроль, красного (2) – глюкоза, 10 мМ) этого участка с совмещением их пикового значения и уровня потенциала покоя, сопровождаемое выравниванием амплитуд потенциалов действия средствами графического редактора (по высоте рисунка), отражающее изменение временных характеристик спайка. Записи спонтанной электрической активности VD1 для контрольных и опытных условий получены от разных препаратов ЦНС. Для фрагментов записи (слева) приведены значения частоты (Гц), калибровка указана для каждой регистрации отдельно. Участки записи, отражающие изменения медленной деполяризации и следовой гиперполяризации мембраны, акцентированы пунктирной линией – области А и В соответственно.

площади позитивной фазы спайка, при 3.53- и 1.55-кратном увеличении этих же показателей для его негативной фазы при повышении содержания глюкозы в интерстиции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитоплазма электрически связанных нейронов VD1/RPaD2 фактически соединена посредством иннексонов (низкоомного контакта, обеспечивающего электрическое сопряжение этих клеток) [17], структурную основу которых составляют трансмембранные, с водной порой, каналные белки – иннексины [18, 19]. Как следствие, образованная электрическая цепь включает в себя три последовательно соединенных элемента, каждый со своими собственными электрическими характеристиками (сопротивление и емкость): пресинаптическая клетка (куда осуществляется подача электрического импульса), каналы щелевого соединения, постсинаптическая клетка. Поскольку в

использованной нами конфигурации речь не шла о механическом разделении исследованных нейронов или фиксации напряжения на их мембране, правильно говорить об электрических свойствах цепи электрически связанных нейронов, определяемых, тем не менее, преимущественно характеристиками пресинаптического нейрона.

С этих позиций определенные нами значения для сопротивления мембраны должны быть ниже, а для емкости выше, отмечаемых для изолированных нейронов – возрастание общей площади мембраны позволяет удерживать большое количество заряда (емкость выше), а также увеличивает количество путей для текущих через мембрану токов (сопротивление ниже). Действительно, Benjamin и соавт. [17] указывают, что R_m для VD1 составило 50 МΩ, а для RPaD2 – 68 МΩ. Отдельно подчеркивается, что данный показатель весьма variabelен, наблюдались его колебания в диапазоне 14–80 МΩ. Найденное авторами значение τ_m не носило статистически достоверных различий для VD1 и RPaD2,

