



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 3, 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

Консерватизм и вариабельность системы антиоксидантной защиты ретиального пигментного эпителия позвоночных

Ю. В. Маркитантова, В. Н. Смирский

145

Экспериментальные статьи

Влияние холодового шока на размеры и активность ядерных эритроцитов *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (эксперименты *in vitro*)

Н. Е. Шалагина, А. А. Солдатов, Ю. В. Богданович

168

Влияние неонатальной гипоксии и антидепрессанта флуоксетина на когнитивную и стресс-гормональную функции у взрослых крыс

В. А. Михайленко, И. П. Буткевич, Е. А. Вершинина

178

Влияние предсердной электрической стимуляции на трансмуральную последовательность деполяризации стенок желудочков сердца крыс при золетил-ксилазиновом наркозе

*В. П. Нужный, Н. А. Киблер, А. С. Цветкова,
С. Н. Харин, А. Б. Байрхаев, Д. Н. Шмаков*

190

Противосудорожная эффективность ингибирования синаптических и внесинаптических ГАМК-транспортеров в предотвращении гипербарических кислородных судорог

О. С. Алексеева, Б. А. Герда, А. С. Жилева, И. Т. Демченко

198

Билатеральная синхронизация гиппокампальных тета-осцилляций *in vitro*

И. Халилов, А. Гайнутдинов, Р. Хазипов

207

Иммунофенотип мезенхимальных стволовых клеток, полученных из эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

*Е. Г. Учасова, Ю. А. Дылева, Е. В. Белик, В. Г. Матвеева,
С. М. Гусев, О. Л. Тарасова, О. В. Груздева*

215

Длительная световая депривация влияет на пищеварительную функцию у крыс в онтогенезе

Е. П. Антонова, А. В. Морозов, В. А. Илюха, Е. А. Хижкин, С. Н. Калинина

223

Содержание ретинола, α -токоферола и глутатиона в органах кабана (*Sus scrofa* L.), обитающего на северо-западе России

*И. А. Зайцева, И. В. Баишникова, Д. В. Панченко,
С. Н. Калинина, Т. Н. Ильина, Е. П. Антонова*

232

Contents

Vol. 59, No. 3, 2023

REVIEWS

Conservation and Variability of the Antioxidant Protection System
of the Retinal Pigment Epithelia in Vertebrates

Yu. V. Markitantova and V. N. Simirskii

145

EXPERIMENTAL ARTICLES

Effects of Cold Shock on the Size and Activity of *Scorpaena Porcus* (Linnaeus, 1758)
Nuclear Erythrocytes (*in Vitro* Experiments)

N. E. Shalagina, A. A. Soldatov, and Yu. V. Bogdanovich

168

Effects of Neonatal Hypoxia and Antidepressant Fluoxetine on Cognitive
and Stress-Hormonal Functions in Adult Rats

V. A. Mikhailenko, I. P. Butkevich, and E. A. Vershinina

178

Influence of Atrial Electrical Stimulation on The Transmural Sequence
of Depolarization of Ventricular Walls in Rat Heart Under Zolethyl-Xylazine Anesthesia

*V. P. Nuzhny, N. A. Kibler, A. S. Tsvetkova,
S. N. Kharin, A. B. Barkhaev, and D. N. Shmakov*

190

Anticonvulsant Efficacy of Inhibition of Synaptic and Extrasynaptic GABA-Transporters
in Prevention of Hyperbaric Oxygen Seizures

O. S. Alekseeva, B. A. Gerda, A. S. Zhilyaeva, and I. T. Demchenko

198

Bilateral Synchronization of Hippocampal Theta Oscillations *in Vitro*

I. Khalilov, A. Gainutdinov, and R. Khazipov

207

Immunophenotype of Mesenchymal Stem Cells Derived from Epicardial
and Perivascular Adipose Tissue in Patients with Cardiovascular Diseases

*E. G. Uchasova, Yu. A. Dyleva, E. V. Belik, V. G. Matveeva,
S. M. Gusev, O. L. Tarasova, and O. V. Gruzdeva*

215

Long-Term Light Deprivation Affects Digestive Function in Rats During Ontogeny

E. P. Antonova, A. V. Morozov, V. A. Ilyukha, E. A. Khizhkin, and S. N. Kalinina

223

The Content of Retinol, α -Tocopherol and Glutathione in the Tissues
of Wild Boar (*SUS SCROFA* L.), Inhabiting the Northwest of Russia

*I. A. Zaitseva, I. V. Baishnikova, D. V. Panchenko,
S. N. Kalinina, T. N. Ilyina, and E. P. Antonova*

232

КОНСЕРВАТИЗМ И ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2023 г. Ю. В. Маркитантова^{1,*}, В. Н. Смирский^{1,**}

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Москва, Россия

*e-mail: yuliya.mark@gmail.com

**e-mail: simir@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.

После доработки 05.03.2023 г.

Принята к публикации 17.03.2023 г.

В ходе эволюции организмы разработали стратегии, позволяющие использовать активные формы кислорода (АФК) в регуляции физиологических процессов и поддержании гомеостаза. Клетки тканей с высоким уровнем метаболизма и внутриклеточных АФК, одним из ярких примеров которых является ретикулярный пигментный эпителий (РПЭ), более подвержены риску повреждения под действием окислительного стресса (ОС), под влиянием экзогенных или эндогенных факторов. Клетки РПЭ позвоночных, несмотря на консервативность строения глаза и основных функций его тканей, по-разному реагируют на ОС, что обусловлено видоспецифичностью компонентов сигнальных путей, формирующих систему антиоксидантной защиты (АОЗ). Важная роль в АОЗ принадлежит факторам транскрипции, в частности, Nrf2. Система АОЗ в РПЭ включает несколько уровней регуляции, взаимодействие которых обеспечивает стабильность морфофункционального состояния клеток. Филогенетический анализ демонстрирует не только консерватизм, но и вариабельность компонентов АОЗ, что может иметь адаптационное значение, отражать различия функциональной нагрузки и регенеративного потенциала. Выявление механизмов АОЗ, обеспечивающих морфофункциональную стабильность клеток РПЭ, имеет фундаментальное значение и нацелено на поиск тканеспецифичных мишеней для эффективной терапии спектра заболеваний глаза.

Ключевые слова: окислительно-восстановительный баланс, гомеостаз, ретикулярный пигментный эпителий, активные формы кислорода, окислительный стресс, система антиоксидантной защиты, транскрипционные факторы, Nrf2, регенерация, стратегии клеточного ответа РПЭ

DOI: 10.31857/S0044452923030051, EDN: YHGTNX

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОЗ	от англ. “Antioxidant defense system, AODS”, антиоксидантная система защиты
АТФ	от англ. “Adenosine triphosphate, ATP”, аденозинтрифосфат
АТФза	от англ. “Adenosine 5'-TriPhosphatase, ATPase”, аденозинтрифосфатаза
АФК	от англ. “Reactive oxygen species, ROS”, активные формы кислорода
ВМД	от англ. “Age-related macular degeneration, AMD”, возрастная макулярная дегенерация сетчатки
ГРБ	гематоретикулярный барьер
ЛФ	от англ. “Lipofuscin, LP”, липофусцин
МАРК	от англ. “Mitogen-activated protein kinases”, митоген-активируемые протеинкиназы
МБ	от англ. “Bruch’s membrane, BM”, мембрана Бруха
Мт	от англ. “Metallothionein”, металлотхионеин
ОС	от англ. “Oxidative stress, OS”, окислительный стресс
ПЖК	от англ. “Polyunsaturated fatty acids, PFA”, полиненасыщенные жирные кислоты
ПМЛ	от англ. “Lysosomal membrane permeabilization, LMP”, пермеабилзация мембран лизосом
ПОЛ	от англ. “Lipid peroxidation, LP”, перекисное окисление липидов

Протеинкиназа СК2	от англ. “ <i>Protein kinase CK2</i> ”, кazeинкиназа II
РПЭ	от англ. “ <i>Retinal pigment epithelium, RPE</i> ”, ретинальный пигментный эпителий
СОД	от англ. “ <i>Superoxide dismutase, SOD</i> ”, супероксиддисмутаза
цАМФ	от англ. “ <i>Cyclic adenosine monophosphate, cAMP</i> ”, циклический аденозинмонофосфат, сАМФ
ЭМП	от англ. “ <i>Epithelial–mesenchymal transition, EMT</i> ”, эпителиально-мезенхимный переход
ЭПР	от англ. “ <i>Endoplasmic reticulum, EPR</i> ”, эндоплазматический ретикулум
A2E	от англ. “ <i>bis-retinoid N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine</i> ”, бис-ретинилиденэтаноламин
A2AR	от англ. “ <i>Adenosine A2A receptor</i> ”, аденозиновые рецепторы подтипа A2A
АСОХ	от англ. “ <i>Acyl-CoA Oxidase</i> ”, ацетил-КоА ацилтрансфераза
AGEs	от англ. “ <i>Advanced glycation end products</i> ”, конечные продукты гликирования
Akt	от англ. “ <i>Protein kinase B alpha</i> ”, протеинкиназа B- α
ARE	от англ. “ <i>Antioxidant Response Element</i> ”, антиоксидантный реагирующий элемент
AP-1	от англ. “ <i>Activator protein 1 (AP-1), transcription factor</i> ”
ASK1	от англ. “ <i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i> ”, киназа, регулирующая сигнал к апоптозу, тип 1
AIF	от англ. “ <i>Apoptosis-inducing factor</i> ”, апоптоз-индуцирующий фактор
ATF-1	от англ. “ <i>ATF-1 activating transcription factor 3</i> ”, активатор фактора транскрипции-1
CAT	от англ. “ <i>catalase</i> ”, каталаза
СВР	от англ. “ <i>Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding protein, CREB-binding protein</i> ”, CREB-связывающий белок
CUL3-E3	от англ. “ <i>Cullin 3-based ubiquitin ligase</i> ”, E3 убиквитин лигаза
DUOX1	от англ. “ <i>Dual Oxidase 1</i> ”, двойная оксидаза-1
ET-1	от англ. “ <i>Endothelin 1</i> ”, эндотелин
ERK	от англ. “ <i>Extracellular signal-related kinase</i> ”, экстраклеточная сигнал регулирующая киназа
FAS (CD95)	от англ. “ <i>Fas receptor (FasR) induces programmed cell death</i> ”, cluster of differentiation 95, апоптозный антиген, кластер дифференцировки 95
FGF β	от англ. “ <i>Fibroblast Growth Factor β</i> ”, фактор роста фибробластов
GAPDH	от англ. “ <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> ”, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GCLC	от англ. “ <i>Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit</i> ”, каталитическая субъединица глутамат-цистеин лигазы
GCLM	от англ. “ <i>Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit</i> ”, субъединица-модификатор глутамат-цистеин лигазы
GLUT	от англ. “ <i>Glucose transporter</i> ”, белок-переносчик глюкозы
GSH	от англ. “ <i>Glutathione</i> ”, глутатион
GPX	от англ. “ <i>Glutathione Peroxidase</i> ”, глутатионпероксидаза
НО-1	от англ. “ <i>Hemo-oxigenasa-1</i> ”, гем-оксигеназа-1
HIF-1 α	от англ. “ <i>Hypoxia-inducible factor 1-α</i> ”, фактор, индуцируемый гипоксией 1-alpha
HSP70	от англ. “ <i>70kDa heat shock protein</i> ”, белки теплового шока-70
ICAM	от англ. “ <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i> ”, молекулы межклеточной адгезии
IL-6	от англ. “ <i>Interleukin 6</i> ”
JNK/SAPK	от англ. “ <i>c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase</i> ”, каскад <i>стресс-активируемых протеинкиназ</i>
Keap1	от англ. “ <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> ”, Kelch-подобный белок 1, ассоциированный с ECH
МАРК ERK1/2	от англ. “ <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) cascade</i> ”, митоген-активируемый протеинкиназный сигнальный каскад
Mitf	от англ. “ <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i> ”, фактор транскрипции, ассоциированный с микрофтальмией
MMP-9	от англ. “ <i>Matrix metalloproteinase 9</i> ”, матриксная металлопротеиназа-9

NAC	от англ. “NAC transcription factors”, N-ацетилцистеин
NADPH-оксидаза	от англ. “Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase”, NOX, никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат оксидаза
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	от англ. “sodium–potassium adenosine triphosphatase”, фермент из группы транспортных аденозинтрифосфатаз (НКА)
NaIO ₃	от англ. “Sodium iodate”, йодат натрия
NF-κB	от англ. “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NLS	от англ. “nuclear localization signal”, сигнал ядерной локализации
NO synthase	от англ. “Nitric oxide synthases”, синтаза оксида азота
Nrf2	от англ. “Nuclear factor erythroid 2-related factor 2”, транскрипционный ядерный фактор 2, связанный с эритроидным фактором 2
PAI-1	от англ. “Plasminogen activator inhibitor-1”, ингибитор активатора плазминогена-1
PEDF	от англ. “Pigment Epithelium-derived Factor”, фактор роста происхождения из пигментного эпителия
PI3K/Akt	от англ. “Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway, фосфатидилинозитол-3-киназа/киназа Akt”,
PI3K-Akt-mTOR	от англ. “сигнальный путь, опосредуемый киназами: фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K), АКТ и mTOR
PKC	от англ. “Protein kinase C, протеинкиназа C
PRDX	от англ. “peroxiredoxin”, пероксиредоксин
PTPN26	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 26, протеинтирозинфосфатаза 26
P2X7	от англ. “ATP-gated P2X receptor cation channel family”, P2X семейство рецепторов АТФ-управляемых катионных каналов
P2YR	от англ. “Metabotropic G protein-coupled P2Y receptors”, метаботропные связанные с G-белком пуринаргические рецепторы
R-SOH	от англ. “sulfenic acid”, сульфоновая кислота
SIRT-1	от англ. “Sirtuin 1, NAD-dependent deacetylase sirtuin-1”, сиртуин 1, деацетилаза сиртуин-1 зависимая от НАД
TGFβ	от англ. “Transforming Growth Factor”, трансформирующий фактор роста
TLR	от англ. “Toll-like receptor, Толл-подобные рецепторы”
TIMP2	от англ. “Tissue inhibitor of metalloproteinases 2”, тканевый ингибитор металлопротеиназ 2
TNFα	от англ. “Tumor necrosis factor alpha”, фактор некроза опухоли
TNFR1	от англ. “Tumor necrosis factor alpha receptors”, рецепторы фактора некроза опухоли
XO	от англ. “Xanthine-oxidase”, ксантин-оксидаза
VEGF	от англ. “Vascular Endothelial Growth Factor”, фактор роста эндотелия сосудов
•OH	гидроксильный радикал
•O ₂ ⁻	супероксидный анион
¹ O ₂	синглетный кислород
H ₂ O ₂	перекись водорода
NO	оксид азота
ONOO ⁻	пероксинитрит

ВВЕДЕНИЕ

Появление 2–2.5 миллиарда лет назад цианобактерий, способных к кислородному фотосинтезу, который сопровождается выделением кислорода (O₂), привело к возрастанию его концентрации в атмосфере.

В этих условиях увеличился внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК). Живые организмы приспособились к сосуществованию с АФК, разработали стратегии, позволяющие использовать их в различных физиологических про-

цессах, оптимизировали аэробный энергетический метаболизм и развили механизмы нейтрализации токсичных АФК [1]. Наличие абиотических фотохимических процессов позволяет предполагать, что даже более ранние формы жизни, предшествующие цианобактериям, могли обладать системами метаболизма O_2 /АФК и антиоксидантной защиты [2]. Клетки тканей с высоким уровнем метаболизма и энергетическими затратами имеют высокий уровень внутриклеточных АФК и приобрели в ходе эволюции хорошо развитую систему антиоксидантной защиты (АОЗ). К таким клеткам относятся, в частности, клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и фоторецепторы сетчатки, которые подвергаются воздействию света и обладают интенсивным метаболизмом [3]. Удовлетворение энергетических потребностей фоторецепторов требует усиленного потребления O_2 , поступающего в сетчатку через сеть капилляров сетчатки или капилляров сосудистой оболочки [4]. Интенсивность аэробных процессов в сетчатке, приводящих к выработке большого количества АФК, вызвала необходимость формирования специализированного интенсивно пигментированного слоя клеток РПЭ, способного к активной нейтрализации АФК и предотвращению окислительного стресса (ОС). РПЭ образует плотные контакты с наружными сегментами фоторецепторами сетчатки, участвуя в создании иммунной привилегии сетчатки, и взаимодействует с сосудистой оболочкой глаза [5]. Со стороны сосудистой оболочки РПЭ подстилает мембрана Бруха (МБ), в состав которой входят компоненты эндотелия сосудистой оболочки, богатой капиллярами, и уплотненного фибриллярного слоя собственно базальной пластинки РПЭ [6]. МБ участвует в регуляции диффузии биомолекул (протогликанов, хемокинов, цитокинов, факторов роста, токсичных продуктов жизнедеятельности) между фоторецепторами, РПЭ и сосудистой оболочкой. Комплекс фоторецепторы-РПЭ-МБ-сосудистая оболочка обеспечивает формирование гематоретинального барьера (ГРБ) [7].

РПЭ играет центральную роль в обеспечении функционирования сетчатки, осуществляя фагоцитоз дисков наружных сегментов фоторецепторов и защиту фоторецепторов от избытка света, поддержание баланса рН и ионов в субретинальном пространстве, доставку в нейральные слои сетчатки метаболитов (глюкоза, аминокислоты), продукцию факторов роста [8]. Регуляция баланса окислительно-восстановительных реакций, постоянно протекающих в РПЭ и фоторецепторах, обеспечивает контроль процессов пролиферации, гибели, дифференцировки клеток РПЭ на протяжении всего онтогенеза [7]. Поддержание стабильного состояния дифференцировки клеток РПЭ имеет решающее значение для функционирования сетчатки. Структурные, метаболические и генетические нарушения в РПЭ и пограничных тканях, под воздействием экзогенных или

эндогенных факторов, сопровождающиеся накоплением избытка АФК, ведут к активации ОС [9], который является важным звеном в патогенезе дегенеративных патологий сетчатки [10].

В процессе эволюции в организмах сформировались сложные системы АОЗ, которые представлены несколькими уровнями регуляции (звеньями), обеспечивающие снижение уровня АФК и их негативных последствий. Системы АОЗ предусматривают использование репаративных механизмов для восстановления поврежденных структур, в числе которых аутофагия РПЭ и ремоделирование поврежденных белков [11].

Несмотря на прогресс в понимании механизмов, роль факторов АОЗ в регуляции гомеостаза клеток и стратегиях клеточного ответа РПЭ, а также связь этих факторов с другими эндогенными защитными регуляторными системами у позвоночных охарактеризованы далеко не полностью. Существуют эволюционно закрепленные видовые отличия реакции клеток РПЭ на ОС у позвоночных. Клеточный ответ РПЭ позвоночных на повреждение и воспаление, сопровождающихся нарушением ГРБ, баланс окислительно-восстановительных реакций и активацией ОС, может вызвать как развитие патологических процессов в нейронах и глии сетчатки (у млекопитающих), так и обеспечить их восстановление (у ряда хвостатых амфибий) [12]. Изучение роли ОС и АОЗ в клеточном ответе РПЭ хвостатых амфибий заслуживает особого внимания, поскольку эти животные, в отличие от млекопитающих, способны к трансдифференцировке РПЭ в нейроны и глию сетчатки, а также к структурному и функциональному восстановлению слоя РПЭ после повреждения [13]. Отдельные сведения о роли ОС в пигментированных клетках эпителия радужки – источника для регенерации хрусталика у хвостатых амфибий, получены на уровне анализа изменений транскриптома. Конверсия пигментный эпителий-хрусталик сопровождается активацией редокс-чувствительных генов: *Hmox1*, *Fam213a*, *Erg1*, *Serp1b10* и др. [14].