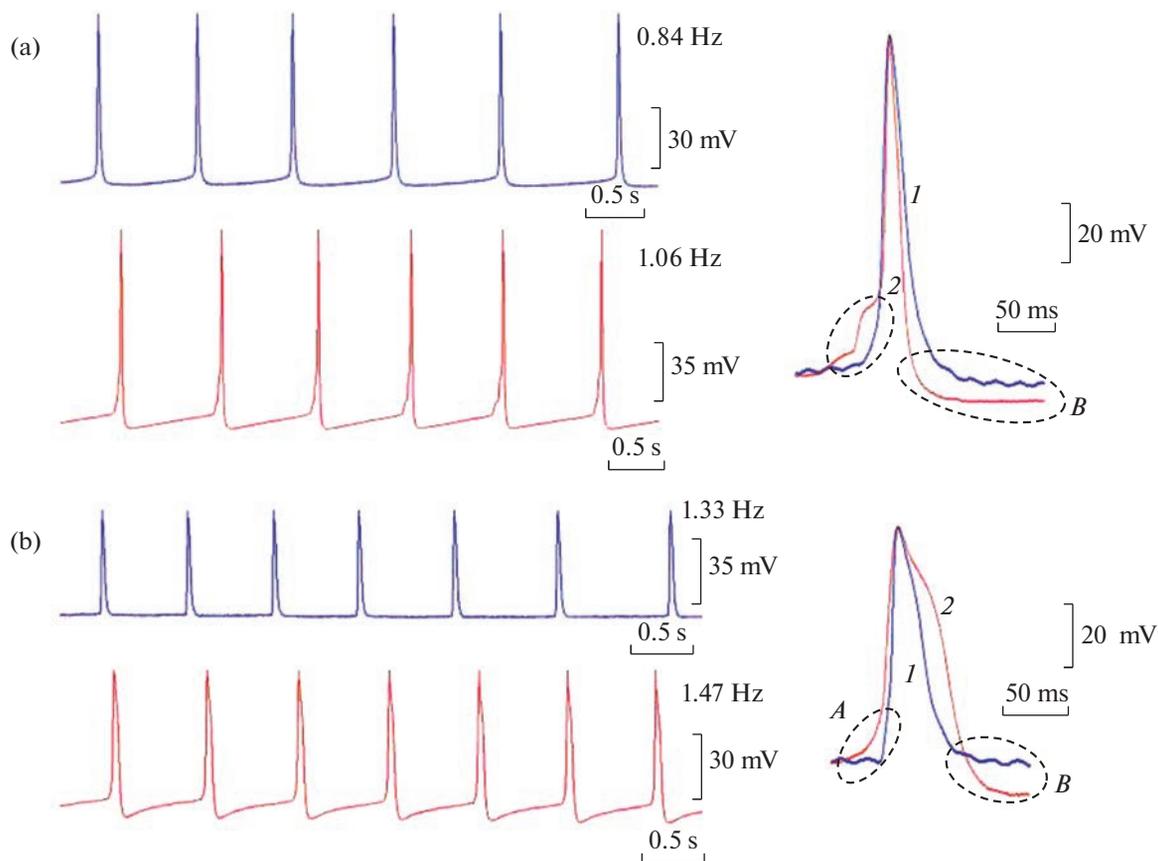


Рис. 6. Спонтанная электрическая активность нейрона RPaD2 и форма его спайков разного типа в контроле и в условиях экспериментальной гипергликемии. (a) – потенциалы 1-го типа, (b) – потенциалы 2-го типа. Те же, что и для рис. 5.

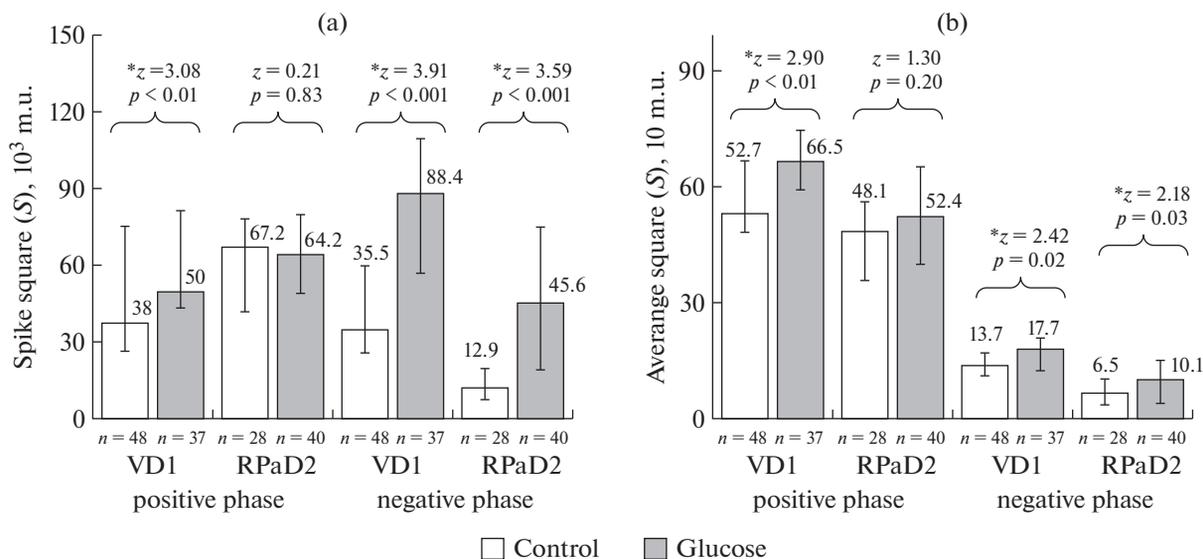


Рис. 7. Интегральные параметры потенциала действия (ПД) в нейронах VD1/ RPaD2 в контроле (Control) и в условиях экспериментальной гипергликемии (Glucose). (a) – общая площадь (S) фазы спайка, (b) – средняя площадь (S/t) фазы спайка. Представлены значение показателя – числа над столбиками (медиана) и планки погрешностей (нижний, верхний квартили), число проанализированных спайков (n). Для каждой группы сравнения указаны значения z (U-критерий Манна–Уитни) и уровня значимости (p). * – Статистически достоверные изменения, m.u. – машинные единицы.