В обзоре проведен анализ накопленных с использованием современных подходов данных о молекулярно-генетических механизмах регуляции окислительно-восстановительного метаболизма и стабильности клеток РПЭ позвоночных. Особое внимание уделено обсуждению роли в системе АОЗ ключевых ОС-зависимых факторов транскрипции *Nrf2*, с точки зрения консерватизма и эволюционной вариабельности. Высказано предположение о том, что разный ответ клеток РПЭ на действие ОС, у позвоночных с высокими или ограниченными регенерационными способностями, обусловлен особенностями эндогенных систем защиты, в частности, системы АОЗ.

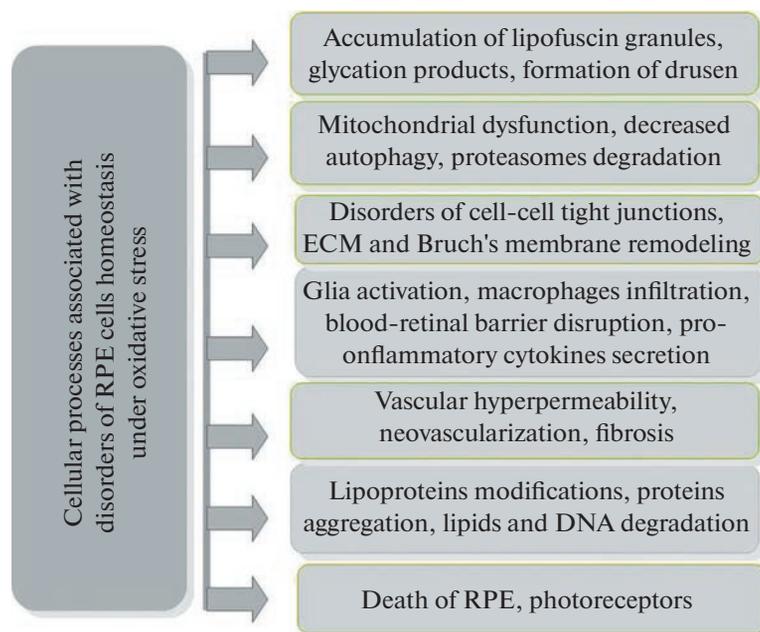


Рис. 1. Клеточные процессы в ретиальном пигментном эпителии и пограничных с ним тканях млекопитающих, при окислительном стрессе. Внутриклеточными мишенями являются липиды, белки, ДНК, повреждение которых отражает интенсивность окислительного стресса и степень поражения клеток.
 Условные обозначения: RPE – retinal pigment epithelium, DNA – deoxyribonucleic acid, ECM – extracellular matrix.

ЭКЗОГЕННЫЕ И ЭНДОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Воздействие экзогенных факторов (избыточный свет, ионизирующее излучение, высокие температуры, гипоксия, химические вещества, механическое повреждение) обуславливает высокий риск окислительного повреждения РПЭ и фоторецепторов [15–18]. Смена светового режима влияет на рН, концентрацию ионов Ca^{2+} и K^+ , увеличивает потребление кислорода, вызывая генерацию АФК в этих клетках [19]. В РПЭ и нейральных слоях сетчатки относительно высокое парциальное напряжение кислорода обеспечивает синтез АТФ в митохондриях. При этом более 90% O_2 восстанавливается до H_2O , а 1–5% O_2 участвуют в образовании АФК. Эндogenousными источниками АФК, помимо митохондрий, являются мембранно связанные NADPH-оксидазы (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX), лизосомы (фагосомы), пероксисомы, меланосомы [20–22].

Эндogenousные факторы предрасположенности РПЭ к ОС включают высокую скорость метаболизма и окислительных реакций в РПЭ и фоторецепторах. В сетчатке постоянно обновляются внешние диски фоторецепторов: слушающиеся “отработанные” диски, мембраны которых содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот (ПЖК), утилизируются в РПЭ [20]. В процессе зрительного цикла происходит изомеризация 11-цис-ретиная в транс-ретиаль в составе родопсина и продуциру-

ются АФК, которые вызывают перекисное окисление ПЖК [23, 24], накопление липофусцина (ЛФ) [21], окисление (обесцвечивание) меланина, выполняющего защитную роль, за счет активного участия в “нейтрализации” АФК, в первую очередь, синглетного кислорода [22]. В большинстве случаев поврежденные под действием ОС в РПЭ клеточные компоненты деградируют и заменяются вновь синтезированными в результате репаративной аутофагии [25]. В постмитотических клетках РПЭ интенсивность повреждения зависит от степени аутофагии, накопления продуктов клеточного распада. Возрастные изменения, связанные с накоплением и депонированием ЛФ в лизосомах, являются значимым фактором риска развития ОС-зависимых патологий РПЭ [26]. Метаболические нарушения, приводящие к накоплению ионов H^+ и снижению рН в РПЭ, являются общей характеристикой апоптотических стимулов, связанных с депривацией цитокинов или усилением генерации АФК. В условиях ОС возрастает фагоцитарная нагрузка клеток РПЭ, что проявляется в повышении интенсивности фагоцитоза апоптотических фрагментов и утилизации продуктов метаболизма МБ [20].

Разобщение контактов РПЭ с фоторецепторами при отслойке сетчатки, действию ультрафиолета, светового облучения, значительно увеличивает накопление в РПЭ продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [27]. Процессы свободнорадикального окисления при нарушении целостности и гомеостаза РПЭ усиливаются, что, в совокупности

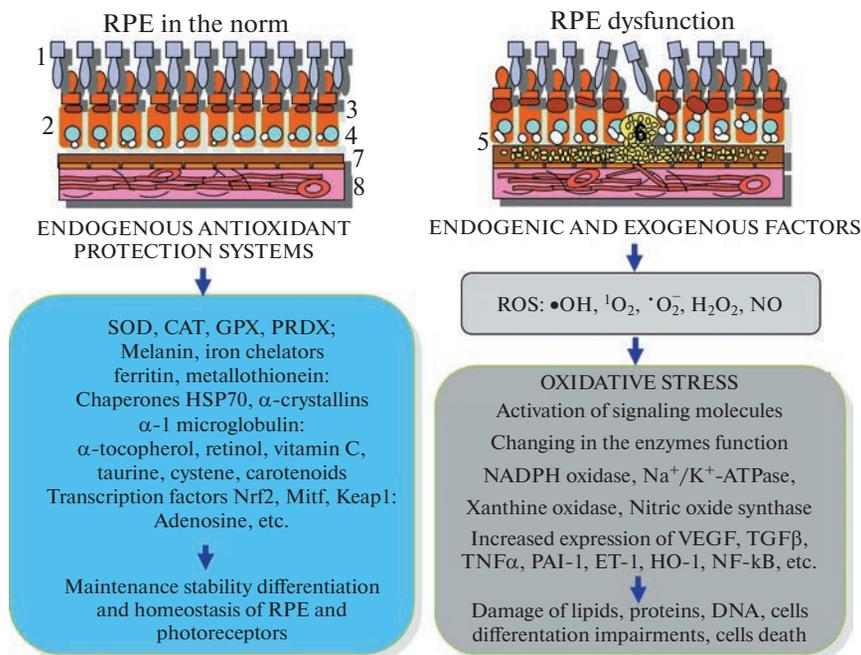


Рис. 2. Эндогенные системы (антиоксидантная и др.), обеспечивающие поддержание гомеостаза и защиту клеток ретикулярного пигментного эпителия млекопитающих от экзогенных и эндогенных факторов окислительного стресса. Интенсификация окислительных процессов приводит к развитию ОС, патологическим процессам и гибели клеток.

Условные обозначения: 1 – фоторецепторы, 2 – ретикулярный пигментный эпителий (RPE), 3 – меланосомы, 4 – ядро, 5 – липофусцин, 6 – друзы, 7 – мембрана Бруха, 8 – хориокапилляры сосудистой оболочки. SOD – superoxide dismutase, CAT – catalase, GPX – glutathione peroxidase, PRDX – peroxiredoxin; ROS – reactive oxygen species, $\cdot\text{OH}$ – hydroxyl radical, $^1\text{O}_2$ – singlet oxygen, $\cdot\text{O}_2^-$ – superoxide, H_2O_2 – hydrogen peroxide, NO – nitric oxide. DNA – deoxyribonucleic acid.

с факторами воспаления, нарушает работу регуляторных и ферментных систем [28]. Эти процессы вызывают накопление продуктов окисления (малоновый диальдегид, 4-гидроксиноненаль, конечные продукты гликолиза), повреждение липидов клеточных мембран, белков и нуклеиновых кислот [20]. ОС нарушает общий клеточный гомеостаз клеток РПЭ, затрагивает большинство внутриклеточных процессов и взаимодействие с окружающими тканями (фагоцитоз, аутофагия, транспорт метаболитов) (рис. 1). Деструктивная активность АФК в клетках проявляется в окислении белков, мембранных липидов, повреждении ДНК [29]. В клетках РПЭ происходит накопление и нарушение метаболизма остаточных молекулярных компонентов, их экспорта, из-за высвобождения лизосомальных ферментов в цитозоль, что приводит к снижению экранирующей и антиоксидантной функций РПЭ и является пусковым звеном дегенеративных процессов [10].

Клеточные процессы, контролирующие продукцию и элиминацию избыточного количества АФК, обеспечивают реализацию функций клеток РПЭ и фоторецепторов [21, 26]. Важная роль в контроле состояния клеток принадлежит окислительно-восстановительным процессам, равновесию между прооксидантной и антиоксидантной системами [10]. Это

равновесие обеспечивается активностью сигнальных белков, ферментов, редокс-чувствительных генов, которые контролируют синтез ДНК, проницаемость мембранных каналов и другие процессы, направленные на поддержание стабильности гомеостаза клеток [30, 31]. Сдвиг равновесия в РПЭ в сторону окислительных процессов ведет к ОС, дисфункции РПЭ и фоторецепторов [10].

Большинство генов, мутации в которых приводят к ОС-зависимым патологиям сетчатки, кодируют факторы транскрипции с высокой и специфической экспрессией в РПЭ и фоторецепторах. Такие мутации могут вызывать интенсификацию накопления ЛФ в РПЭ, приводить к снижению числа или полному отсутствию меланосом, дезорганизации МБ и внеклеточного матрикса (ВКМ) [12, 26].

ПРООКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА И ИСТОЧНИКИ АФК В РЕТИНАЛЬНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ

Прооксидантная система, компоненты которой вовлечены в развитие ОС, включает различные виды АФК (супероксидный анион $\cdot\text{O}_2^-$, гидроксильный радикал $\cdot\text{OH}$, синглетный кислород $^1\text{O}_2$, перекись водорода H_2O_2), низкомолекулярные прооксиданты (ионы переходных металлов Mn, Fe, Cu),

а также специализированные ферменты, которые генерируют АФК (NADPH-оксидаза, NO-синтаза, ксантиноксидаза) [29, 32] (рис. 2).

Супероксидные анионы $\cdot\text{O}_2$ возникают в клетках РПЭ и сетчатки как продукт цепи окислительного фосфорилирования митохондрий при синтезе АТФ [33], а в цитозоле – в результате активности NADPH-оксидаз [34]. NADPH-оксидазная система генерирует $\cdot\text{O}_2$ и H_2O_2 , участвующие в нейтрализации патогенов [35]. У большинства млекопитающих идентифицированы 7 изоформ NADPH-оксидаз: NOX1–5 и DUOX1–2 [36]. Уже на ранних этапах эволюции произошла дивергенция на кальций-регулируемые NOX (NOX5, DUOX1-2), являющиеся наиболее “древними” и консервативными, и NOX, активируемые регуляторными субъединицами (NOX 1–4). NOX2 и NOX4 присутствуют у всех позвоночных, NOX1 появляется у рыб и амфибий, а NOX3, очевидно, является самым “молодым” членом семейства, обнаруженным только у птиц и млекопитающих [37]. Источником фотоиндуцированной генерации супероксидных анионов $\cdot\text{O}_2$ в РПЭ служит ЛФ, который при облучении видимым светом (преимущественно в синем диапазоне) восстанавливает молекулы кислорода O_2 до $\cdot\text{O}_2$ [38], которые, как предполагается, инициируют процесс деградации меланина [39, 40]. Гидроксильный радикал $\cdot\text{OH}$ может продуцироваться лизосомами, в результате радиолитического расщепления воды, или образования пероксинитрита (ONOO^-), в результате реакции между супероксид-ионом O_2^- и оксидом азота NO. Синглетный кислород $^1\text{O}_2$, который образуется в результате фотосенсибилизации и возбуждения молекул ЛФ, рибофлавина или ретиналя, также является разрушительным метаболитом, который, как и $\cdot\text{OH}$, агрессивен, но не стоек, и быстро реагирует с разными клеточными компартментами [41].

Органеллами, специализирующимися на метаболизме перекиси водорода H_2O_2 , также являются пероксисомы, содержащие FAD-оксидоредуктазы (флавинадениндинуклеотид зависимые оксидоредуктазы), которые участвуют в бета-окислении ПЖК. В пероксисомах образуются ацетил-КоА ацилтрансфераза (АСОХ), альдегидогенные фосфолипиды (плазмалогены) и желчные кислоты, а в качестве побочных продуктов – H_2O_2 , которая утилизируется каталазой [42]. Фермент АСОХ появляется у эукариот, известно, что у человека он представлен тремя изоформами (АСОХ1-3) [43].

При накоплении продуктов перекисного окисления в РПЭ со стороны эндоплазматического ретикулума (ЭПР) развивается реакция на неструктурируемый белок, направленная на восстановление протеостаза. При избыточном накоплении окисленные формы белков теряют свойственную им структуру и агрегируют, что может приводить к дополнительной активации стресса ЭПР. Накопле-

ние агрегированных белков усугубляет ОС, вызывая разрыв лизосом и развитие реакций воспаления [44]. Повреждение РПЭ и сетчатки, действие АФК (H_2O_2) вызывают секрецию АТФ, активацию АТФ-зависимых Ca^{2+} -каналов (P2XR7), высвобождение из внутриклеточных депо ионов Ca^{2+} и усиление их транспорта в клетку. Цепь этих реакций увеличивает проницаемость мембран, вызывая набухание митохондрий, выход цитохрома С в цитоплазму [45].

Несмотря на тот факт, что АФК являются неустойчивыми соединениями, они оказывают существенное влияние на работу важных внутриклеточных ферментных систем (протеиназы, фосфатазы, фосфолипазы); обеспечивая изменения активности генов, кодирующих факторы транскрипции, и редокс-зависимых генов, которые принимают участие в контроле дифференцировки, метаболизма и пластичности клеток РПЭ [46–48]. Глобальные изменения экспрессии генов, принадлежащих к различным функциональным кластерам, затрагивают сигнальные пути, которые обеспечивают защиту клеток от ОС или контролируют гибель клеток РПЭ и сетчатки (апоптоз, некроз и др.) [49].

КЛЮЧЕВЫЕ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В РЕТИНАЛЬНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ

Транскрипционное профилирование выявило активацию редокс-чувствительных генов, регулирующих апоптоз, аутофагию в клетках РПЭ, при развитии патологических процессов [50, 51]. Обнаружены возрастание уровня экспрессии ОС-чувствительных генов и изменение уровня экспрессии генов, обеспечивающих устойчивость к окислительным реакциям в клетках РПЭ человека, в ответ на действие перекиси водорода H_2O_2 [52].

Редокс-чувствительные факторы транскрипции. К редокс-чувствительным факторам первой линии защиты клеток в РПЭ относят факторы транскрипции Nrf2, FOXO, HSF1 и другие, которые являются сенсорами АФК и обеспечивают запуск системы АОЗ [52]. Позвоночные имеют шесть паралогичных генов, которые кодируют факторы транскрипции семейства “cap ‘n’ collar” суперсемейства лейциновой молнии (bZip). Из них четыре фактора являются активирующими (Nrf1, Nrf2, Nrf3, NF-E2), а два – ингибирующими (Bach1 и Bach2) [53]. Центральную роль в активации системы АОЗ, наряду с белками теплового шока, играет фактор транскрипции Nrf2 (Nuclear factor E2 p45-Related Factors) [54]. Nrf2 контролирует экспрессию антиоксидантных, противовоспалительных и целого ряда метаболических генов [55]. Появление Nrf2 связывают с глобальным переходом от анаэробных условий обитания к аэробным. Ортологи Nrf2 появи-

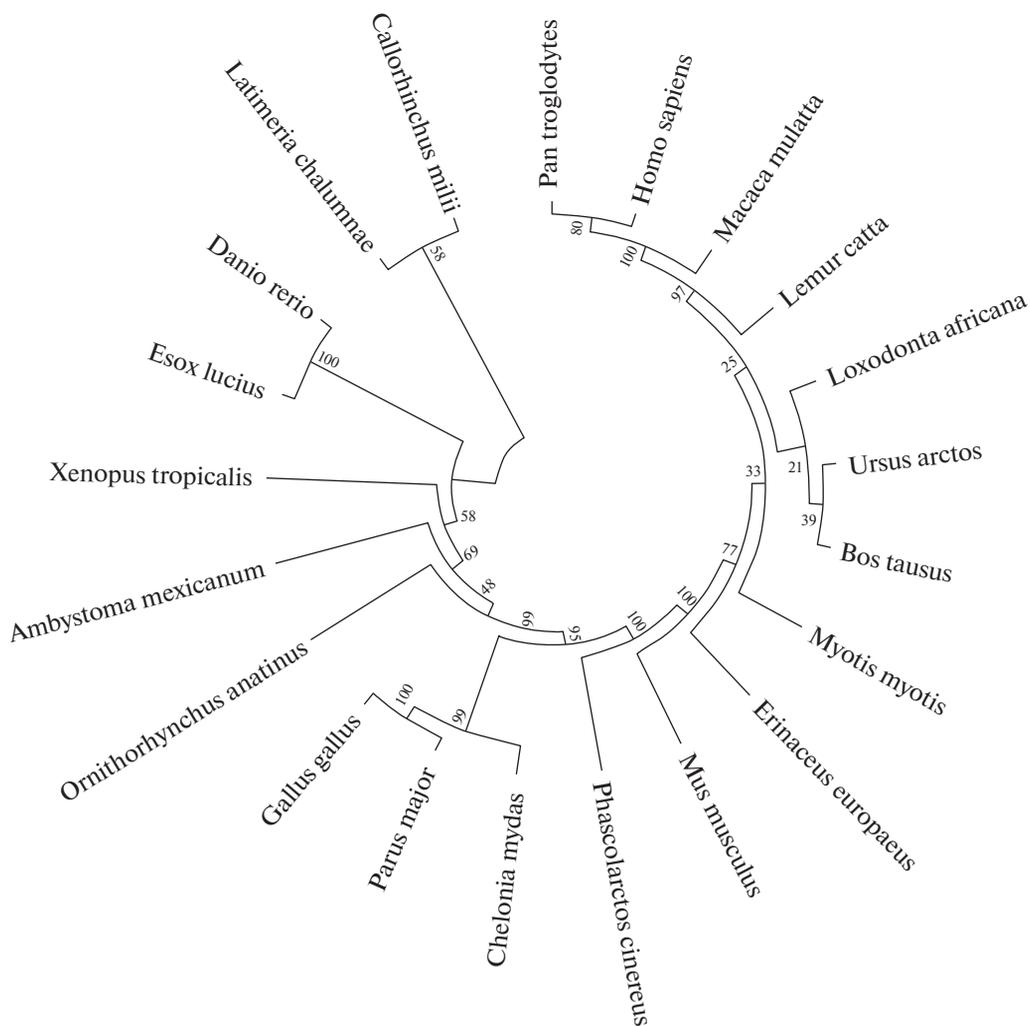


Рис. 3. Филограмма ортологов Nrf2, построенная методом ближайших соседей на основе базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

лись у предков грибов около 1.5 млрд лет назад. Первая дивергенция Nrf2 произошла во время разделения грибов и Metazoa (1.0–1.2 млрд лет назад). Уровень атмосферного O₂ постепенно возрастал во второй половине палеозойской эры (359–252 млн лет назад), в конце этого периода произошла очередная дивергенция Nrf2, сопровождающая появление и эволюцию млекопитающих [56].