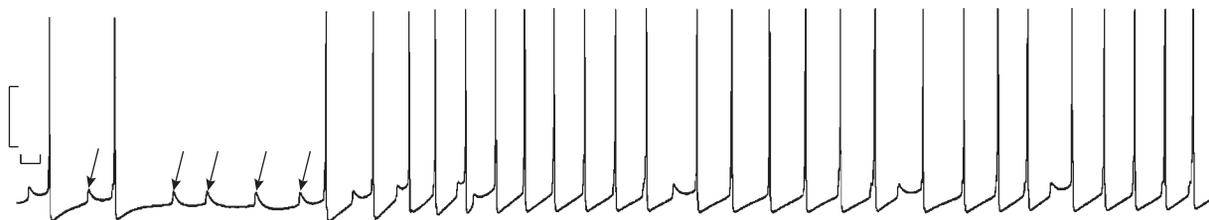


Рис. 8. Спонтанная электрическая активность нейрона RPaD2 ЦНС *Lymnaea stagnalis* в условиях экспериментальной гипергликемии. Локальные потенциалы, не переходящие в потенциалы действия, отмечены стрелками. Калибровка по времени – 0.5 с, по амплитуде – 35 мВ.

составляя около 300 мс, что в целом характерно для нейронов моллюсков [20]. С другой стороны, имеются сведения о значительно более высоких значениях R_m для VD1 и RPaD2, достигающих ~300 и ~350 МΩ соответственно, в то время как величина τ_m была понижена до уровня ~120 и ~200 мс [21], что дает расчетные значения для C_m порядка 0.4 и 0.6 нФ. Предполагается, что подобные колебания “нормативных” величин могут быть связаны с сезонной пластичностью нейронов прудовика [22]. Однако не следует исключать и особенности изготовления/фиксации препарата изолированной ЦНС, что может существенно сказаться на целостности связи между нейронами (участок щелевого контакта приходится на область контакта их аксонов [17], а сами нейроны, как уже отмечалось, локализованы в разных, хоть и соседних, ганглиях).

В условиях гипергликемии отмечается снижение сопротивления мембраны, особенно заметное в отношении нейрона RPaD2 (см. данные таблицы и сдвиг кривой ВАХ на рис. 3d), что может означать возрастание трансмембранных потоков для различных ионов, прежде всего Na^+ , Ca^{2+} и K^+ , как это отмечается для ряда нервных клеток позвоночных [23] и беспозвоночных [24]. Кроме того, речь идет о “выравнивании” данного показателя (R_m) для VD1 и RPaD2 – кривые ВАХ для данных клеток практически полностью совпадают при гипергликемии. Следствием этого будет изменение, снижение, коэффициента сопряжения (КС) между исследованными нейронами, по крайней мере при передаче сигнала в одном из возможных направлений (от VD1 к RPaD2), т.к. он зависит от R_m условно постсинаптической клетки [25]: $\text{КС} = R_m / (R_m + r_c)$, где r_c – сопротивление связи. Подтверждением этого является наличие в ряде препаратов изолированной ЦНС электротонических возбуждающих постсинаптических потенциалов, регистрируемых на мембране RPaD2 (рис. 8), соответствующих развитию полноценного спайка в VD1. Схожая картина наблюдается именно при возрастании сопротивления связи, т.е. снижении коэффициента сопряжения между нейронами (см. [17], fig. 11).