Nrf2 имеет в своем составе 7 консервативных доменов Neh1–Neh7. Домен Neh1 содержит два сайта: “cap ‘n’ collar” – щелочную область лейциновой молнии (bZIP), которая обеспечивает связывание с ДНК, и сигнал ядерной локализации. N-концевой домен Neh2 содержит 7 остатков лизина, участвующих в убиквитинировании, и два мотива (ETGE и DLG), которые обеспечивают связывание с Keap1. Neh3, Neh4 и Neh5 являются трансактивационными доменами, которые опосредуют взаимодействие Nrf2 с другими коактиваторами (CBP, CREB-binding protein). Neh5 отвечает за цитоплазматическую локали-

зацию Nrf2 [57]. Neh6, обогащенный остатками серина, обеспечивает связывание с белком, включающим бета-трансдукционные повторы, содержащие дипептиды триптофана и аспарагиновой кислоты (WD-повторы), что ведет к убиквитинированию Nrf2 и его деградации [58]. Neh7 взаимодействует с ретиноидным X-рецептором-α (RXR-α), что блокирует сигнальную ось Nrf2-ARE [59].

Древний белок Nrf2 вместо 7 доменов, характерных для млекопитающих, по-видимому, имел всего три домена: Neh1, -3 и -6, а также область связывания с ЭПР. Такая структура Nrf2 сохранилась у современной гидры. Домен Neh2, обеспечивающий связь с Keap1, появился у трипобластов (многоклеточные животные, начиная с плоских червей). У вторичноротых появляются домены Neh4 и Neh5. В то же время у нематоды (*Caenorhabditis elegans*) Nrf2 теряет большинство исходных доменов, включая C-концевую часть домена Neh1, который обеспечивает связь с ДНК. С появлением

позвоночных в Nrf2 окончательно сформировались шесть функциональных доменов (Neh1-Neh6), тогда как был утрачен домен, обеспечивающий локализацию белка в ЭПР [54].

Фактор транскрипции Nrf2 является одним из ключевых факторов регуляции ОС у позвоночных. Ортологи Nrf2 обнаружены у представителей всех классов позвоночных, причем степень их идентичности – наиболее высокая в пределах класса, и минимальная у наиболее удаленных эволюционно классов позвоночных (рис. 3).

Филогенетический анализ доменов Nrf2 показывает, что домены Neh1 (обеспечивает связывание фактора с ДНК) и Neh2 (ответственен за взаимодействие с Keap1) являются наиболее консервативными (идентичность не менее 70%) у всех классов позвоночных (от древнего класса лопастоперых рыб, представителем которых является латимерия, до человека). Домены Neh3-Neh6 демонстрируют вариабельность у низших позвоночных (амфибии, рыбы), а домен Neh7, ответственный за взаимодействие с RXR- α , эволюционирует, по-видимому, наиболее быстро: у рыб его сходство с человеком не превышает 27%, у птиц – 41%, у яйцекладущих млекопитающих (утконос) – 33% (табл. 1).

В норме Nrf2 находится в неактивном состоянии в комплексе с Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). В результате активности CUL3-E3 (Cullin 3-based ubiquitin ligase) Nrf2 подвергается полиубиквитинированию и деградации протеасомами. ОС вызывает конформационные изменения Keap1, высвобождая Nrf2, который фосфорилируется, мигрирует в ядро клетки, где образует комплекс с факторами транскрипции Maf [60]. Этот комплекс индуцирует экспрессию ряда генов, взаимодействуя с их цис-регуляторными последовательностями – антиоксидантными реагирующими элементами (Antioxidant Response Elements, ARE) [61].

Регуляторная ось Keap1-Nrf2-Maf является эволюционно консервативной и обнаружена у всех видов, от *Drosophila melanogaster* до человека [61]. Nrf2 активирует в РПЭ как антиоксидантные, так и противовоспалительные сигнальные каскады [62, 63]. Под контролем Nrf2 находятся гены, регулирующие энергетический метаболизм, репарацию ДНК и детоксикацию. Nrf2 связывается с промоторными областями генов, кодирующих цитопротекторные белки, в частности, гемоксигеназу-1 (HO-1) [64]. Мыши с нокаутом *Nrf2* демонстрируют снижение аутофагии клеток РПЭ, с ярко выраженными признаками возрастной макулярной дегенерации сетчатки (ВМД) [65]. В свою очередь, экспрессия *Nrf2* регулируется в РПЭ фактором транскрипции, ассоциированным с микрофалмией (Mitf) [66], который действует как антиоксидант, регулируя биогенез митохондрий и окислительно-восстановительный гомеостаз в РПЭ [30].

Факторы транскрипции Nrf1 и Nrf3, по-видимому, возникли в ходе дивергентной эволюции Nrf2, и функционируют независимо от Keap1. Они локализованы в ЭПР и участвуют в защитной реакции на неструктурированный белок. Гены, содержащие ARE, могут быть активированы также факторами транскрипции ERF300 и CREB [67]. С другой стороны, существуют репрессоры факторов транскрипции Nrf (Bach1, Bach2), которые предотвращают избыточную активацию системы АОЗ [68]. Среди редокс-чувствительных факторов транскрипции, принимающих участие в регуляции метаболизма и аутофагии, важную роль в РПЭ играют PPAR, CREB, TFEB, FOXO1/3, FXR [69], а также регуляторные белки ATF7 и Veclin-1 [70]. Биоинформационный анализ позволил выявить потенциальные ARE в ряде генов, участвующих в АОЗ клеток позвоночных [71], в частности, у представителей семейства PITX/Pitx, кодирующие факторы транскрипции [72–74].

Антиоксидантные ферментные системы защиты включают ферменты, нейтрализующие, и восстанавливающие АФК (рис. 2). ОС индуцирует экспрессию ферментов фазы II метаболической детоксикации: хинон-акцепторную оксидоредуктазу, гемоксигеназу-1 (HO-1), каталитическую субъединицу (GCLC) и субъединицу-модификатор глутамат-цистеин лигазы (GCLM) [75, 76].

Действие света или H₂O₂ вызывают активацию в РПЭ и сетчатке таких ферментов АОЗ как супероксиддисмутаза (SOD), пероксиредоксины (PRDX), каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPX) [77–79]. SOD – металлофермент, который катализирует превращение O₂⁻ в H₂O₂. С использованием генетических моделей млекопитающих (мышей) показано, что мутации *SOD1*^{-/-} и *SOD2*^{-/-} обуславливают высокую восприимчивость к ОС, патологическую неоваскуляризацию и дегенерацию сетчатки [80, 81]. Основной функцией PRDX является восстановление пероксидов (H₂O₂, алкилгидропероксиды и др.) в результате окисления тиоловой группы (R-SH) цистеина в активном центре этого фермента до сульфоновой кислоты (R-SOH) [77]. CAT превращают H₂O₂, которая образуется в результате β -окисления жирных кислот в пероксисомах, в воду и кислород. В РПЭ содержание CAT на порядок выше, чем в других тканях глаза [82]. GPX является ферментом, “нейтрализующим” H₂O₂ при низком уровне ОС. У млекопитающих описано 7 изоформ GPX. GPX4 широко представлен у позвоночных, обладающих развитой нервной системой и имеющих ПЖК в составе плазматических мембран. GPX4 содержит в своем составе селеноцистеин и катализирует расщепление H₂O₂ до H₂O в цитозоле или восстановлении гидроперекисей липидов в спирты, используя глутатион в качестве восстанавливающего агента [79]. Снижение активности GPX4 в РПЭ и фоторецепторах повышает их чувствительность к ОС [83].

Таблица 1. Степень идентичности доменов фактора транскрипции Nrf2 позвоночных относительно доменов NRF2 человека (NP_006155.2, изоформа 1)

Виды	Домены NRF2 Homo sapiens, %							NRF2 Homo sapiens NP_006155.2
	Neh1	Neh2	Neh3	Neh4	Neh5	Neh6	Neh7	
Pan_troglodytes (обыкновенный шимпанзе) XP_001145876.3	100	99	100	100	100	100	100	100
Macaca_mulatta (Макак-резус) NP_001244536.1	99	99	100	100	100	100	99	99
Lemur_catta (кошачий лемур) XP_045415392.1	97	87	100	96	100	86	91	91
Mus_musculus (домовая мышь) NP_035032.1	92	95	98	87	71	86	73	80
Bos_taurus (домашний бык) XP_005202370.1	98	79	91	91	93	84	86	86
Ursus_arctos (бурый медведь) XP_026348256.1	99	99	98	96	93	86	87	90
Loxodonta_africana (саванный слон) XP_003406250.2_L	97	94	98	87	86	84	83	87
Eriopis_europaeus (обыкновенный еж) XP_016044349.1	96	94	100	87	89	82	76	86
Phascolarctos_cinereus (коала) XP_020846698.1	95	88	91	78	89	78	66	77
Myotis_myotis (большая ночница) XP_036174805.1	98	98	95	87	96	86	79	86
Ornithorhynchus_anatinus (утконос) XP_007669464.2	84	73	77	87	89	55	33	57
Gallus_gallus (курица) NP_001383833.1	88	70	81	78	86	71	40	61
Parus_majus (большая синица) XP_015489930.1	83	74	84	70	86	73	41	62
Chelonia_mydas (зеленая черепаха) XP_037768002.1	87	81	79	74	89	73	35	63
Ambystoma_mexicanum (мексиканский аксолотль)*	80	78	77	61	71	61	28	56
Xenopus_tropicalis (шпорцевая лягушка) NP_001007490.1	73	83	67	39	61	49	22	50
Esox_lucius (щука) XP_010878224.2	73	64	77	65	54	49	21	45
Danio_reio (данио-рерио) NP_878309	77	66	65	52	46	47	21	44
Callorhynchus_milii (австралийский каллоринх) XP_007888253.1	79	74	74	74	54	45	21	50
Latimeria_chalumnae (латимерия) XP_014349356.1	80	74	74	74	68	57	27	54

Примечание. Данные вычислены на основе множественного выравнивания (рис. 4). * – последовательность из базы данных <https://genome.axolotl-omics.org>. Остальные последовательности приведены согласно базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Еще одна группа ферментов (дегидрогеназы, липазы, пептидазы, протеазы, трансферазы, ферменты репарации ДНК) участвуют в восстановлении или элиминации поврежденных биомолекул в РПЭ [43, 84]. АФК, генерируемые в РПЭ через электронно-транспортную цепь под воздействием света, кислорода, окислительного фосфорилирования, могут восстанавливаться с помощью систем NADPH, глутатиона и антиоксидантных ферментов [77, 79]. NADPH-оксидазы участвуют в регуляции клеточных сигнальных каскадов — наиболее изученный механизм их действия — окисление редокс-активных цистеинов в активном центре протеинфосфатаз. Показано участие протеинтирозинфосфатазы 26 (PTPN26) в фосфорилировании белков-компонентов сигнальных путей, управляющих пролиферацией, гибелью, дифференцировкой, метаболизмом клеток РПЭ [85].

Компоненты антиоксидантной защиты с функциями шаперонов и хелаторов ионов металла. Важным аспектом, негативно влияющим на стабильность клеток РПЭ, является нарушение метаболизма железа, накопление которого токсично для клеток и связано со снижением аутофагии и эффективности хелатирующих агентов [86]. В РПЭ функцию фотозащиты и антиоксиданта, нейтрализующего АФК, выполняет меланин, посредством хелатирования редокс-активных ионов железа и меди, связывания свободных радикалов (главным образом, синглетный кислород 1O_2) [87]. Меланин взаимодействует с анионами $^{\cdot}O_2$, вызывая их окисление в молекулярный кислород, а также способен восстанавливать $^{\cdot}O_2$ до H_2O_2 [88]. Присутствующий в РПЭ железосвязывающий цитозольный и митохондриальный ферритин хелатирует и “нейтрализует” ионы железа, которые способны катализировать образование гидроксильного радикала $\cdot OH$, снижая их концентрацию [89].

Другим эндогенным белком с металлосвязывающими свойствами является металлотионеин (Мт), который содержит большое количество остатков серина и активируется, помимо ОС, глюкокортикоидами и ионами тяжелых металлов, такими как цинк, медь и ртуть, действуя в качестве “поглотителя” свободных радикалов [90]. Эволюция форм Мт, также как и SOD, непосредственно связана с появлением в земной атмосфере свободного кислорода. У млекопитающих число изоформ Мт достигает максимума, появляются две дополнительные группы Мт, специфичные для нейральной ткани и многослойных слизистых эпителиев [91].

В клетках РПЭ конститутивно экспрессируются шапероны: DJ-1 [92], антиоксидант/шаперон α -1 микроглобулин, связывающий АФК [93], низкомолекулярные шапероны (sHSP). Основная роль шаперонов состоит в предотвращении внутриклеточного накопления цитотоксических белков и регуляции фолдинга белков [94]. sHSP обнаружены во всех доменах живых организмов и, по-видимо-

му, эволюционировали независимо у многоклеточных животных (Eumetazoa), грибов и растений. sHSP содержат эволюционно консервативный домен α -кристаллинов и переменные N- и C-концевые последовательности, которые эволюционировали независимо друг от друга. α -кристаллины препятствуют апоптозу клеток РПЭ, участвуя в активации реакций фосфорилирования в сигнальном пути PI3K/Akt, что обеспечивает устойчивость клеток РПЭ к ОС. α B-кристаллин обеспечивает восстановление уровня GSH в митохондриях [79]. У мышей с нокаутом генов α A- и α B-кристаллинов в условиях ОС наблюдали накопление АФК клетками РПЭ и последующую дегенерацию фоторецепторов [95, 96]. В геноме человека, кроме α A- и α B-кристаллинов, представлены еще восемь sHSP. ОС вызывает снижение уровня АТФ в клетках РПЭ и сетчатки, в числе первых защитных факторов начинают действовать АТФ-независимые sHSP. Активация HSPB1 (HSP27) приводит к блокаде Ca^{2+} -индуцируемого апоптоза в результате ингибирования каспазы-3 и предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий в цитоплазму [97]. После частичного восстановления клеток включается экспрессия индуцируемого стрессом АТФ-зависимого шаперона HSP70, который поддерживает окислительно-восстановительный гомеостаз, путем восстановления активности GPX и глутатионредуктазы. Снижение уровня глутатиона при ОС ведет к накоплению продуктов ПОЛ и гибели клеток путем ферроптоза [98]. HSP70 также участвует в регуляции опосредованного аутофагией протеолиза белков в РПЭ [99].

Шаперон HSP70 и близкий ему белок HSP110 являются наиболее эволюционно консервативными. Процент идентичности гомологов белков этих семейств у прокариот и эукариот достигает 50%. У человека насчитывается 13 генов *HSP70*, причем два из них видоспецифичны и отсутствуют у других позвоночных. В геноме ряда рыб обнаружены множественные копии генов *HSP70*, что, очевидно, является следствием дупликации генома [100].

Низкомолекулярные антиоксиданты включают жирорастворимые и водорастворимые. Жирорастворимые антиоксиданты (α -токоферол, убихинон кофермент Q10, витамин А, каротиноиды) локализуются в основном в мембранах митохондрий и лизосом, обеспечивая защиту липидов от перекисного окисления, за счет прерывания автокаталитической реакции ПОЛ [98, 101]. Водорастворимые антиоксиданты (витамин С, глутатион, флавоноиды) локализуются в цитозоле, где они действуют как “поглотители” АФК. Витамин С необходим для поддержания метаболизма ионов железа, обеспечения восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} [102]. Большинство позвоночных способны синтезировать витамин С из глюкозы в печени (млекопитающие), в почках (рыбы, амфибии, рептилии). Однако некоторые млекопитающие (человек, морская свин-

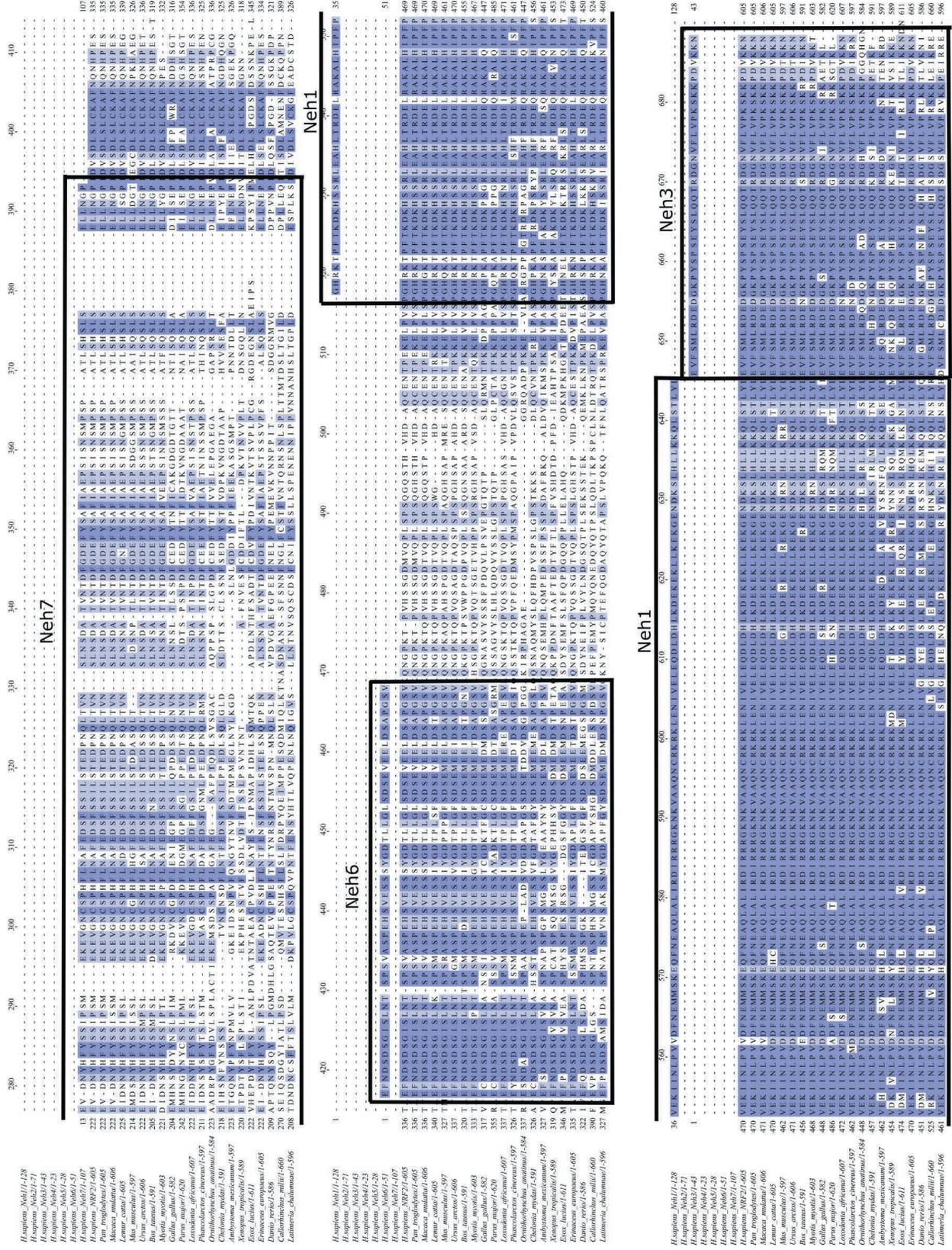


Рис. 4. Окончание

ка, летучие мыши) утратили способность к синтезу витамина С [103].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ, И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ В РЕТИНАЛЬНОМ ПИГМЕНТНОМ ЭПИТЕЛИИ

Наиболее стабильные виды АФК (H_2O_2 , оксид азота) служат посредниками в межклеточной передаче сигналов, фосфорилировании белков, метаболизме нуклеотидов [104]. Под влиянием умеренного ОС в РПЭ и фоторецепторах активируются сигнальные пути АОЗ, тогда как интенсивный и продолжительный ОС запускает сигнальные пути запрограммированной гибели клеток, формы которой (апоптоз, пироптоз, ферроптоз, некроптоз) превалируют в той или иной степени, в зависимости от интенсивности ОС и степени деструкции клеток [48, 105]. Апоптоз и пироптоз наблюдаются у всех многоклеточных, хотя могут обеспечиваться различными сигнальными путями. Наиболее “молодой” формой гибели клеток является некроптоз, который появляется у млекопитающих [106].