Известно, что различные внутриклеточные метаболиты (H^+ , Ca^{2+} , активные формы кислорода и т.п.) обладают выраженным действием в отноше-

нии проводимости щелевых контактов [26, 27]. Возрастание их уровня в интерстиции обычно ассоциируется с нарушением целостности клеточных мембран, т.е. гибелью клеток, что приводит к снижению КС между нейронами, позволяя, тем самым, изолировать такую область мозга от окружающих ее интактных клеток [28]. На возможность взаимодействия глюкозы с мембранными белками и различными компонентами в околосинаптическом пространстве, приводящим к изменению ее способности удерживать заряды, указывает увеличение емкости и, как следствие, постоянной времени мембраны, наблюдаемой в данной работе. Схожий механизм предполагается и в отношении действия ряда анестетиков, выраженно изменяющих возбудимость нервных клеток *Lymnaea* [21].

Еще лучше “выравнивание” электрических характеристик VD1 и RPaD2 в условиях гипергликемии заметно на примере изменения формы потенциала действия. Речь идет о “растягивании” спайка, т.е. увеличении длительности фаз его составляющих при сохранности амплитудных характеристик: относительно “узкие” спайки VD1 расширяются и не отличаются от таковых для RPaD2. Такая реакция может быть связана с увеличением длительности нахождения тех или иных ионных каналов плазмалеммы в открытом (закрытом) состоянии, при относительной неизменности их числа, на что указывает временная динамика (часы) развития наблюдаемого эффекта – массовое обновление канальных белков плазмалеммы требует существенно больших временных затрат [29].

Возрастание длительности фазы ДП, очевидно, взаимосвязано с увеличением Na^+ -проводимости, вероятно, за счет интенсификации активности Na^+ /глюкозного котранспортера, как это отмечено для ряда пептидергических нейросекреторных клеток *Lymnaea* [30, 31]. Заметим, что активация именно пептидергических нейронов в ответ на возрастание содержания глюкозы в гемолимфе, вероятно, является общей реакцией для многих видов моллюсков. При этом речь может идти о выбросе такими клетками как инсулина, например, у *Aplysia californica* [32], так и других регуляторных пептидов

– гастрин/холецистокинин-подобных у *Helix lucorum* [33].

Изменение временных характеристик фаз реполяризации (РП) и следовой гиперполяризации (СГ) при гипергликемии должно быть связано с модификацией K^+ -проводимости мембраны. Пролонгирование этих фаз скорее свидетельствует о частичной блокаде K^+ -токов через мембрану, а не их активации, как это характерно для нейронов ствола мозга млекопитающих [34] и нейросекреторных клеток краба *Cancer borealis* [24]. Вместе с тем целая группа калиевых каналов позвоночных [35] и беспозвоночных [36], т.н. АТФ-чувствительные K^+ -каналы (K_{ATP}), переходят в закрытое состояние при возрастании содержания глюкозы в интерстиции, уменьшая калиевую проводимость и обеспечивая деполяризацию мембраны, что и наблюдалось в нашей работе (см. рис. 2а). Однако в структуре данных каналов отсутствует сенсор напряжения, а следовательно, их участие в развитии потенциала действия представляется маловероятным. Вместе с тем имеются свидетельства о АТФ-чувствительности истинных, потенциал-управляемых калиевых каналов мембраны нейронов [37], выражающейся в угнетении калиевых токов, что может лежать в основе отмечаемых нами эффектов.

Отдельно остановимся на возможных осмотических эффектах, связанных с длительным нахождением препаратов ЦНС в гипергликемическом растворе. Рассчитанная осмотическая концентрация использованного раствора Рингера для *Lymnaea stagnalis* составляет порядка 130 мосмоль/л. Как следствие, возрастание содержания в нем глюкозы до 10 мМ приводит к увеличению осмолярности такого раствора всего на 7–8%. Известно, что увеличение осмотической силы гемолимфы приводит к ограничению синтеза и накоплению пептидных гормонов, т.е. регулирует активность нейросекреторных клеток (dark green cells) центральных нервных ганглиев *Lymnaea* [38], однако, эти изменения осмолярности должны быть существенно выше – 160–190 мосмоль/л. Кроме того, увеличение содержания глюкозы в гемолимфе *Lymnaea* до 5 мМ не вызывает статистически достоверных колебаний ее осмотической концентрации [39], что в совокупности подтверждает идею о влиянии самой глюкозы, а не вызываемых ей осмотических эффектов.