Факторы стресса могут вызывать апоптоз с использованием внешнего или внутреннего сигнальных путей. Каспаза-зависимые сигнальные пути, как внешний, так и внутренний, вовлечены в начальные стадии развития ОС в РПЭ. Внешний (рецептор-зависимый) апоптоз в РПЭ может запускаться двумя типами рецепторов на плазматической мембране: FAS (CD95) и рецепторами фактора некроза опухоли (TNFR1), которые активируют сигнальные каскады, с участием каспаз [107]. Внутренний путь апоптоза инициируется повреждением клеток, с высвобождением цитохрома С из пермеабилizированных митохондрий. Оба пути активируют эффекторный протеолитический фермент каспазу-3 [106]. Количество генов, кодирующих каспазы, варьирует у разных видов [108].

Ключевые ОС-зависимые сигнальные пути апоптоза в клетках РПЭ опосредованы каскадами протеинкиназ: JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase), p38, ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), PKC (Protein kinase C) [48, 109]. Процессы ПОЛ в РПЭ человека значительно усиливаются при гипоксии, часто сопровождающей ОС. В перинуклеарном пространстве происходит накопление HIF-1 α , NF- κ B, синтез VEGF, каспазы-3 и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, что связано с развитием апоптоза [17, 110].

Среди всех АФК наиболее изучено действие на клетки РПЭ экзогенной H_2O_2 . В нескольких работах показано, что H_2O_2 в физиологическом диапазоне концентраций (1 нМ до 0.1–0.5 мкМ) действует как сигнальная молекула, активирует рецептор-зависимую стимуляцию пролиферации клеток,

опосредованно оказывая влияние на экспрессию генов [110, 111]. Низкие концентрации H_2O_2 индуцируют в РПЭ чувствительные к ОС сигнальные пути, в которые вовлечены факторы транскрипции Nrf2, Keap1 и активируемые ими антиоксидантные ферменты, что приводит к стимуляции пролиферации и увеличению жизнеспособности клеток [112].

Более высокие концентрации H_2O_2 вызывают умеренный ОС в РПЭ, сопровождаемый воспалительными реакциями с участием NF- κ B и AP-1 [110] и гибелью клеток путем пироптоза. Обработка клеток РПЭ человека *in vitro* H_2O_2 в течение 24 ч индуцирует мобилизацию кальция, усиленную продукцию провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, фосфорилирование белков p38, MAPK, ERK, JNK и ICAM-1, перинуклеарное накопление фактора транскрипции NF- κ B, продукцию HIF-1 α [111].

Сильно выраженный ОС вызывает накопление продуктов ПОЛ (акролеин и др.), нарушение целостности и деполяризацию мембран митохондрий, стимулирует продукцию АФК поврежденными митохондриями [105]. Развивающиеся молекулярные процессы в РПЭ и фоторецепторах сетчатки на фоне накопления продуктов гликолитического распада и полиолов связаны с нарушениями функций Nrf2, мембранных транспортеров и митохондрий, что ведет к апоптозу или некроптозу клеток [113]. Избыточная продукция АФК (H_2O_2) повышает активность кальциевой АТФазы в РПЭ и нейронах, приводит к снижению внутриклеточного и возрастанию внеклеточного уровня АТФ [114], активации пуринорецепторов P2RX7, индуцирует приток внеклеточного Ca^{2+} в клетку. Ca^{2+} активирует окислительные ферменты (DUOX1, NADPH-оксидазу), стимулируя быстрый выброс H_2O_2 . Эти процессы сопровождаются снижением активности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH), активацией сигнального пути с участием PKC, приводят к подщелачиванию лизосом, накоплению ЛФ, образованию друз, содержащих окисленные формы липопротеинов, повышают уязвимость клеток РПЭ к ОС, вызывая их гибель по пути апоптоза или некроза [115].

Существует перекрестная связь между митохондриями и лизосомами при апоптозе клеток РПЭ, вызванном ОС. Пермеабилзация мембран лизосом (ПМЛ) является ранним событием во многих случаях апоптоза. Высвобождаемые лизосомальные ферменты пермеабиллизуют мембраны митохондрий, что еще более усиливает продукцию АФК и ПМЛ [99]. Если ПМЛ не является триггерным событием апоптоза, этот процесс индуцируется на более поздних стадиях несколькими механизмами, усиливающими сигналы гибели клеток. Процесс опосредован действием высвобождаемых катепсинов, участвующих в каспаза-независимом сигнальном пути апоптоза клеток РПЭ. На линии клеток ARPE-19 человека показано, что окислительный стрессор 7-кетохолестерол индуцирует стресс ЭПР, каспаза-зависимый апоптоз в результате ис-

пользования опосредованных рецепторами сигнальных путей с участием каспаз-8 и -12 [116]. При этом в клетках РПЭ не было выявлено активации митохондриального пути апоптоза, с участием каспазы-9, что, как предполагается, может объясняться возрастом активности белков теплового шока, препятствующих расщеплению (активации) каспазы-9 во время инициации апоптоза [95, 117]. Каспаза-12 в неактивном состоянии локализуется на цитозольной поверхности ЭПР, при ОС она запускает каскад реакций, приводящий к активации эффекторной каспазы-3 [116].

В экспериментах, моделирующих в РПЭ ОС действием H_2O_2 , с использованием нокдауна и/или специфических блокаторов, обнаружена роль ряда генов, участвующих в регуляции аутофагии. В клетках ARPE-19, обработанных ингибитором внутриклеточных регуляторов рН и обмена ионов Na^+/H^+ (5-N, N-гексаметилен)-амилоридом (НМА), происходит активация этого процесса. Применение ингибиторов протеасом стимулирует процесс аутофагии клеток РПЭ, в результате ингибирования сигнального пути PI3K-Akt-mTOR [118, 119]. Предполагается, что индукция аутофагии может быть общей реакцией клеток РПЭ и важным механизмом, обеспечивающим их устойчивость и стабильность в условиях умеренного ОС [105]. Другим аспектом действия H_2O_2 является усиление секреции клетками РПЭ трансформирующего фактора роста TGF β , который стимулирует продукцию ангиогенного фактора роста сосудов VEGF и нейротрофического фактора TNF α [120, 121]. Накопление в РПЭ окисленных фосфолипидов усиливает ATF4-зависимую секрецию VEGF, опосредованную протеинкиназой СК2 [122].

Механизмы действия ОС на дифференцировочный статус клеток РПЭ включают множественные сигнальные пути, которые используют общие компоненты и могут действовать антагонистически. В настоящее время наиболее эффективными стратегиями восстановления функций РПЭ при различных дегенеративных заболеваниях остаются стратегии, направленные на мобилизацию эндогенных защитных систем клеток, которые обеспечивают предотвращение ОС и преодоления его последствий [123–125]. Возможные способы стабилизации функционального состояния клеток РПЭ нацелены на акцепторы АФК, восстановление метаболизма пограничных тканей (фоторецепторов, сосудистой оболочки), стабилизацию МБ. Особого внимания, в связи с этим, заслуживает регуляция важных звеньев системы АОЗ, в которых участвует Nrf2 [112, 113].

Предлагаемые стратегии терапии патологий, ассоциированных с ОС-зависимым эпителиально-мезенхимным переходом (ЭМП) в РПЭ, направлены на прямую нейтрализацию АФК с помощью экзогенных антиоксидантов [126, 127], подавление продукции АФК путем снижения экспрессии прооксидантных генов и активности ферментов про-

оксидантной системы, активацию аутофагии, образование аутолизосом [52, 128], индукцию экспрессии антиоксидантного фактора транскрипции Nrf2 [64, 75, 76, 112], активацию HO-1 [126], SIRT-1 [129], GPX, SOD и CAT [130–133], регуляцию редокс-чувствительных микро РНК [134, 135], использование хелаторов железа [136].

Молекулярными мишенями для терапии ОС могут являться NADPH-оксидазы, фактор эндотелия сосудов VEGF, под влиянием которого усиливается продукция АФК NADPH-оксидазами [137], каспаза-3 [138], индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 α [139]. Ингибиторы протеасом стимулируют аутофагию клеток РПЭ, в результате блокирования сигналов PI3K-Akt-mTOR [119]. Стимуляция пуринорецепторов A2AR обеспечивает поддержание баланса между АТФ и аденозином в РПЭ, постоянство уровня сАМР и рН лизосом, препятствует избыточному накоплению ЛФ [140, 141]. Активация металлопротеиназ MMP-14 и TIMP2 [142], сигнального пути ERK/CREB [143], сигналов, запускаемых через рецепторы TLR3 (Toll-like receptor 3) защищает клетки РПЭ от негативного действия H_2O_2 [144]. Действие азапептидных лигандов направлено на поддержание процесса аутофагии и восстановление окислительно-восстановительного гомеостаза РПЭ [133, 145].

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И СТРАТЕГИИ ОТВЕТА КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ

Ранние события при нарушении целостности РПЭ при повреждении или патологии у позвоночных в ответ на ОС универсальны, характеризуются развитием реакций воспаления, направленных на защиту и выживание клеток. Разобщение связи РПЭ и фоторецепторов приводит к изменению полярности клеток РПЭ, ремоделированию МБ и плотных контактов, реорганизации ВКМ, интерфоторецепторного матрикса, цитоскелета, в норме обеспечивающих стабильное состояние клеток. Нарушение барьерных функций РПЭ сопровождается усилением продукции АФК. Эти изменения нарушают баланс факторов микроокружения РПЭ, вызывая повышение продукции прооксидантных и снижение противовоспалительных факторов [19, 146].

Важным аспектом изменений межклеточных взаимодействий РПЭ, сопровождаемых ОС, является проявление свойств пластичности клеток РПЭ [5, 146]. У млекопитающих ОС, возникающий при разобщении контактов РПЭ и фоторецепторов (отслойка сетчатки), является триггером дедифференцировки клеток РПЭ [12], запуска их конверсии по пути возникновения мезенхимного фенотипа и фиброзной ткани [13]. В то же время у хвостатых амфибий разобщение связи РПЭ и фоторецепторов запускает трансдифференцировку (конверсию) кле-

ток РПЭ в фенотип нейронов и глии. В итоге происходит восстановление структуры и функций как всех слоев сетчатки, так и собственно слоя РПЭ (редифференцировка) [147]. В тканях этих животных большинство процессов, часто рассматриваемых с точки зрения физиологии как разрушительные и направленные на защиту клетки (реакции воспаления, иммунный ответ, гибель клеток, продукция АФК, активация белков стресса), могут выполнять позитивную роль в регенерации. Так, АФК рассматриваются в качестве ведущих кандидатов для триггерных сигналов активации и поддержания регенерации тканей у хвостатых амфибий [148, 149]. При повреждении мозга у взрослых тритонов в ткани происходит запуск репаративного нейрогенеза, необходимого для компенсации погибающих нейронов. Однако интенсивность этого процесса снижается при ингибировании продукции АФК [149]. Ранее полученные на модели регенерации аксонов нейронов у рыб сведения свидетельствуют в пользу предположения о позитивной роли H_2O_2 в регенерации [150]. Данные цитируемых работ позволяют выдвинуть предположение о том, что низкие концентрации АФК могут быть использованы животными, обладающими высокими способностями к регенерации, для активации программ восстановления ткани. В частности, они могут быть задействованы в механизмах замещения утраченных нейронов из эндогенных клеточных резервов, путем трансдифференцировки клеток РПЭ у хвостатых амфибий. Предполагается, что возникшие в ходе эволюции ОС-зависимые механизмы защиты РПЭ способствуют предотвращению патологического ЭМП клеток РПЭ у хвостатых амфибий, в отличие от млекопитающих. Разные стратегии поведения клеток РПЭ позвоночных, в ответ на действие ОС, могут находить объяснение в особенностях сигнальных путей (доменной организации ключевых компонентов и их экспрессии), формирующих защитные системы клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительная эволюция в аэробных условиях привела к развитию систем защиты, которые обеспечивают адаптацию позвоночных к условиям среды обитания и клеточный ответ на действие стресса [151, 152]. Дисфункция РПЭ под действием эндогенных или экзогенных факторов, сопровождаемая нарушениями межклеточных взаимодействий и окислительно-восстановительного баланса, может вызывать изменение фенотипических свойств РПЭ (рис. 1, 2). Длительный и интенсивный ОС приводит к глобальным изменениям метаболизма клеток РПЭ, нарушению активности системы АОЗ и, в конечном итоге, к серьезным патологиям сетчатки [29, 48].

Проведенный анализ литературы позволил выявить как консерватизм, так и вариабельность основных компонентов сигнальных путей, связанных с

поддержанием гомеостаза и обеспечивающих защиту клеток РПЭ от разрушительного действия ОС. Консервативность основных элементов системы АОЗ позволяет использовать модельные организмы для изучения молекулярно-генетических механизмов ОС-зависимых патологий РПЭ человека, разрабатывать стратегии их предотвращения и терапии. Ключевые эволюционно-консервативные молекулярные звенья ОС-зависимых сигнальных путей, изучаемые на моделях РПЭ экспериментальных животных и клеточных системах РПЭ человека, могут служить потенциальными мишенями для селективных ингибиторов компонентов провоспалительных сигнальных путей и ЭМП, или активации АОЗ в РПЭ [23, 27, 60]. Несмотря на прогресс в изучении механизмов ОС-ассоциированных патологий РПЭ, до сих пор не удалось разработать эффективных методов стабилизации состояния РПЭ и блокирования развития дегенеративных процессов на ранних стадиях. Во многом это обусловлено различиями метаболизма РПЭ и нейральных слоев сетчатки, многофакторностью патологий, в которые также вовлечены клетки микроокружения (иммунного звена, эндотелиоциты сосудистой оболочки) [48, 113, 125]. Идентифицированные в РПЭ молекулярные мишени, как было отмечено, могут объединять несколько сигнальных путей, в том числе антагонистические [6, 10, 113]. Кроме того, данные, получаемые на разных модельных объектах, демонстрируют важность учета таксон-специфических особенностей структуры генома и активности регуляторных систем [106]. Филогенетический анализ ключевых ОС-связанных факторов транскрипции семейства Nrf2 [54, 57] и других компонентов АОЗ [79, 91, 100] позвоночных обнаруживает как консервативность, так и вариабельность доменной структуры кодируемых белков, что может иметь адаптационное значение к условиям среды и обуславливать различия клеточного ответа РПЭ.

Восприимчивость и устойчивость клеток РПЭ к ОС, помимо особенностей функционирования системы АОЗ, может объясняться различной степенью вклада внутриклеточных компартментов в продукцию АФК. К настоящему моменту остаются нерешенными многие вопросы, касающиеся взаимосвязи системы АОЗ с другими эндогенными системами в механизмах регуляции поведения клеток РПЭ (пластичности), в ответ на ОС (при повреждении) у позвоночных с различающимся потенциалом к восстановлению РПЭ. Это подчеркивает фундаментальную значимость изучения эволюции метаболических и сигнальных путей действия АФК, в контексте механизмов эндогенных систем защиты, с целью поиска способов обеспечения стабильности гомеостаза и дифференцировки клеток РПЭ в условиях окислительного повреждения у млекопитающих при травме и патологии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-25-00835.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Оба автора внесли равный вклад в формулировку идеи обзора, сбор литературы, написание и редактирование манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mendez-Romero O, Ricardez-García C, Castañeda-Tamez P, Chiquete-Félix N, Uribe-Carvajal S* (2022) Thriving in Oxygen While Preventing ROS Overproduction: No Two Systems Are Created Equal. *Front Physiol* 13: 874321. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.874321>
2. *Di Meo S, Venditti P* (2020) Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
3. *Country MW* (2017) Retinal metabolism: A comparative look at energetics in the retina. *Brain Res* 1672: 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.07.025>
4. *Damsgaard C, Lauridsen H, Funder AM, Thomsen JS, Desvignes T, Crossley DA 2nd, Møller PR, Huong DT, Phuong NT, Detrich HW 3rd, Brüel A, Wilkens H, Warrant E, Wang T, Nyengaard JR, Berenbrink M, Bayley M* (2019) Retinal oxygen supply shaped the functional evolution of the vertebrate eye. *Elife* 8: e52153. <https://doi.org/10.7554/eLife.52153>
5. *Fuhrmann S, Zou CJ, Levine E* (2014) Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. *Exp Eye Res* 123: 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.09.003>
6. *Amram B, Cohen-Tayar, David A, Ashery-Padan R* (2017) The retinal pigment epithelium – from basic developmental biology research to translation approaches. *Int J Dev Biol* 61 (3–4–5): 225–234. <https://doi.org/10.1387/ijdb.160393ra>
7. *Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C* (2011) Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* 21 Suppl (6):3–9. <https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049>
8. *Chen M, Rajapakse D, Fraczek M, Luo Chang, Forrester John V, Xu Heping* (2016) Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye – A mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging Cell* 15 (3): 436–445. <https://doi.org/10.1111/acel.12447>
9. *Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M* (2005) Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem* 280 (22): 21061–21066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502194200>
10. *Nebbio M, Franzone F, Lambiase A, Bonfiglio V, Limoli PG, Artico M, Taurone S, Vingolo EM, Greco A, Polimeni A* (2022) Oxidative Stress Implication in Retinal Diseases—A Review. *Antioxidants (Basel)* 11 (9): 1790. <https://doi.org/10.3390/antiox11091790>
11. *Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D, Lewin A, Grant M, Dunn Jr W, Ding J, Rickman CB, Boulton M* (2014) Dysregulated Autophagy in the RPE Is Associated with Increased Susceptibility to Oxidative Stress and AMD. *Autophagy* 10 (11): 1989–2005. <https://doi.org/10.4161/auto.36184>
12. *Markitantova YuV, Simirskii VN* (2020) Role of the Redox System in Initiation of a Regenerative Response of Neural Eye Tissues in Vertebrates. *Russ J Dev Biol* 51 (1): 16–30. <https://doi.org/10.1134/s106236042001004x>
13. *Grigoryan EN, Markitantova YV* (2016) Cellular and molecular preconditions for retinal pigment epithelium (RPE) natural reprogramming during retinal regeneration in Urodela. *Biomedicines* 4 (4): 28. <https://doi.org/10.3390/biomedicines4040028>
14. *Sousounis K, Bhavsar R, Looso M, Krüger M, Beebe J, Braun T, Tsonis PA* (2014) Molecular signatures that correlate with induction of lens regeneration in newts: lessons from proteomic analysis. *Hum Genomics* 8 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s40246-014-0022-y>
15. *Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D* (2012) Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 327 (1–2): 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
16. *Roehlecke C, Schumann U, Ader M, Brunssen C, Bramke S, Morawietz H, Funk RHW* (2013) Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation. *PLoS One* 8: e71570: 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071570>
17. *Cervellati F, Cervellati C, Romani A, Cremonini E, Sticozzi C, Belmonte G, Pessina F, Valacchi G* (2014) Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic Res* 48 (3): 303–312. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.867484>
18. *George SM, Lu F, Rao M, Leach LL, Gross JM* (2021) The retinal pigment epithelium: Development, injury responses, and regenerative potential in mammalian and non-mammalian systems. *Prog Retin Eye Res* 85: 100969. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100969>
19. *Caceres PS, Rodriguez-Boulan E* (2020) Retinal Pigment Epithelium Polarity in Health and Blinding Diseases. *Curr Opin Cel Biol* 62: 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.08.001>
20. *Kaemmerer E, Schutt F, Krohne TU, Holz FG, Kopitz J* (2007) Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (3): 1342–1347. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0549>

21. *Sinha D, Valapala M, Shang P, Hose S, Grebe R, Luty GA, Zigler Jr JS, Kaarniranta K, Handa JT* (2016) Lysosomes: regulators of autophagy in the retinal pigmented epithelium. *Exp Eye Res* (144): 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.08.018>
22. *Zadto A, Ito S, Sarna M, Wakamatsu K, Mokrzyński K, Sarna T* (2020) The role of hydrogen peroxide and singlet oxygen in the photodegradation of melanin. *Photochem Photobiol Sci* (19): 654–667. <https://doi.org/10.1039/C9PP00481E>
23. *Pan WW, Wubben TJ, Besirli CG* (2021) Photoreceptor metabolic reprogramming: current understanding and therapeutic implications. *Commun Biol* 4 (1): 245. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01765-3>
24. *Masutomi K, Chen C, Nakatani K, Koutalos Y* (2012) All-trans retinal mediates light-induced oxidation in single living rod photoreceptors. *Photochem Photobiol* 88 (6): 1356–1361. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01129.x>
25. *Kaarniranta K, Koskela A, Felszeghy S, Kivinen N, Salmiinen A, Kauppinen A* (2019) Fatty acids and oxidized lipoproteins contribute to autophagy and innate immunity responses upon the degeneration of retinal pigment epithelium and development of age-related macular degeneration. *Biochimie* 159: 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.010>
26. *Sparrow JR, Hicks D, Hamel C* (2010) The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* (10): 802–823. <https://doi.org/10.2174/156652410793937813>
27. *Zhang ZY, Sun YJ, Song JY, Fan B, Li G-Yu* (2021) Experimental models and examination methods of retinal detachment. *Brain Res Bull* (169): 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.01.004>
28. *Erler P, Monaghan JR* (2015) The link between injury-induced stress and regenerative phenomena: A cellular and genetic synopsis. *Biochim Biophys Acta* 1849 (4): 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.021>
29. *Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, Greenwood J, Luthert PJ, Cheetham ME* (2004) Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (2): 675–684. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0351>
30. *Hua J, Chen H, Chen Y, Zheng G, Li F, Qu J, Ma X, Hou L* (2018) MITF acts as an anti-oxidant transcription factor to regulate mitochondrial biogenesis and redox signaling in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 170: 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.02.023>
31. *Ray PD, Huang BW, Tsuji Y* (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24 (5): 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
32. *Lacy F, Gough DA, Schmid-Schonbein GW* (1998) Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 25 (6): 720–727. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00154-3)
33. *Guerra MH, Yumnamcha T, Singh LP, Ibrahim AS* (2021) Relative Contribution of Different Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Components to the Retinal Pigment Epithelium Barrier Function: Implications for RPE-Related Retinal Diseases. *Int J Mol Sci* 22 (15): 8130. <https://doi.org/10.3390/ijms22158130>
34. *Usui S, Oveson BC, Iwase T, Lu L, Lee SY, Jo Y-J, Wu Z, Choi E-Y, Samulski RJ, Campochiaro PA* (2011) Overexpression of SOD in retina: need for increase in H₂O₂-detoxifying enzyme in same cellular compartment. *Free Radic Biol Med* 51 (7): 1347–1354. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.010>
35. *Brennan AM, Suh SW, Won SJ* (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12 (7): 857–863. <https://doi.org/110.1038/nn.2334>
36. *Buvelot H, Jaquet V, Krause KH* (2019) Mammalian NADPH Oxidases. In: Knaus U, Leto T (eds) *NADPH Oxidases. Methods Mol Biol* 1982: 17–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9424-3_2
37. *Massari M, Nicoll CR, Marchese S, Mattevi A, Mascotti ML* (2022) Evolutionary and structural analyses of the NADPH oxidase family in eukaryotes reveal an initial calcium dependency. *Redox Biol* 56: 102436. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102436>
38. *Boulton M, Dontsov A, Jarvis-Evans J, Ostrovsky M, Svis-tunenko D* (1993) Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. *J Photochem Photobiol Biol* 19: 201–204. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87085-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87085-2)
39. *Dontsov AE, Sakina NL, Ostrovsky MA* (2017) Loss of melanin by eye retinal pigment epithelium cells is associated with its oxidative destruction in melanolipofuscin granules. *Biochemistry (Moscow)* 82: 916–924. <https://doi.org/10.1134/S0006297917080065>
40. *Dontsov AE, Sakina NL, Koromylova AD, Ostrovsky MA* (2015) Effect of UV radiation and hydrogen peroxide on the antiradical and antioxidant activities of DOPA-melanin and melanosomes from retinal pigment epithelial cells. *Russian Chemical Bulletin* 64: 1623–1628. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-1051-y>
41. *Shamsi FA, Boulton M* (2001) Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 3041–3046.
42. *Lismont C, Revenco, I, Fransen M* (2019) Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 20: 3673. <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>
43. *Camoës F, Islinger M, Guimarães SC, Kilaru S, Schuster M, Godinho LF, Steinberg G, Schrader M* (2015) New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and -dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 1853 (1): 111–125. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00261>
44. *Zhang SX, Sanders E, Fliesler SJ, Wang JJ* (2014) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. *Exp Eye Res* (125): 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.015>
45. *Shao X, Guha S, Lu W, Campagno KE, Beckel JM, Mills JA, Yang W, Mitchell CH* (2020) Polarized Cytokine Release Triggered by P2X7 Receptor from Retinal Pigmented Epithelial Cells Dependent on Calcium Influx. *Cells* 9 (12): 2537. <https://doi.org/10.3390/cells9122537>

46. *Bazan NG* (2006) Survival signaling in retinal pigment epithelial cells in response to oxidative stress: significance in retinal degenerations. *Adv Exp Med Biol* 572: 531–540.
https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9_74
47. *Newman AM, Gallo NB, Hancox LS, Miller NJ, Radeke CM, Maloney M, Cooper JB, Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Radeke MJ* (2012) Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med* 4 (16): 1–18.
48. *Zhang M, Jiang N, Chu Y, Postnikova O, Varghese R, Horvath A, Cheema AK, Golestaneh N* (2020) Dysregulated metabolic pathways in age-related macular degeneration. *Sci Rep* (10): 2464.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59244-4>
49. *Voigt AP, Mulfaul K, Mullin NK, Flamme-Wiese MJ, Giacalone JC, Stone EM, Tucker BA, Scheetz TE, Mullins RF* (2019) Single-cell transcriptomics of the human retinal pigment epithelium and choroid in health and macular degeneration. *Proc Nat Acad Sci USA* 116 (48): 24100–24107.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1914143116>
50. *Meyer JG, Garcia TY, Birgit Schilling B, Gibson Bradford W, Lamba DA* (2019) Proteome and Secretome Dynamics of Human Retinal Pigment Epithelium in Response to Reactive Oxygen Species. *Sci Rep* 9: 15440.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51777-7>
51. *Jin HL, Jeong KW* (2022) Transcriptome Analysis of Long-Term Exposure to Blue Light in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Biomol Ther (Seoul)* 30: 291–297.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.155>
52. *Shao Z, Chwa M, Atilano SR, Park J, Karageozian H, Karageozian V, Kenney MC* (2022) The Transcriptome Profile of Retinal Pigment Epithelium and Müller Cell Lines Protected by Risuteganib Against Hydrogen Peroxide Stress. *J Ocul Pharmacol Ther* 38 (7): 513–526.
<https://doi.org/10.1089/jop.2022.0015>
53. *Maher J, Yamamoto M* (2010) The rise of antioxidant signaling—the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 244 (1): 4–15.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.01.011>
54. *Fuse Y, Kobayashi M* (2017) Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Molecules* 22 (3):436.
<https://doi.org/10.3390/molecules22030436>
55. *Holmström KM, Baird L, Zhang Y, Hargreaves I, Chalasani A, Land JM, Stanyer L, Yamamoto M, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY* (2013) Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol Open* 2 (8): 761–770.
<https://doi.org/10.1242/bio.20134853>
56. *Gacesa R, Dunlap WC, Barlow DJ, Laskowski RA, Long PF* (2016) Rising levels of atmospheric oxygen and evolution of Nrf2. *Sci Rep* 6: 27740.
<https://doi.org/10.1038/srep27740>
57. *Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L* (2020) An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* 25 (22): 5474.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
58. *Rada P, Rojo AI, Evrard-Todeschi N, Innamorato NG, Cotte A, Jaworski T, Tobon-Velasco JC, Devijver H, Garcia-Mayoral MF, Van Leuven F, Hayes JD, Bertho G, Cuadrado A* (2012) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP axis. *Mol Cell Biol* 32: 3486–3499.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029>
59. *Wang M, Wang Q, Wang Z, Wang Q, Zhang X, Pan Y* (2013) The Molecular Evolutionary Patterns of the Insulin/FOXO Signaling Pathway. *Evol Bioinform* 9: 1–16.
<https://doi.org/10.4137/EBO.S105>
60. *Boas SM, Joyce KL, Cowell RM* (2021) The NRF2-Dependent Transcriptional Regulation of Antioxidant Defense Pathways: Relevance for Cell Type-Specific Vulnerability to Neurodegeneration and Therapeutic Intervention. *Antioxidants (Basel)* 11 (1): 8.
<https://doi.org/10.3390/antiox11010008>
61. *Raghunath A, Nagarajan R, Sundarraj K, Panneerselvam L, Perumal E* (2018) Genome-wide identification and analysis of Nrf2 binding sites - Antioxidant response elements in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 360: 236–248.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.013>
62. *Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M* (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 7: 11624. 1–14.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11624>
63. *Nagara S, Noverala SM, Trudler D, Lopez KM, McKercher SR, Han X, Yates JR, Piña-Crespo JC, Nakanishi N, Satoh T, Okamoto S-I, Lipton SA* (2017) MEF2D haploinsufficiency downregulates the NRF2 pathway and renders photoreceptors susceptible to light-induced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 114 (20): E4048–E4056.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1613067114>
64. *Gureev AP, Popov VN, Starkov AA* (2020) Crosstalk between the mTOR and Nrf2/ARE signaling pathways as a target in the improvement of long-term potentiation. *Exp Gerontol* 328: 113285.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113285>
65. *Zhao Z, Chen Y, Wang J, Sternberg P, Freeman ML, Grossniklaus HE, Cai J* (2011) Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One* 6 (e19456): 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019456>
66. *Han S, Chen J, Hua J, Hu X, Jian S, Zheng G, Wang J, Li H, Yang J, Hejtmancik JF, Qu J, Ma X, Hou L* (2020) MITF protects against oxidative damage-induced retinal degeneration by regulating the NRF2 pathway in the retinal pigment epithelium. *Redox Biol* 34: 101537. 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101537>
67. *Kandel ER* (2012) The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* (5): 14. <http://www.molecularbrain.com/content/5/1/14>.
68. *Katsuoka F, Yamamoto M* (2016) Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene* 586: 197–205.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.058>
69. *Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M* (2015) Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy* 11 (6): 867–880.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034410>

70. Pajares M, Jiménez-Moreno N, García-Yagüe AJ, Escoll M, de Ceballos ML, Leuven FV, Rábano A, Yamamoto M, Rojo AI, Cuadrado A (2016) Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy* 12 (10): 1902–1916. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1208889>
71. Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar AP, Sethi G, Perumal E (2018) Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol* 17: 297–314. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.002>
72. L'honoré A, Drouin J, Buckingham M, Montarras D (2014) Pitx2 and Pitx3 transcription factors: two key regulators of the redox state in adult skeletal muscle stem cells and muscle regeneration. *Free Radic Biol Med* 75. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.781>
73. Yang S, Zhou J, Li D (2021) Functions and Diseases of the Retinal Pigment Epithelium. *Front. Pharmacol* 12: 727870. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.727870>
74. Karpukhina A, Galkin I, Ma Y, Dib C, Zinovkin R, Plet-jushkina O, Chernyak B, Popova E, Vassetzky Y (2021) Analysis of genes regulated by DUX4 via oxidative stress reveals potential therapeutic targets for treatment of facioscapulohumeral dystrophy. *Redox Biol* 43: 102008. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102008>
75. Li Z, Dong X, Liu H, Chen X, Shi H, Fan Y, Hou D, Zhang X (2013) Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. *Mol Vis* 19: 1656–1666. <http://www.molvis.org/molvis/v19/1656>
76. Chapple SJ, Siow RC, Mann GE (2012) Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol* 44 (8): 1315–1320. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.021>
77. Zha X, Wu G, Zhao X, Zhou L, Zhang H, Li J, Ma L, Zhang Y (2015) PRDX6 Protects ARPE-19 Cells from Oxidative Damage via PI3K/AKT Signaling. *Cell Physiol Biochem* 36 (6): 2217–2228. <https://doi.org/10.1159/000430186>
78. Chatzidimitriou E, Bisaccia P, Corrà F, Bonato M, Irato P, Manuto L, Toppo S, Bakiu R, Santovito G (2020) Copper/Zinc Superoxide Dismutase from the Crocodile Icefish *Chionodraco hamatus*: Antioxidant Defense at Constant Sub-Zero Temperature. *Antioxidants (Basel)* 9 (4): 325. <https://doi.org/10.3390/antiox9040325>
79. Sreekumar PG, Ferrington DA, Kannan R (2021) Glutathione Metabolism and the Novel Role of Mitochondrial GSH in Retinal Degeneration. *Antioxidants (Basel)* 10 (5): 661. <https://doi.org/10.3390/antiox10050661>
80. Imamura Y, Noda S, Hashizume K, Shinoda K, Yamaguchi M, Uchiyama S, Shimizu T, Mizushima Y, Shirasawa T, Tsubota K (2006) Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (30): 11282–11287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602131103>
81. Justilien V, Pang J-J, Renganathan K Zhan X, Crabb JW, Kim SR, Sparrow JR, Hauswirth WW, Lewin AS (2007) SOD2 knockdown mouse model of early AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (10): 4407–4420. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0432>
82. Khandhadia S, Lotery A (2010) Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Exp Rev Mol Med* 12: e34. <https://doi.org/10.1017/S146239941000164X>
83. Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, Yanagi Y (2012) Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. *J Biol Chem* 287 (10): 7675–7682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335174>
84. Hartong DT, Dange M, McGee TL, Berson EL, Dryja TP, Colman RF (2008) Insights from retinitis pigmentosa into the roles of isocitrate dehydrogenases in the Krebs cycle. *Nat Genet* 40 (10): 1230–1234. <https://doi.org/10.1038/ng.223>
85. Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Rauzei G, Symons M, Borrello, Galeotti, Ramponi G (2003) Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol* 161 (5): 933–944. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211118>
86. Karlsson M, Frennesson C, Gustafsson T, Brunk UT, Nilsson SEG, Kurz T (2013) Autophagy of iron-binding proteins may contribute to the oxidative stress resistance of ARPE-19 cells. *Exp Eye Res* 116: 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.10.014>
87. Rozanowski B, Burke JM, Boulton ME, Sarna T, Róžanowska M (2008) Human RPE melanosomes protect from photosensitized and iron-mediated oxidation but become pro-oxidant in the presence of iron upon photodegradation. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 49 (7): 2838–2847. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1700>
88. Ostrovsky MA, Sakina NL, Dontsov AE (1987) An antioxidative role of ocular screening pigments. *Vision Res* 27 (6): 893–899. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(87\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0042-6989(87)90005-8)
89. Richardson DR, Lane DJR, Becker EM, Huang ML-H, Whitnall M, Rahmanto YS, Sheftel AD, Ponka P (2010) Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (24): 10775–10782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912925107>
90. Lu H, Hunt DM, Ganti R, Davis A, Dutt K, Alam J, Hunt RC (2002) Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress. *Exp Eye Res* 74 (1): 83–92. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1101>
91. Guirola M, Pérez-Rafael S, Capdevila M, Palacios O, Atrian S (2012) Metal dealing at the origin of the Chordata phylum: the metallothionein system and metal overload response in amphioxus. *PLoS One* 7 (8): e43299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043299>
92. Bonilha VL (2018) Oxidative Stress Regulation and DJ-1 Function in the Retinal Pigment Epithelium: Implications for AMD. *Adv Exp Med Biol* 1074: 3–9. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_1

93. Bergwik J, Kristiansson A, Allhorn M, Gram Magnus, Åkerström B (2021) Structure, Functions, and Physiological Roles of the Lipocalin α 1-Microglobulin (A1M). *Front Physiol* 12: 645650. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.645650>
94. Kaarniranta K, Salminen A, Eskelinen E-L, Kopitz J (2009) Heat shock proteins as gatekeepers of proteolytic pathways—Implications for age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res Rev* 8 (2): 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.01.001>
95. Haslbeck M, Vierling E (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* 427 (7): 1537–1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
96. Zhou P, Kannan R, Spee C, Sreekumar PG, Dou G, Hinton DR (2014) Protection of retina by α B crystallin in sodium iodate induced retinal degeneration. *PLoS One* 9: e98275: 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098275>
97. Strunnikova N, Baffi J, Gonzalez A, Silk W, Cousins SW, Csaky KG (2001) Regulated heat shock protein 27 expression in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (9): 2130–2138.
98. Conrad M, Kagan VE, Bayir H, Pagnussat GC, Head B, Traber MG, Stockwell BR (2018) Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes Dev* 32 (9-10): 602–619. <https://doi.org/10.1101/gad.314674.118>
99. Ryhanen T, Hyttinen JMT, Kopitz J, Rilla K, Kuusisto E, Mannerman E, Viiri J, Holmberg CI, Immonen I, Meri S, Parkkinen J, Eskelinen E-L, Hannu U, Salminen A, Kaarniranta K (2009) Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cells. *J Cell Mol Med* 13 (9B): 3616–3631. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00577.x>
100. Song L, Li C, Xie Y, Liu S, Zhang J, Yao J, Jiang C, Li Y, Liu Z (2016) Genome-wide identification of Hsp70 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* 49: 154–62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.009>
101. Arunkumar R, Gorusupudi A, Bernstein PS (2020) The macular carotenoids: A biochemical overview. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1865 (11): 158617. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158617>
102. Yin J, Thomas F, Lang JC, Chaum E (2011) Modulation of oxidative stress responses in the human retinal pigment epithelium following treatment with vitamin C. *J Cell Physiol* 226 (8): 2025–2032. <https://doi.org/10.1002/jcp.22532>
103. Duque P, Vieira CP, Bastos B, Vieira J (2022) The evolution of vitamin C biosynthesis and transport in animals. *BMC Ecol Evol* 22 (1): 84. <https://doi.org/10.1186/s12862-022-02040-7>
104. van der Vliet A, Janssen-Heininger YM (2014) Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem* 115 (3): 427–435. <https://doi.org/10.1002/jcb.24683>
105. Giansanti V, Villalpando Rodriguez GE, Savoldelli M, Gioia R, Forlino A, Mazzini G, Pennati M, Zaffaroni N, Scovassi AI, Torriglia A (2013) Characterization of stress response in human retinal epithelial cells. *J Cell Mol Med* 17 (1): 103–115. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01652.x>
106. Tummers B, Green DR (2022) The evolution of regulated cell death pathways in animals and their evasion by pathogens. *Physiol Rev* 102 (1): 411–454. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2021>
107. Cui J, Zhao S, Li Y, Zhang D, Wang B, Xie J, Wang J (2021) Regulated cell death: discovery, features and implications for neurodegenerative diseases. *Cell Commun Signal* 19 (1): 120. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00799-8>
108. Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, Fischer H, Tschachler E (2008) Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol* (5): 831–841. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn012>
109. Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H (2007) Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40 (1): 1–6. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2007.40.1.001>
110. Lu L, Hackett S.F, Mincey A, Lai H, Campochiaro PA (2006) Effects of different types of oxidative stress in RPE cells. *J Cell Physiol* 206 (1): 119–125. <https://doi.org/10.1002/jcp.20439>
111. Wu W-C, Hu D-N, Gao H-X, Chen M, Wang D, Rosen R, McCormick SA (2010) Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced production of interleukin-6 by retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 16: 1864–1873.
112. Xu XZ, Tang Y, Cheng LB, Yao J, Jiang Q, Li -R, Zhen Y-F (2019) Targeting Keap1 by miR-626 protects retinal pigment epithelium cells from oxidative injury by activating Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med* 143: 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.024>
113. Cano M, Datta S, Wang L, Liu T, Flores-Bellver M, Sachdeva M, Sinha D, Handa JT (2021) Nrf2 deficiency decreases NADPH from impaired IDH shuttle and pentose phosphate pathway in retinal pigmented epithelial cells to magnify oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction. *Aging Cell* 20: Article ID e13444 1–15. <https://doi.org/10.1111/accel.13444>
114. Ye S-S, Tang Y, Song J-T (2021) ATP and Adenosine in the Retina and Retinal Diseases. *Front Pharmacol* 12 (654445): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.654445>
115. Yang D, Elner SG, Clark AJ, Hughes BA, Petty HR, Elner VM (2011) Activation of P2X Receptors Induces Apoptosis in Human Retinal Pigment Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (3): 1522–1530. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6172>
116. Luthra S, Fardin B, Dong J, Hertzog D, Kamjoo S, Gebremariam S, Butani V, Narayanan R, Mungcal JK, Kuppermann BD, Kenney MCr (2006) Activation of Caspase-8 and Caspase-12 Pathways by 7-Ketocholesterol in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (12): 5569–5575. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0333>