Таким образом, в условиях гипергликемии отмечается унификация реакций нейросекреторных клеток ЦНС *Lymnaea stagnalis*, которая представляет собой своего рода “компенсацию” нарушения синхронизации электрической активности вследствие уменьшения коэффициента связи между нейронами VD1 и RPaD2. С этих позиций глюкоза может рассматриваться как фактор, обеспечивающий установление нового паттерна электрической активности в отношении, как минимум, групп пептидергических нейронов мозга прудовика, а

следовательно, и определенного поведенческого рисунка в условиях гипергликемии (подобные взаимоотношения между различными формами поведения моллюсков можно наблюдать, например, при действии температурного фактора [40]). Кроме того, указывается [41], что электрическая активность центральных дофаминергических интернейронов пищевой сети *Lymnaea* определяет формирование фенотипов, характерных для голодных (сытых) особей, т.е. когда различия в содержании глюкозы в гемолимфе наиболее заметны [14], а локomotorные серотонинергические мотонейроны ReA-кластера педальных ганглиев *Lymnaea* реагируют изменением мембранного потенциала и частоты импульсации на приложение глюкозы [42]. Будут ли отмеченные в данной работе реакции универсальными и применимы к интернейронам другой химической природы (содержащих низкомолекулярные медиаторы – дофамин, серотонин и т.п.) и не относящихся к нейросекреторным (нейрогормональным) клеткам – требует дополнительной экспериментальной проверки.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б22-105).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.С.), сбор данных (А.В.С., В.Н.Ш. – электрофизиология), обработка данных (А.В.С., В.Н.Ш.), написание и редактирование манускрипта (А.В.С., В.Н.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Getting PA* (1989) Emerging principles governing the operation of neural networks. *Ann Rev Neurosci* 12: 185–204.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.12.030189.001153>
2. *Marder E, Calabrese RL* (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76: 687–717.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.3.687>