117. *Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solarly E, Garrido C* (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2 (9): 645–652.
<https://doi.org/10.1038/35023595>
118. *Nita M, Grzybowski A* (2020) Interplay between reactive oxygen species and autophagy in the course of age-related macular degeneration. *EXCLI J* (19): 1353–1371.
<https://doi.org/10.17179/excli2020-2915>
119. *Tang B, Cai J, Sun L, Li Y, Qu J, Snider BJ, Wu S* (2014) Proteasome inhibitors activate autophagy involving inhibition of PI3K-Akt-mTOR pathway as an anti-oxidation defense in human RPE cells. *PLoS One* 9 (7): e103364: 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103364>
120. *Morescalchi F, Duse S, Gambicorti E, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F* (2013) Proliferative Vitreoretinopathy after Eye Injuries: An Overexpression of Growth Factors and Cytokines Leading to a Retinal Keloid. *Mediators Inflamm* 2013 (269787): 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2013/269787>
121. *Bian Z-M, Elner SG, Elner VM* (2007) Regulation of VEGF mRNA Expression and Protein Secretion by TGF- β 2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Exp Eye Res* 84 (5): 812–822.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.12.016>
122. *Pollreisz A, Afonyushkin T, Oskolkova OV, Gruber F, Bochkov VN, Schmidt-Erfurth U* (2013) Retinal pigment epithelium cells produce VEGF in response to oxidized phospholipids through mechanisms involving ATF4 and protein kinase CK2. *DOI: Comparative Study. Exp Eye Res* (116): 177–184.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.08.021>
123. *Grigoryan EN, Novikova YP, Gancharova OS, Philipov PP* (2012) New antioxidant SkQ1 is an effective protector of rat eye retinal pigment epithelium and choroid under conditions of long term organotypic cultivation. *Adv Aging Res* 1 (2): 31–37.
<https://doi.org/10.4236/aar.2012.12004>
124. *Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, Kunjukunju N, Koulen P* (2014) Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina. *Int J Mol Sci* 15 (2): 1865–1886.
<https://doi.org/10.3390/ijms15021865>
125. *Hsueh Y-J, Chen Y-N, Tsao Y-T, Cheng C-M, Wu W-C, Chen H-C* (2022) The Pathomechanism, Antioxidant Biomarkers, and Treatment of Oxidative Stress-Related Eye Diseases. *Int J Mol Sci* 23: 1255.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031255>
126. *Cho Y-K, Lee S-M, Kang Y-J, Kang Y-M, Jeon I-C, Park D-H* (2022) The Age-Related Macular Degeneration (AMD)-Preventing Mechanism of Natural Products. *Processes* 10 (4): 678.
<https://doi.org/10.3390/pr10040678>
127. *Grebowski J, Kazmierska P, Krokosz A* (2013) Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. *BioMed Res Int* 2013: 751913.
<https://doi.org/10.1155/2013/751913>
128. *Josifovska N, Albert R, Nagymihály R, Lyrvynchuk L, Moe MC, Kaarniranta K, Veréb ZJ, Petrovski G* (2020) Resveratrol as Inducer of Autophagy, Pro-Survival, and Anti-Inflammatory Stimuli in Cultured Human RPE Cells. *Int J Mol Sci* 21: 813.
<https://doi.org/10.3390/ijms21030813>
129. *Biswal R, Justis BD, Han P, Li H, Gierhart D, Dorey Cheryl K, Lewin AS* (2018) Daily zeaxanthin supplementation prevents atrophy of the retinal pigment epithelium (RPE) in a mouse model of mitochondrial oxidative stress. *PLoS One* 13 (9): e0203816.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203816>
130. *Qin S, McLaughlin AP, De Vries GW* (2006) Protection of RPE cells from oxidative injury by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ by augmenting GSH and activating MAPK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (47): 5098–5105.
<https://doi.org/10.1167/iovs.06-0318>
131. *Jitsanong T, Khanobdee K, Piyachaturawat P, Wongprasert K* (2011) Diarylheptanoid 7-(3,4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death. *Toxicol In Vitro* 25 (1): 167–176.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.10.014>
132. *Nakamura S, Hayashi K, Takizawa H, Murase T, Tsuruma K, Shimazawa M, Kakuta H, Nagasawa H, Hara H* (2011) An arylidene-thiazolidinedione derivative, GPU-4, without PPAR γ activation, reduces retinal neovascularization. *Curr Neurovasc Res* 8 (1): 25–34.
<https://doi.org/10.2174/156720211794520224>
133. *Chen M, Wang J, Yang Y, Zhong T, Zhou P, Ma H, Li J, Li D, Zhou J, Xie S, Liu M* (2021) Redox dependent Regulation of End-Binding Protein 1 Activity by Glutathionylation. *Sci China Life Sci* 64 (4): 575–583.
<https://doi.org/10.1007/s11427-020-1765-6>
134. *Ciesielska S, Slezak-Prochazka I, Bil P, Rzeszowska-Wolny J* (2021) Micro RNAs in Regulation of Cellular Redox Homeostasis. *Int J Mol Sci* 22 (11): 6022.
<https://doi.org/10.3390/ijms22116022>
135. *Intartaglia D, Giamundo G, Conte I* (2021) The Impact of miRNAs in Health and Disease of Retinal Pigment Epithelium. *Front Cell Dev Biol* 8: 589985.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.589985>
136. *Hadziahmetovic M, Song Y, Wolkow N, Iacovelli J, Grieco S, Lee J, Lyubarsky A, Pratico D, Connelly J, Spino M, Harris ZL, Dunaief JL* (2011) The oral iron chelator deferiprone protects against iron overload-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (2): 959–968.
<https://doi.org/10.1167/iovs.10-6207>
137. *Wu L, Tan X, Liang L, Zhang D, Kijlstra A, Yang P* (2017) The Role of Mitochondria-Associated Reactive Oxygen Species in the Amyloid β Induced Production of Angiogenic Factors by ARPE-19 Cells. *Curr Mol Med* 17 (2): 140–148.
<https://doi.org/10.2174/1566524017666170331162616>
138. *Wu J, Cui D, Li H, Zeng J* (2022) Protective effects of NAC and salubrinal on apoptosis of retinal pigment epithelial cells induced by all-trans retinoic acid. *Eur J Ophthalmol* 32 (1): 395–401.
<https://doi.org/10.1177/11206721211000674>
139. *Cheng L, Yu H, Yan N, Lai K, Xiang M* (2017) Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha Target Genes Contribute to Retinal Neuroprotection. *Front Cell Neurosci* 11: 20.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00020>

140. Liu J, Lu W, Reigada D, Nguyen J, Laties AM, Mitchell CH (2008) Restoration of Lysosomal pH in RPE Cells from Cultured Human and ABCA4(–/–) Mice: Pharmacologic Approaches and Functional Recovery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 (2): 772–780. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0675>
141. Pavan B, Capuzzo A, Forlani G (2014) High glucose-induced barrier impairment of human retinal pigment epithelium is ameliorated by treatment with Goji berry extracts through modulation of cAMP levels. *Exp Eye Res* (120): 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.12.006>
142. Alcazar O, Cousins SW, Marin-Castano ME (2007) MMP-14 and TIMP2 Overexpression Protects Against Hydroquinone-Induced Oxidant Injury in RPE: Implications for Extracellular Matrix Turnover. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (12): 5662–5670. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0392>
143. Chong C-M, Zheng W (2016) Artemisinin Protects Human Retinal Pigment Epithelial Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage through Activation of ERK/CREB Signaling. *Redox Biol* 9: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.06.002>
144. Patel AK, Hackam AS (2013) Toll-like Receptor 3 (TLR3) Protects Retinal Pigmented Epithelium (RPE) Cells from Oxidative Stress through a STAT3-Dependent Mechanism. *Mol Immunol* 54 (2): 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.11.005>
145. Dorion M-F, Mulumba M, Kasai S, Itoh K, Lubell WD, Ong H (2021) The CD36 Ligand-Promoted Autophagy Protects Retinal Pigment Epithelial Cells from Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2021: 6691402. <https://doi.org/10.1155/2021/6691402>
146. Barbosa KY, Chang J, Lal M, Bharti K (2017) The Role of Oxidative Stress Pathway in RPE Epithelial to Mesenchymal Transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58: 3010.
147. Grigoryan EN, Markitantova YuV (2021) Molecular Strategies for Transdifferentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells in Amphibians and Mammals *In Vivo*. *Russ J Devel Biol* 52 (4): 220–243. <https://doi.org/10.1134/S106236042104003>
148. Carbonell-MB, Zapata Cardona J, Delgado JP (2022) Post-amputation reactive oxygen species production is necessary for axolotl limb regeneration. *Front Cell Dev Biol* 10: 921520. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.921520>
149. Hameed LS, Berg DA, Belnoue L, Jensen LD, Cao Y, Simon A (2015) Environmental changes in oxygen tension reveal ROS-dependent neurogenesis and regeneration in the adult newt brain. *Elife* 4: e08422. <https://doi.org/10.7554/eLife.08422.001>
150. Rieger S, Sagasti A (2011) Hydrogen peroxide promotes injury induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS Biol* 9 (5): e1000621. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000621>
151. Rossnerova A, Izzotti A, Pulliero A, Bast A, Rattan SIS, Rossner P (2020) The Molecular Mechanisms of Adaptive Response Related to Environmental Stress. *Int J Mol Sci* 21 (19): 7053. <https://doi.org/10.3390/ijms21197053>
152. de Sousa AA, Todorov OS, Proulx MJ (2022) A natural history of vision loss: Insight from evolution for human visual function. *Neurosci Biobehav Rev* 134: 104550. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104550>

CONSERVATION AND VARIABILITY OF THE ANTIOXIDANT PROTECTION SYSTEM OF THE RETINAL PIGMENT EPITHELIA IN VERTEBRATES

Yu. V. Markitantova^{a, #} and V. N. Simirskii^{a, ##}

^a*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

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

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

In the course of evolution and adaptation to life conditions, organisms have developed the strategies that allow to use of the reactive oxygen species (ROS) in regulation of physiological processes and in maintenance of homeostasis. Retinal pigment epithelium (RPE) is one of the prime examples of tissues with a high level of metabolism and intracellular ROS, that have the more risk of damage after oxidative stress (OS), under the influence of exogenous or endogenous stress factors. Vertebrate RPE cells, despite the conservatism of the eye tissue structures and their main functions, respond differently to OS are due to the taxon-species specificity of the components of signaling pathways that form the antioxidant defense system (AODS). Transcription factors, in particular, Nrf2 play a key role in AODS. AODS in RPE includes the several levels of regulation, interaction of which ensures the stability of morphofunctional state of the cells. Phylogenetic analysis of the key components of AODS in various vertebrates revealed not only conservation, but also variability in the protein domain organization. This may reflect the differences in functions, adaptability and regenerative potential. The identification of AODS mechanisms that ensure the morphofunctional stability of RPE cells is of fundamental importance and is aimed at finding tissue-specific targets for effective treatment of a spectrum of eye diseases.

Keywords: redox balance, homeostasis, retinal pigment epithelium, reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidant defense system, transcription factors, Nrf2, regeneration, RPE cell response strategies

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ШОКА НА РАЗМЕРЫ И АКТИВНОСТЬ
ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ *SCORPAENA PORCUS* (LINNAEUS, 1758)
(ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VITRO*)**

© 2023 г. Н. Е. Шалагина^{1,*}, А. А. Солдатов¹, Ю. В. Богданович¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр
“Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН”, Севастополь, Россия

*e-mail: nadezda-shalagina@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

В условиях эксперимента *in vitro* исследовали влияние холодого шока на эритроциты морского ерша (*Scorpaena porcus* L., 1758). Образцы крови содержали при 22°C (контроль) и 4°C (опыт) (градиент 18°C). Экспозиция составляла 3 ч. Холодовой шок не оказывал значимого влияния на показатели жизнедеятельности эритроцитов морского ерша. Клетки сохраняли целостность цитоплазматических мембран, потенциал митохондрий и уровень окислительных процессов, о чем свидетельствовали постоянные значения интенсивности флуоресценции пропидиум йодида (PI), родамина123 (R123) и 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA). Основные изменения были связаны с формой эритроцита и функциональной активностью ядра. Клетки приобретали округлые очертания, размеры ядра увеличивались, что привело к росту ядерно-цитоплазматического отношения (NCR) на фоне снижения интенсивности флуоресценции SYBR Green I. Допускается, что это связано с изменением состояния цитоскелета и активизацией транскрипционных процессов.

Ключевые слова: эритроцит, холодого шок, морфометрия, проточная цитометрия, *Scorpaena porcus* L., 1758

DOI: 10.31857/S0044452923030087, **EDN:** YHVVCU

ВВЕДЕНИЕ

Влиянию холодого шока на организм низших позвоночных (рыбы, амфибии) за последние 10–15 лет посвящено значительное число работ. Свидетельством тому является появление двух крупных обзоров [1, 2]. Данный фактор ранее рассматривался исключительно как стрессорный. У многих организмов отмечали повышение концентрации в крови кортизола [3–6], который является молекулярным маркером стресса. Однако, как показали дальнейшие наблюдения, это затрагивало не всех пойкилотермов, особенно тех, которые обитали в водоемах (акваториях) с неустойчивым температурным режимом и подвергались периодическому действию гипотермии (мелководные водоемы, лагуны, прибрежный апвеллинг). Состояние холодого стресса для них не было характерно, несмотря на значительные температурные градиенты (10–15°C) [7, 8]. При этом в организме развивался комплекс процессов, направленных на компенсацию действия данного фактора. Мозг переходил на утилизацию лактата как питательного субстрата, в нем существенно повышалась активность лактатдегидрогеназы (LDH1) и цитратсинтазы [9]. В плазме

крови отмечали снижение концентрации глюкозы [10] на фоне роста уровня триацилглицеридов [4], что не характерно для состояния стресса. При этом осмолярность плазмы понижалась [11]. В скелетных мышцах усиливались процессы анаэробного гликолиза [12]. Количество эритроцитов и лейкоцитов в циркулирующей крови в большинстве случаев сохранялось на уровне прежних значений [7, 13].

Особо интересны были изменения, затрагивающие клеточные системы. Изменялась активность АТФаз, лактатдегидрогеназы, супероксидредуктазы, каталазы [14–16]. При этом реакция на холодого шок была тканеспецифична. Общим для всех тканей было увеличение содержания белков теплового (HSP) и холодого шока (CSP) [17, 18]. При этом авторами отмечалась роль HSP как молекулярных шаперонов, участвующих в сворачивании, репарации и расщеплении белков, поврежденных стрессорами и контроле уровня АФК в клетке [19].

Как видно, представленная информация не позволяет составить цельного представления о реакции клеточных систем пойкилотермов на условия

холодового шока, так как она получена для целого организма. Управляющие гуморальные сигналы, координирующие работу органов и тканей, делают эту реакцию дифференцированной (тканеспецифичной), о чем говорилось выше. В этом отношении могут быть интересны относительно автономные клеточные системы, которые на определенном отрезке клеточного цикла перестают быть зависимы от действия гуморальных факторов. К ним можно отнести зрелые эритроциты костистых рыб. Процесс созревания и дифференцировки эритроидных клеток у данной группы организмов происходит в головной почке в течение 2–3 мес после нереста и находится под контролем эритропоэтинов [20]. Затем они поступают в кровоток, где находятся до следующего нерестового периода. Продолжительность жизни этих клеток составляет 270–310 сут [21, 22]. Этот тип клеток используется как модель в ряде экспериментальных работ [23]. Они обладают развитыми системами переноса органических и неорганических ионов через клеточную мембрану, что позволяет осуществлять адаптивную регуляцию объема клетки [24]. У них обнаружены митохондрии, ферменты цикла Кребса [23, 25], что делает их функционально ближе к клеткам соматических тканей. Исследования по изучению влияния гипоксии на эритроциты морского ерша, проведенные в условиях *in vivo* и *in vitro*, дали близкие результаты, что свидетельствует об относительной автономности данных клеточных систем [26, 27].

В качестве объекта исследования нами выбран морской ерш *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758). Это эврибионтный донный вид, широко представленный по побережью Черного и Азовского морей [28]. Его популяции часто подвергаются действию прибрежного апвеллинга, который у берегов Крыма может наблюдаться 2–3 раза за сезон. Перепад температур при этом составляет 10–12°C. Для мелководных прибрежных акваторий (глубина 5–7 м) скачок температур еще более выражен – 18–19°C [29].

Цель работы – в условиях эксперимента *in vitro* исследовать влияние холодного шока на морфофункциональные показатели эритроцитов морского ерша.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал

Объектом исследования являлись образцы цельной крови взрослых особей морского ерша (*Scorpaena porcus* L., 1758) (длина тела 12–14 см, вес 90–114 г) в состоянии относительного функционального покоя (стадия зрелости гонад II–III).

Рыбу отлавливали ставным неводом в Мартыновой бухте (р-н Севастополя, Крым). Транспортировка осуществлялась в баках емкостью 50 л с применением воздушной аэрации на протяжении

всего времени перевозки. Особи проходили акклимацию к лабораторным условиям в течение 7 дней в аквариуме, имеющем систему естественного протока. Плотность посадки – не менее 10 л на особь. Режим освещения – искусственный (12 ч день: 12 ч ночь). На протяжении периода акклимации особей кормили фаршем из малоценных рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6–7% от массы тела. В экспериментах использовали подвижных активно питающихся рыб. Температура воды поддерживалась на уровне 20–22°C. Концентрация кислорода в воде не понижалась ниже 7.0 мг/л. Контроль за температурой и концентрацией кислорода осуществляли при помощи кислородомера ST300DRU (“Ohaus” США).

Экспериментальная схема

Перед отловом и отбором образцов крови применяли уретановую анестезию. Уретан растворяли в воде аквариума до финальных концентраций, которые были определены для морского ерша ранее [30].

Образцы крови в количестве 0.5–0.7 мл получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Рихтер, Венгрия). Полученные образцы делили на две равные доли, которые подвергали экспериментальной нагрузке. Одну содержали при исходных условиях – 22°C (контроль), другую – в холодильнике при 4°C (опыт). Экспозиция – 3 ч.

Лабораторная обработка проб

После инкубации изготавливали мазки крови, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма: Май-Грюнвальд (краситель-фиксатор на метиловом спирте) + Романовский-Гимза [31]. Их использовали для оценки морфометрических характеристик клеток красной крови.

Часть эритроцитарной массы трижды отмывали от плазмы с применением центрифугирования при 500 g в течение 5 мин: контроль при 20–22°C, опыт – 4–5°C. В работе применяли рефрижераторную центрифугу Eppendorf Centrifuge 5424 R. Клетки ресуспензировали в среде следующего состава: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM Tris, 2.2 mM D-glucose (pH 7.8) [32]. Полученные образцы использовали для проведения цитометрических исследований.

Определение морфометрических показателей

Мазки крови просматривали и фотографировали при помощи светооптического микроскопа Biomed PR-2 Lum, оборудованном камерой Levenhuk CNG Series. Линейные размеры клеток крови определяли по фотографиям в компьютерной программе ImageJ 1.44p [33]. При проведении морфо-

метрического анализа зрелых эритроцитов для каждой клетки определялось 4 линейных размера (длина большой и малой оси клетки, C_1 и C_2 ; длина большой и малой оси ядра, N_1 и N_2). На каждом препарате измерения выполнялись на 100 зрелых эритроцитах. Незрелые формы в расчет не принимались.

На основании полученных значений рассчитывали ряд морфофункциональных характеристик клеток красной крови. Показатель формы клетки (CSI) определяли по формуле (1):

$$CSI = \frac{C_1}{C_2}, \quad (1)$$

Объем клетки (V_c) с учетом объема ядра (V_n) определяли по формуле (2) [34], объем ядра определяли по формуле (3) [35] и толщину клетки (h) по формуле (3) [36]:

$$V_c = 0.7012 \left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right) h + V_n, \quad (2)$$

$$V_n = \frac{\pi \times N_1 \times N_2^2}{6}, \quad (3)$$

$$h = 1.8 + 0.0915(C_1 - 7.5). \quad (4)$$

Одновременно рассчитывали площадь поверхности клетки (S_c) по формуле (5) [35] и ее ядра (S_n) по формуле (6) [34]:

$$S_c = \frac{2\pi a^2 + 2\pi ab \sinh^{-1} e}{e}, \quad (5)$$

где

$$a = \frac{C_1 + C_2}{4}, \quad b = 0.67h, \quad e = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}, \quad (6)$$

$$S_n = 4\pi \left(\frac{2(N_1/2)^{1.6075} (N_2/2)^{1.6075} + (N_2/2)^{2 \times 1.6075}}{3} \right)^{1/1.6075}.$$

На основании полученных значений V_c и V_n определяли величину ядерно-цитоплазматического отношения (NCR) по формуле (7):

$$NCR = \frac{V_c}{V_n}, \quad (7)$$

и рассчитывали удельную поверхность эритроцитов (SS_c) и их ядер (SS_n) по формулам (8) и (9):

$$SS_c = \frac{S_c}{V_c}, \quad (8)$$

$$SS_n = \frac{S_n}{V_n}. \quad (9)$$

Проточная цитометрия

Все измерения цитометрических показателей эритроцитов проводились на проточном цитомет-

ре *Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA)*, оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Пробоподготовка проводилась в соответствии с лабораторным регламентом. Окраска проб предполагает одновременную фиксацию состояния клеток.

Для оценки однородности клеточной массы готовую суспензию эритроцитов окрашивали ДНК-красителем *SYBR Green I (Sigma Aldrich, США)*: финальная концентрация в пробе 10 мкл/л, время инкубации составляло 40 мин в темноте. Флуоресценцию красителя анализировали на канале *FL1* (экстинкция – 497 нм, эмиссия – 521 нм). Характер распределения клеток во взвеси классифицировали на основании их относительного размера: по величине прямого рассеяния FSC и бокового рассеяния SSC.

Способность эритроцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода оценивали по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (*DCF-DA, Sigma Aldrich, USA*). Для этого 1 мл суспензии эритроцитов инкубировали с 10 мкл раствора *DCF-DA* в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкл/л. Флуоресценцию красителя анализировали на канале *FL1* (экстинкция – 485 нм, эмиссия – 525 нм).

Изменения мембранного потенциала митохондрий (МПМ) в эритроцитах контролировали, оценивая интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных *R123 (Molecular Probes, USA)*. Эритроциты окрашивали *R123* в течение 40 мин. Концентрация красителя в пробе составляла 10 мкл/л. Интенсивность флуоресценции красителя определяли на канале *FL1* (экстинкция – 508 нм, эмиссия – 528 нм).

Долю поврежденных эритроцитов в суспензии при гипотермии анализировали, используя краситель *PI (Molecular Probes, USA)*. Окрашивание суспензии эритроцитов проводили в течение 30 мин. Конечная концентрация красителя – 10 мкл/л. Измерение интенсивности флуоресценции *PI* осуществляли в канале *FL2* (экстинкция – 535 нм, эмиссия – 617 нм).

Статистический анализ

Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как $M \pm m$. В работе использовали стандартный пакет *Grapher* (версия 11).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты морского ерша имеют эллипсоидную форму (рис. 1а). Цитоплазма ацидофильная, что определяется высоким содержанием гемоглобина. Ядро компактное, расположено у большинства эритроидных форм в центре клетки и также

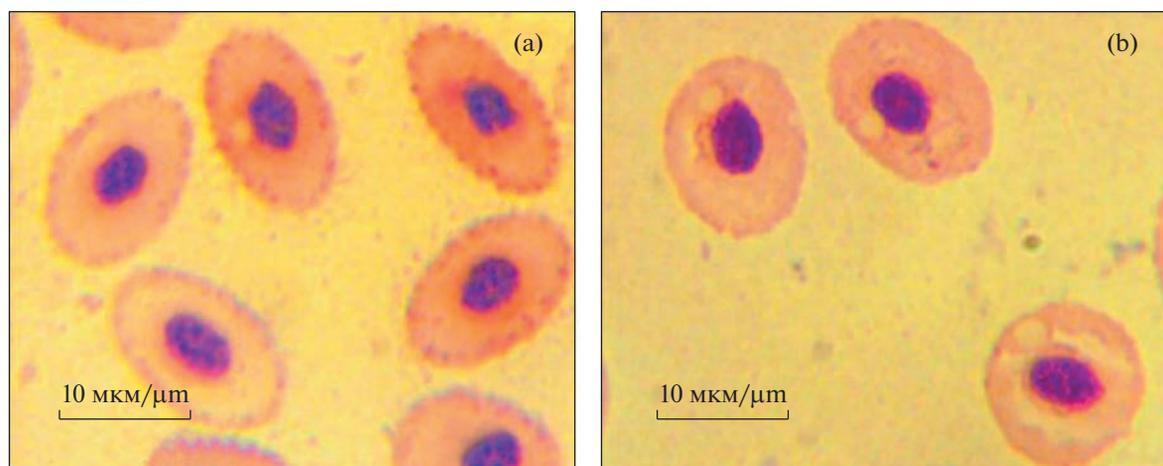


Рис. 1. Эритроциты циркулирующей крови морского ерша. (а) – контрольная группа (22°C), (б) – опытная группа (4°C); в условиях гипотермии клетки становились более округлыми; явно увеличивались значения C_2 и уменьшались значения C_1 .

имеет форму эллипса. Хроматин в значительной степени конденсирован (гетерохроматин), что отражает низкую функциональную активность данной структуры. В условиях холодного шока клетки явно приобретали более округлую форму (рис. 1b). Визуально отмечали и рост размеров ядра. Это нашло отражение в изменении морфометрических параметров клеток красной крови.

Морфометрические характеристики

Средняя длина большой оси эритроцитов (C_1) у образцов крови, находящихся при 22°C, составила 14.01 ± 0.17 мкм, малой оси (C_2) – 8.97 ± 0.13 мкм (рис. 2).

Инкубация при 4°C приводит к уменьшению C_1 на 5.9% ($p < 0.01$), и увеличению C_2 на 11.1% ($p < 0.01$). Показатель формы клетки (CSI) уменьшался почти на 17% ($p < 0.01$), т.е. эритроциты приобретали более округлую форму, что хорошо согласовывалось с результатами визуального наблюдения. При этом объем клеток (V_c) и их поверхностные характеристики (S_c , SS_c) не претерпевали статистически значимых изменений ($p > 0.05$).

Ядро эритроцитов, как уже отмечалось, имело эллипсоидную форму. Содержание гетерохроматина явно превалировало над уровнем эухроматина. Анализ метрических характеристик ядер у образцов, содержащихся при 22°C, дал следующие результаты: длина большой оси ядра (N_1) составила 5.10 ± 0.06 мкм, малой оси ядра (N_2) – 3.26 ± 0.05 мкм (рис. 3).

Инкубация проб крови при 4°C приводила к изменению значений N_2 . Они увеличивались на 7.6% ($p < 0.01$). Рост N_1 не был статистически выражен ($p > 0.05$). Это происходило на фоне значимого роста объема (V_n) и площади поверхности (S_n) ядер

клеток соответственно на 16.8% и 10.2% ($p < 0.01$). Закономерные изменения претерпевала и удельная поверхность данной структуры (SS_n).

В целом можно констатировать опережающий рост объема ядер эритроцитов при 4°C по отношению к их клеточному объему. Величина ядерно-цитоплазматического отношения (NCR) увеличилась на 15.2% ($p < 0.01$) (рис. 3).

Проточная цитометрия

Сравнение состояния эритроцитов, находящихся в образцах крови при 22°C и 4°C, показало однозначное снижение интенсивности флуоресценции *SYBR Green I*. Различия составили 14% ($p < 0.01$) (рис. 4a). Эритроцитарная масса сохраняла однородность, что видно из характера распределения клеток по величинам прямого (FSC) и бокового рассеивания (SSC). Принципиальных отличий в интенсивности флуоресценции *R123* и *DCF-DA* между образцами крови (при 22°C и 4°C) не отмечали (рис. 4b, c) ($p > 0.05$). То же можно сказать и в отношении PI (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из представленных результатов исследования влияния холодного шока на ядерные эритроциты морского ерша следует обратить внимание на следующие моменты:

- в условиях холодного шока клетки красной крови приобретали округлую форму без значимых изменений их объема и площади поверхности;
- гипотермия сопровождалась существенным увеличением объема клеточных ядер, ростом NCR на фоне понижения интенсивности флуоресценции *SYBR Green I*;

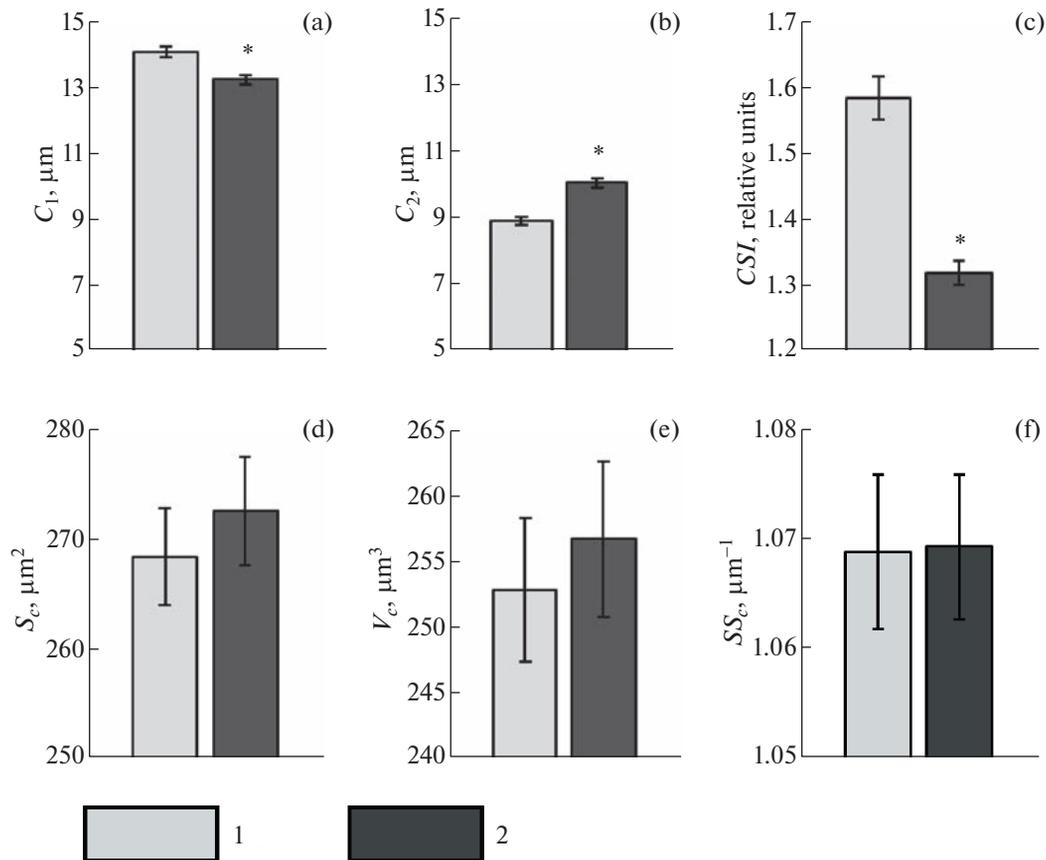


Рис. 2. Морфометрические характеристики эритроцитов циркулирующей крови морского ерша. 1 – контрольная группа (22°C), 2 – опытная группа (4°C); (a) – размер большой оси клетки, C_1 ; (b) – размер малой оси клетки, C_2 ; (c) – показатель формы клетки, CSI; (d) – площадь поверхности клетки, S_c ; (e) – объем клетки, V_c ; (f) – удельная поверхность клетки, SS_c . $M \pm m$. *Отличия от контроля достоверны при $p < 0.01$. Критерий Манна–Уитни ($n = 12$).

• холодовой шок не оказывал значимого влияния на интенсивность флуоресценции *R123*, *DCF-DA* и *PI* эритроцитов.

При действии гипотермии при условии медленного охлаждения до 0°C в большинстве клеточных систем развиваются необратимые изменения. Они, прежде всего, затрагивают структуру цитоплазматических мембран. Отмечаются рост их вязкости и снижение текучести, следствием чего является уменьшение проницаемости в основном в отношении ионов [1], подавляется активность Na^+/K^+ -АТФазы, растет концентрация Na^+ в клетке, развивается внутриклеточный ацидоз. Клетка набухает (свеллинг), что часто приводит к ее лизису.

В нашем случае это не происходило. Рост объема эритроцита был незначителен и статистически не выражен, признаки нарушения целостности клеточных мембран отсутствовали. Об этом свидетельствовали близкие значения уровня флуоресценции *PI* при 22 и 4°C. Известно, что виды, толерантные к условиям экстремально низких температур, не допускают значительных измене-

ний вязкости липидного бислоя. Более того вязкость в условиях гипотермии у них понижается. Это было показано в отношении *Fundulus heteroclitus* (L., 1766) [37]. Холодовая акклимация повышала содержание ненасыщенных жирных кислот (С18:1) и уменьшала уровень насыщенных (С18:0) в мембранных структурах гепатоцитов данного вида.

Причину же изменения формы клеток красной крови у морского ерша в условиях низкотемпературного шока, по-видимому, нужно искать в особенностях организации цитоскелета его эритроцитов. Известно, что образование эллипсоидной формы у эритроцитов рыб происходит на стадии полихроматофильного нормобласта в момент повышения содержания в клетке гемоглобина [38]. При этом обнаружена прямая связь между содержанием гемоглобина и уровнем спектрина в клетке ($r > 0.5$) [39]. Спектрин относится к группе интегральных мембранных белков и составляет основу цитоскелета эритроцита (полоса 1 и 2 по Фейрбанксу) [40], а гемоглобин является одним из основных белков примембранного слоя, стабилизирующего конфигурацию клетки [41]. Существует

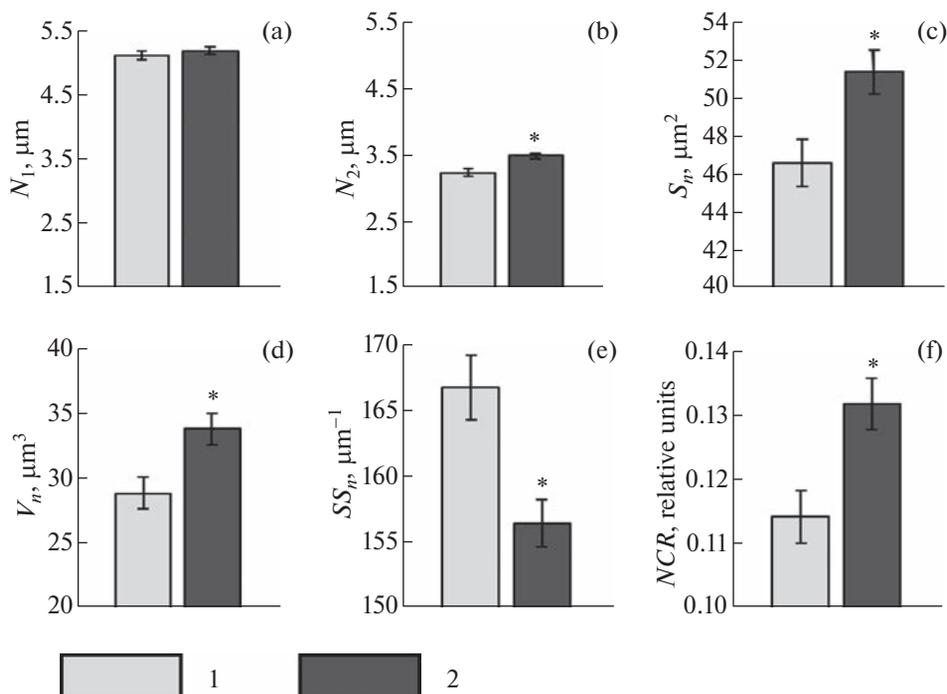


Рис. 3. Морфометрические характеристики ядер эритроцитов морского ерша. 1 – контрольная группа (22°C), 2 – опытная группа (4°C); (a) – размер большой оси ядра, N_1 ; (b) – размер малой оси ядра, N_2 ; (c) – площадь поверхности ядра, S_n ; (d) – объем ядра, V_n ; (e) – удельная поверхность ядра, SS_n ; (f) – ядерно-цитоплазматическое отношение, NCR . $M \pm m$. *Отличия от контроля достоверны при $p < 0.01$. Критерий Манна–Уитни ($n = 12$).

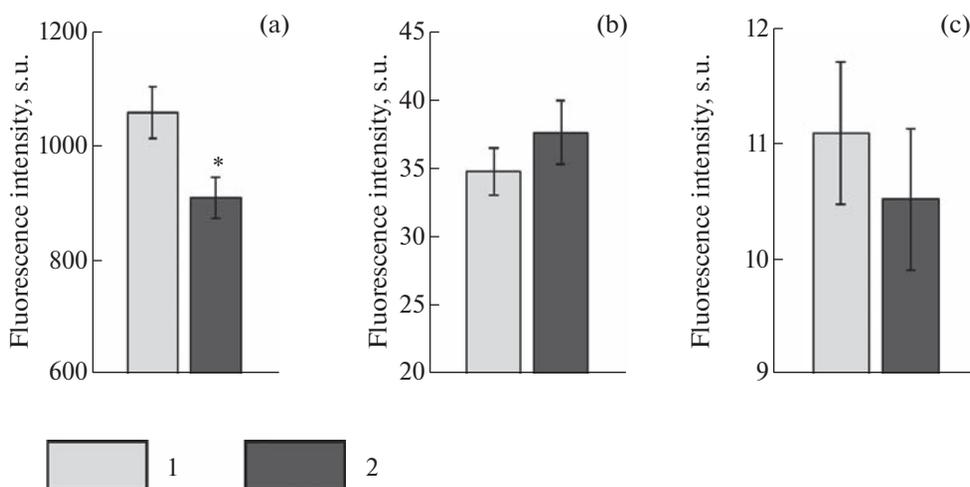


Рис. 4. Данные проточной цитометрии для эритроцитарных взвесей морского ерша. 1 – контрольная группа (22°C), 2 – опытная группа (4°C); (a) – интенсивность флуоресценции *SYBR Green I*; (b) – интенсивность флуоресценции *R123*; (c) – интенсивность флуоресценции *DCF-DA*. $M \pm m$. *Отличия от контроля достоверны при $p < 0.01$. Критерий Манна–Уитни ($n = 12$).