3. Skinner FK, Kopell N, Marder E (1994) Mechanisms for oscillation and frequency control in reciprocal inhibitory model neural networks. *J Comput Neurosci* 1: 69–87. <https://doi.org/10.1007/BF00962719>
4. Grillner S (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52: 751–766. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.008>
5. Berry MS, Pentreath VW (1977) The integrative properties of electrotonic synapses. *Comp Biochem Physiol A* 57: 289–295. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(77\)90193-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(77)90193-1)
6. Dickinson PS, Mecsas C, Marder E (1990) Neuropeptide fusion of two motor pattern generator circuits. *Nature* 344: 155–158. <https://doi.org/10.1038/344155a0>
7. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM (2017) Central regulation of glucose homeostasis. *Comp Physiol C* 7: 741–764. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160015>
8. Steinbusch L, Labouèbe G, Thorens B (2015) Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 26: 455–466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.005>
9. Bean BF (2007) The action potential in mammalian neurons. *Nature Rev, Neuroscience* 8: 451–461. <https://doi.org/10.1038/nm2148>
10. Kennedy MB (2016) Synaptic signaling in learning and memory. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 8: a016824. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016824>
11. Kerkhoven RM, Croll RP, Van Minnen J, Bogerd J, Ramkema MD, Lodder H, Boer HH (1991) Axonal mapping of the giant peptidergic neurons VD1 and RPD2 located in the CNS of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with particular reference to the innervation of the auricle of the heart. *Brain Res* 565: 8–16. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91730-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91730-O)
12. Bogerd J, Geraerts WP, Van Heerikhuisen H, Kerkhoven RM, Joosse J. (1991) Characterization and evolutionary aspects of a transcript encoding a neuropeptide precursor of *Lymnaea neurons*, VD1 and RPD2. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 47–54. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(91\)90020-x](https://doi.org/10.1016/0169-328x(91)90020-x)
13. Sidorov AV, Shadenko VN (2021) Electrical activity of identified neurons in the central nervous system of a mollusk *Lymnaea stagnalis* under acute hyperglycemia. *J Evol Biochem Physiol* 56: 1257–1266. <https://doi.org/10.1134/S0022093021060065>
14. Scheerboom JEM, Hemminga MA, Doderer A (1978) The effects of a change of diet on consumption and assimilation and on the haemolymph-glucose concentration of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L) *Proc Kon Ned Akad Wet, Ser C* 81:335–346.
15. Benjamin PR, Winlow W (1981) The distribution of three wide-acting synaptic inputs to identified neurones in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis* (L.) *Comp Biochem Physiol* 70A: 293–307. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(81\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(81)90182-1)
16. Солтанов ВВ, Бурко ВЕ (2005) Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных. *Новости мед.-биол. наук* 1:91–95. [Soltanov VV, Burko VE (2005) Computer programs for electrophysiological data-processing. *News of Biomed Sci* 1: 91–95. (In Russ)].
17. Benjamin PR, Pilkington JB (1986) The electrotonic location of low-resistance intercellular junctions between a pair of giant neurones in the snail *Lymnaea*. *J Physiol* 370: 111–126. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp015925>
18. Mersman BA, Jolly SN, Lin Z and Xu F (2020) Gap Junction Coding Innexin in *Lymnaea stagnalis*: Sequence Analysis and Characterization in Tissues and the Central Nervous System. *Front. Synaptic Neurosci* 12: 1. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00001>
19. Scemes E, Spray DC, Meda P (2009) Connexins, pannexins, innexins: novel roles of “hemi-channels”. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 457: 1207–1226. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0591-5>
20. Gorman ALF, Mirolli M. (1972). The passive electrical properties of the membrane of a molluscan neurone. *J Physiol* 227: 35–49. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp010018>
21. Qazzaz MM, Winlow W (2017) Modulation of the Passive Membrane Properties of a Pair of Strongly Electrically Coupled Neurons by Anaesthetics. *EC Neurology* 6.4: 187–200.
22. Copping J, Syed NI, Winlow W (2000) Seasonal plasticity of synaptic connections between identified neurones in *Lymnaea*. *Acta Biol Hung* 51: 205–210.
23. Calabresi P, Marfia GA, Centonze D, Pisani A, Bernardi G. (1999) Sodium influx plays a major role in the membrane depolarization induced by oxygen and glucose deprivation in rat striatal spiny neurons. *Stroke* 30: 171–179. <https://doi.org/10.1161/01.str.30.1.171>
24. Glowik RM, Golowasch J, Keller R, Marder E (1997) D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *J Exp Biol* 200: 1421–1431. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.10.1421>
25. Kandel ER (1976) Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology. San Francisco, W.H. Freeman.
26. Bukauskas FF, Verselis VK (2004) Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta* 1662: 42–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.01.008>
27. Sidorov AV (2012) Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea neurons*. *Invert Neurosci* 12: 63–68. <https://doi.org/10.1007/s10158-012-0128-7>
28. Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* 26: 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.008>
29. Spray DC (1998) Gap junction proteins: where they live and how they die. *Circ Res* 83: 679–681. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.6.679>
30. Kits KS, Bobeldijk RC, Crest M, Lodder JC (1991) Glucose-induced excitation in molluscan central neurons producing insulin-related peptides. *Pflugers Arch* 417:

- 597–604.
<https://doi.org/10.1007/BF00372957>
31. Сидоров АВ, Шаденко ВН (2022) Электрические характеристики сенсорного нейрона и оборонительные реакции моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях пролонгированной гипергликемии. Экспер биол биотехнол 1: 23–38. [Sidorov AV, Shadenko VN (2022) Electrical properties of the sensory neuron and defense reactions of mollusc *Lymnaea stagnalis* at conditions of prolonged hyperglycemia. *Exper Biol Biotechnol* 1: 23–38. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-1-23-38>
 32. Floyd PD, Li L, Rubakhin SS, Sweedler JV, Horn CC, Kupfermann I, Alexeeva VY, Ellis TA, Dembrow NC, Weiss KR, Vilim FS (1999) Insulin prohormone processing, distribution, and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *J Neurosci* 19: 7732–7741.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-07732.1999>
 33. Shevelkin AV (1994) Facilitation of defense reactions during the consumption of food in snails: the participation of glucose and gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Neurosci Behav Physiol* 24: 115–124.
<https://doi.org/10.1007/BF02355661>
 34. Burdakov D, Lesage F (2010) Glucose-induced inhibition: how many ionic mechanisms? *Acta Physiol (Oxf)* 198: 295–301.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.02005.x>
 35. Huang CW, Huang CC, Cheng JT, Tsai JJ, Wu SN (2007) Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci Res* 85: 1468–1477.
<https://doi.org/10.1002/jnr.21284>
 36. Inoue I, Tsutsui I, Brown ER (1997) K⁺ accumulation and K⁺ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid *Sepioteuthis*. *J Physiol* 500: 355–366.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022026>
 37. Ye R, Liu J, Jia Z, Wang H, Wang Y, Sun W, Wu X, Zhao Z, Niu B, Li X, Dai G, Li J (2016) Adenosine triphosphate (ATP) inhibits voltage-sensitive potassium currents in isolated Hensen's cells and nifedipine protects against noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Med Sci Monit* 22: 2006–2012.
<https://doi.org/10.12659/msm.898150>
 38. Roubos EW, Moorers-Van Delft CM (1976) Morphometric in vitro analysis of the control of the activity of the neurosecretory dark green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Cell Tissue Res* 174: 221–231.
<https://doi.org/10.1007/BF00222160>
 39. Сидоров АВ (2022) Осмотическая концентрация в гемолимфе моллюска *Lymnaea stagnalis* при острой экспериментальной гипергликемии. Экспер биол биотехнол 3: 85–89. [Sidorov AV (2022) Hemolymph osmolality in mollusk *Lymnaea stagnalis* during acute experimental hyperglycemia. *Exp Biol Biotechnol* 1: 85–89. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-85-89>
 40. Сидоров АВ (2003) Влияние температуры на легочное дыхание, оборонительные реакции и локомоторное поведение пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis*. Журн высш нерв деят им ИП Павлова. 53: 513–517. [Sidorov AV (2003) Effects of temperature on respiration, defensive behavior and locomotion of freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Zhurn Vyssh Nervn Deyat Im IP Pavlova*. 53: 513–517. (In Russ)].
 41. Crossley M, Staras K, Kemenes G (2018) A central control circuit for encoding perceived food value. *Sci Adv* 4: eaau9180.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9180>
 42. Dyakonova V, Hernádi L, Ito E, Dyakonova T, Zakharov I, Sakharov D (2015) The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose. *Biophysics (Nagoya-shi)* 11: 55–60.
<https://doi.org/10.2142/biophysics.11.55>

MEMBRANE ELECTRICAL PROPERTIES AND SPIKE CHARACTERISTICS IN A PAIR OF IDENTIFIED ELECTRICALLY COUPLED *LYMNAEA STAGNALIS* NEURONS AT LONG-LASTING EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA

A. V. Sidorov^{a,#} and V. N. Shadenko^{a,b}

^a Belarusian State University, Minsk, Belarus

^b Republican Research and Practice Center for Mental Health, Minsk, Belarus

[#]e-mail: sidorov@bsu.by

Microelectrode technique was used to study the responses of identified peptide-containing cells VD1 and RPaD2 within isolated CNS of *Lymnaea stagnalis* to long-lasting (not less 2 h) exposure in D-glucose (10 mM) containing solution. It has been established that electrical characteristics of RPaD2 membrane, compared to VD1, undergo significant changes under experimental hyperglycemia. Decrease of membrane resistance (R_m), accompanied by an increase of membrane capacitance (C_m) and time constant (τ_m), were observed. Despite the invariance of their firing rate, depolarization of VD1 membrane take place, while RPaD2 membrane potential did not vary significantly. Modifications in time-course, but not amplitude, of VD1 and RPaD2 action potentials were similar and resulted in increase of their main phases (rising, falling, undershoot) duration. It is assumed that “identity” in membrane electrical properties of *Lymnaea*'s CNS neurosecretory neurons (VD1/RPaD2) at hyperglycemia plays an adaptive role, aimed to overcome the possible desynchronization of their spike activity as a result of electrical decoupling, initiated by a high glucose content in intercellular space.

Keywords: glucose, electrical synapse, nervous system, homeostasis, molluscs, invertebrates