также положительная связь между содержанием гемоглобина и уровнем тропомиозина (полоса 7 по Фейрбанксу) (r около 0.6) [39]. Последний организует структуру полимерного актина, что обеспечивает его взаимодействие со спектрином цитоплазматической мембраны [42]. Из выше перечисленного следует, что гемоглобин является важным

элементом цитоскелета эритроцита. Известно, что в условиях экстремальной гипотермии должен происходить чрезмерный рост сродства гемоглобина к кислороду [43]. Это приводит к изменению конформации белка и сопровождается высвобождением боровских протонов. Связь гемоглобина со спектрином должна нарушаться, что однозначно

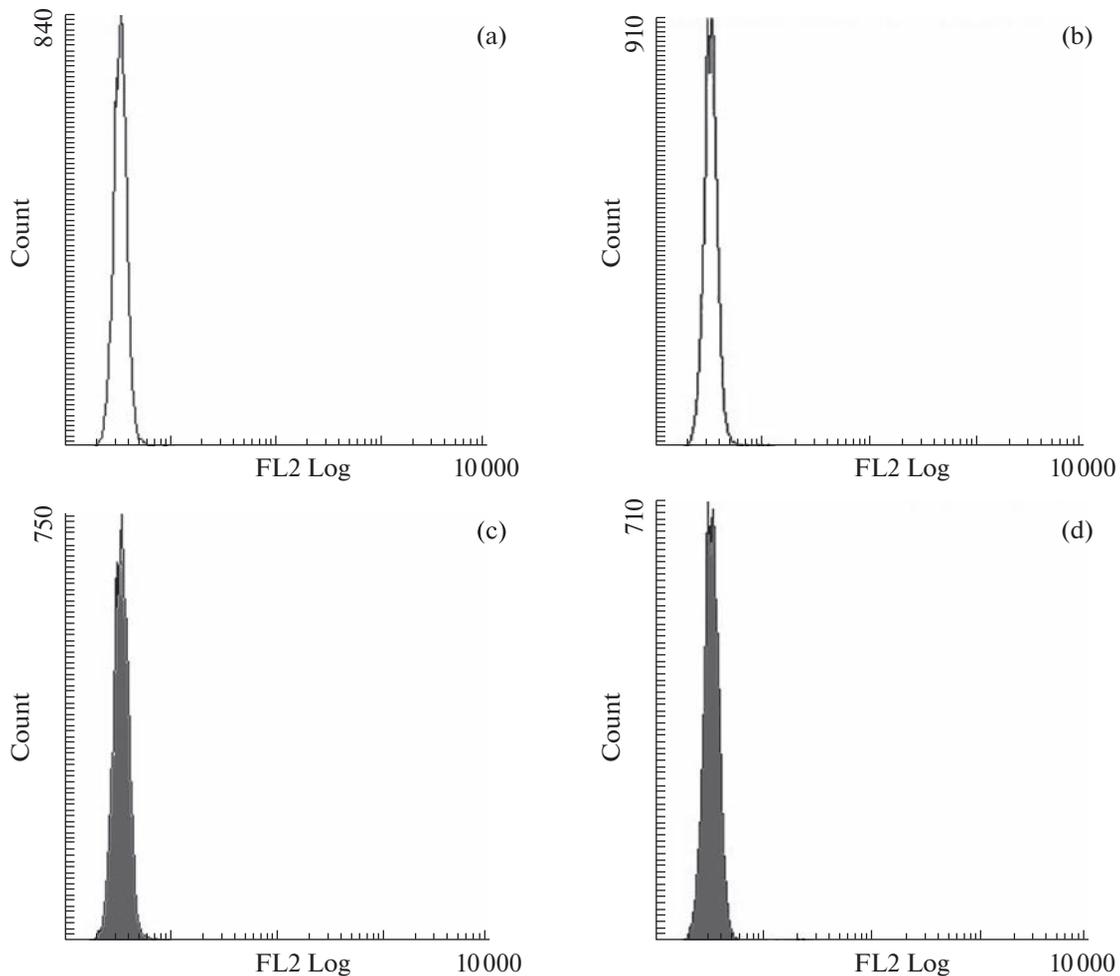


Рис. 5. Примеры гистограмм распределения интенсивности флуоресценции *PI* у эритроцитов морского ерша. (a) – неокрашенная проба, контрольная группа (22°C); (b) – окрашенная проба, контрольная группа (22°C); (c) – неокрашенная проба, опытная группа (4°C); (d) – окрашенная проба, опытная группа (4°C).

должно сказываться и на состоянии цитоскелета. В результате клетка приобретает округлую форму, свойственную эритроидным элементам более ранних генераций.

Снижение флуоресценции *SYBR Green I*, показанное в настоящей работе, может определяться следующими процессами. Известно, что данный флуорохром проявляет максимальное свечение при взаимодействии с двухцепочной молекулой ДНК [44]. Он может также взаимодействовать с одноцепочной ДНК и РНК. В этом случае интенсивность флуоресценции падает [44]. Рост содержания РНК в ядре может отражать усиление процессов транскрипции в данной структуре.

Об усилении транскрипционных процессов в клеточных системах в условиях холодового шока свидетельствует сравнительно большое количество работ. У многих видов костистых рыб зарегистрирован рост экспрессии и содержания белков теплового шока (HSP), преимущественно HSP70 и

HSP90 [18, 45, 46]. Для ряда видов показана активная экспрессия и повышение содержания в клетках белков холодового шока (CSP) [17], уровня микроРНК [47] и ряда специфических белков, связанных с процессами энергетического обмена [48]. В экспериментах, выполненных на *Cyprinus carpio* (L., 1758) показано, что в условиях гипотермии изменяется структура ядрышек и происходит репрессия рибосомных генов [49]. Это наблюдается на фоне экспрессии макроH2A и усиления процессов метилирования ДНК. Считается, что это подавляет процесс транскрипции в целом и препятствует реорганизации структуры хроматина в условиях холодового шока.

Вместе с тем в ряде работ показано, что холодовый шок у рыб может индуцировать повреждение ДНК [50]. Теоретически это может приводить к образованию одностранных разрывов и понижению интенсивности флуоресценции *SYBR Green I*. Однако допустить, что этот процесс имеет место в отношении эвритермного морского ерша, сложно.

Этот вид часто сталкивается со случаями апвеллинга, при которых перепад температур превышает 10°C. Доказательством тому также являются данные по флуоресценции *R123*, *DCF-DA* и *PI*, представленные в настоящей работе. Значения этих показателей не претерпевали статистически значимых изменений. Это означает, что в клетках сохранялся мембранный потенциал митохондрий, поддерживалась целостность цитоплазматических мембран и отсутствовало усиление окислительных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленной информации следует, что холодовой шок (22°C → 4°C) не оказывал значимого влияния на показатели жизнедеятельности эритроцитов морского ерша. Клетки сохраняли целостность цитоплазматических мембран, потенциал митохондрий и уровень окислительных процессов, о чем свидетельствовали постоянные значения интенсивности флуоресценции *PI*, *R123* и *DCF-DA*. Основные изменения были связаны с формой эритроцита и функциональной активностью ядра. Клетки приобретали округлые очертания, размеры ядра увеличивались на фоне роста значений *NCR* и снижения интенсивности флуоресценции *SYBR Green I*.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены в рамках государственной программы 121041400077-1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.А.С., Н.Е.Ш.), постановка эксперимента (Н.Е.Ш., Ю.В.Б.), обработка данных (Н.Е.Ш., Ю.В.Б.), написание и редактирование манускрипта (А.А.С., Н.Е.Ш.)

БЛАГОДАРНОСТИ

Екатерине Сергеевне Кладченко за оказанное методическое содействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donaldson MR, Cooke SJ, Patterson DA, Macdonald JS (2008) Cold shock and fish. *J Fish Biol* 73: 1491–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x>
2. Reid CH, Patrick PH, Rytwinski T, Taylor JJ, Willmor WG, Reesor B, Cooke SJ (2022) An updated review of cold shock and cold stress in fish. *J Fish Biol* 100: 1102–1137. <https://doi.org/10.1111/jfb.15037>
3. Koakoski G, Oliveira TA, da Rosa JGS, Fagundes M, Kreutz LC, Barcellos LJG (2012) Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiol Behav* 106 (2): 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.013>
4. He J, Qiang J, Yang H, Xu P, Zhu ZX, Yang RQ (2015) Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress. *J Thermal Biol* 53:90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.08.010>
5. Bai Y, Liu H, Huang B, Wagle M, Guo S (2016) Identification of environmental stressors and validation of light preference as a measure of anxiety in larval zebrafish. *BMC Neurosci* 17 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0298-z>
6. Mattioli CC, Takata R, de Oliveira Paes Leme F, Costa DC, Luz RK (2020) Response of juvenile *Lophiosilurus alexandri* to osmotic and thermic shock. *Fish Physiol Biochem* 46 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00696-5>
7. Inoue LAKA, Moraes G, Iwama GK, Afonso LOB (2008) Physiological stress responses in the warm-water fish *matrinxã* (*Brycon amazonicus*) subjected to a sudden cold shock. *Acta Amazonica* 38: 603–609. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400002>
8. Adloo MN, Soltanian S, Hafezjyeh M, Ghadimi N (2015) Cortisol and glucose responses in juvenile striped catfish subjected to a cold shock. *Veterinary Sci Devel* 5 (2): 78–81.
9. Tseng YC, Liu ST, Hu MY, Chen RD, Lee JR, Hwang PP (2014) Brain functioning under acute hypothermic stress supported by dynamic monocarboxylate utilization and transport in ectothermic fish. *Front Zool* 11 (1): 1–20.
10. Choi CY, Kim TH, Choi YJ, Choi JY, Oh SY, Kim BS (2017) Effects of various wavelengths of light on physiological stress and non-specific immune responses in black rockfish *Sebastes schlegelii* subjected to water temperature change. *Fish Sci* 83 (6): 997–1006. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1136-7>
11. Giacomini M, Eom J, Schulte PM, Wood CM (2019) Acute temperature effects on metabolic rate, ventilation, diffusive water exchange, osmoregulation, and acid–base status in the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). *J Compar Physiol B* 189 (1): 17–35. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1191-0>
12. Chang CH, Zhou XW, Wang YC, Lee TH (2020) Differential effects of hypothermal stress on lactate metabolism in fresh water- and seawater-acclimated milkfish, *Chanos chanos*. *Compar Biochem Physiol Part A: Mol & Integr Physiol* 248: 110744. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110744>

13. *Bacchetta C, Ale A, Rossi AS, Karakachoff M, Cazenave J* (2020) Effects of cold stress on juvenile *Piaractus mesopotamicus* and the mitigation by β -carotene. *J Thermal Biol* 88: 102497.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102497>
14. *Hwang GC, Watabe S, Hashimoto K* (1990) Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation. *J Comp Physiol B* 160 (3): 233–239.
<https://doi.org/10.1007/bf00302588>
15. *Vanlandeghem MM, Wahl DH, Suski CD* (2010) Physiological responses of largemouth bass to acute temperature and oxygen stressors. *Fishe Managem Ecol* 17 (5): 414–425.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2010.00740.x>
16. *Jun Q, Hong Y, Hui W, Didlyn KM, Jie H, Pao X* (2015) Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding. *Aquacult Res* 46 (2): 335–345.
<https://doi.org/10.1111/are.12189>
17. *Mikhailovich M, Militti C, Gabaldo T, Gebauer F* (2010) Eukaryotic cold shock domain proteins: Highly versatile regulators of gene expression. *Bioessays* 32: 109–118.
<https://doi.org/10.1002/bies.200900122>
18. *Sharma J, Singh SP, Chakrabarti R* (2017) Effect of temperature on digestive physiology, immune-modulatory parameters, and expression level of Hsp and LDH genes in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Aquaculture* 479: 134–141.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.031>
19. *Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, Iwama GK* (2002) Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295 (2): 173–183.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00687-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X)
20. *Soldatov AA* (2005) Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 41(3):272–281.
21. *Khrushchov NG, Lange MA, Zolotova TE, Bessonov AV* (1993) Characteristics of erythroid sprout cells in mirror carp (perspectives of use in estimating the fish physiological-state). *Izvestiya akademii nauk seriya biologicheskaya* (1): 83–87.
22. *Fischer U, Ototake M, Nakanishi T* (1998) Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*). *Fish & Shellfish Immunology* 8 (5): 339–349.
<https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0144>
23. *Phillips MC, Moyes CD, Tufts BL* (2000) The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J Exp Biol* 203 (6): 1039–1045.
<https://doi.org/10.1242/jeb.203.6.1039>
24. *Cossins AR, Gibson JS* (1997) Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J Exp Biol* 200 (2): 343–352.
<https://doi.org/10.1242/jeb.200.2.343>
25. *Boutillier RG, Ferguson RA* (1989) Nucleated red cell function: metabolism and pH regulation. *Canad J Zool* 67 (12): 2986–2993.
<https://doi.org/10.1139/z89-421>
26. *Андреева АЮ, Солдатов АА* (2012) Изменения объема ядерных эритроцитов скорпены в условиях внешней гипоксии (эксперименты *in vitro*). *Доповіді Національної академії наук України* (10): 149–153. [*Andreeva AY, Soldatov AA* (2012) Changes in the volume of nuclear erythrocytes of scorpaena under conditions of external hypoxia (*in vitro* experiments). *Dopovidi Nacional'noi akademii nauk Ukraini* (10): 149–153. (In Russ)].
27. *Soldatov AA, Kukhareva TA, Andreeva AY, Parfenova IA, Rychkova VN, Zin'kova DS* (2017) The functional morphology of erythrocytes of the black scorpion fish *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758) (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) during hypoxia. *Russ J Marine Biol* 43 (5): 368–373.
<https://doi.org/10.1134/S1063074017050091>
28. *Световидов АН* (1964) Рыбы Черного моря. М.: Наука. [*Svetovidov AN* (1964) *Ruby Chernogo moray* [Fish of the Black Sea] М.: Nauka. (In Russ)].
29. *Silvestrova KP, Zatsepin AG, Myslenkov SA* (2017) Coastal upwelling in the Gelendzhik area of the Black Sea: Effect of wind and dynamics. *Oceanology* 57 (4): 469–477.
<https://doi.org/10.1134/S0001437017040178>
30. *Soldatov AA* (2005) Physiological aspects of effects of urethane anesthesia on the organism of marine fishes. *Hydrobiological J* 41 (1): 113–126.
<https://doi.org/10.1615/HydroJ.v41.il.130>
31. *Золотницкая РП* (1987) Методы гематологических исследований. Лабораторные методы исследования в клинике (справочник) М. Медицина 106–148. [*Zolotnickaya RP* (1987) *Metody gematologicheskikh issledovaniy. Laboratornye metody issledovaniya v klinike (spravochnik)* [Methods of hematological research. Laboratory research methods in the clinic (reference book)]. М. Medicina. 106–148. (In Russ)].
32. *Tiihonen K, Nikinmaa M* (1991) Substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *J Exp Biol* 161: 509–551.
33. *Girish V, Vijayalakshmi A* (2004). Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* 41 (1): 47.
34. *Houchin DN, Munn JI, Parnell BL* (1958) A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area. *Blood* 13 (12): 1185–1191.
35. Ташкэ К (1980) Введение в количественную цитогистологическую морфологию. Бухарест: изд-во АНССР. [Tashke K (1980) *Vvedenie v kolichestvennuyu cito-gistologicheskuyu morfologiyu* [Introduction to quantitative cyto-histological morphology]. Buharest: izd-vo AN SRR. (In Russ)].
36. *Чижевский АЛ* (1959) Структурный анализ движущейся крови. АНСССР. [*Chizhevskij AL* (1959) *Strukturnyj analiz dvizhushchejsya krovi* [Structural analysis of moving blood]. AN SSSR. (In Russ)].
37. *Buhariwalla HEC, Osmond EM, Barnes KR, Cozzi RRF, Robertson GN, Marshall WS* (2012) Control of ion transport by mitochondrion-rich chloride cells of eurythermic teleost fish: cold shock vs. cold acclimation. *Comp Biochem Physiol Part A: Mol Integrat Physiol* 162 (3): 234–244.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.03.010>
38. *Kukhareva TA, Soldatov AA* (2016) Functional morphology of blood erythroid cells in *Neogobius melanostomus* P.

- during cell differentiation. *J Evol Biochem Physiol* 52 (3): 261–266.
<https://doi.org/10.1134/S0022093016030091>
39. Гончарова ЕИ, Пинаев ГП (1988) Белки цитоскелета эритроцитов. *Цитология* 30 (1): 5–18. [Goncharova EI, Pinaev GP (1988) Belki citoskeleta eritrocitov. *Citologiya* 30 (1): 5–18. (In Russ)].
40. Bogusławska D, Machnicka B, Hryniewicz-Jankowska A, Czogalla A (2014) Spectrin and phospholipids – the current picture of their fascinating interplay. *Cell Mol Biol Lett* 19 (1): 158–179.
<https://doi.org/10.2478/s11658-014-0185-5>
41. Wong P (2004) A hypothesis on the role of the electrical charge of haemoglobin in regulating the erythrocyte shape. *Med Hypoth* 62 (1): 124–129.
42. Vera C, Lao J, Hamelberg D, Sung LA (2005) Mapping the tropomyosin isoform 5 binding site on human erythrocyte tropomodulin: further insights into E-Tmod/TM5 interaction. *Arch Biochem Biophys* 444 (2): 130–138.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.002>
43. Soldatov AA (2003) Effects of temperature, pH, and organic phosphates on fish hemoglobins. *J Evol Biochem Physiol* 39 (2): 159–168.
44. Jin X, Yue S, Wells KS, Singer VL (1994) Sybr Green (Tm)-1-a new fluorescent dye optimized for detection of picogram amounts of DNA in gels. *Biophys J* 66 (2): A159–A159.
45. Said Ali K, Ferencz Á, Nemcsók J, Hermes E (2010) Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure. *Acta Biol Hungar* 61 (1): 10–23.
<https://doi.org/10.1556/abiol.61.2010.1.2>
46. Ji L, Jiang K, Liu M, Wang B, Han L, Zhang M, Wang L (2016) Low temperature stress on the hematological parameters and HSP gene expression in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Chinese J Oceanol Limnol* 34 (3): 430–440.
<https://doi.org/10.1007/s00343-016-4367-z>
47. Hung I, Hsiao YC, Sun HS, Chen TM, Lee SJ (2016) MicroRNAs regulate gene plasticity during cold shock in zebrafish larvae. *BMC Genomics* 17 (1): 1–18.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3239-4>
48. Lu Y, Nie M, Wang L, Xiong Y, Wang F, Wang L, You F (2018) Energy response and modulation of AMPK pathway of the olive flounder *Paralichthys olivaceus* in low-temperature challenged. *Aquaculture* 484: 205–213.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.031>
49. Pinto R, Ivaldi C, Reyes M, Doyen C, Miettton F, Mongelard F, Bouvet P (2005) Seasonal environmental changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish. *FEBS Letters* 579 (25): 5553–5558.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.019>
50. Cheng CH, Ye CX, Guo ZX, Wang AL (2017) Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. *Fish Shellfish Immunol* 64: 137–145.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.003>

EFFECTS OF COLD SHOCK ON THE SIZE AND ACTIVITY OF *SCORPAENA PORCUS* (LINNAEUS, 1758) NUCLEAR ERYTHROCYTES (IN VITRO EXPERIMENTS)

N. E. Shalagina^{a,#}, A. A. Soldatov^a, and Yu. V. Bogdanovich^a

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

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

The in vitro effect of cold shock on erythrocytes of the benthic scorpionfish *Scorpaena porcus* L. was studied. The blood samples were exposed to 22°C (control group) and 4°C (experimental group) for 3 hours. Cold shock had no significant impact on erythrocyte scorpionfish vital function. The cells maintained the integrity of cytoplasmic membranes, mitochondrial potential and the level of oxidative processes, that the constant values of Propidium Iodide (PI), Rhodamine 123 (R123) and 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence levels demonstrated. Main changes referred to erythrocyte shape and nucleus functional activity. Cells gained more roundish shape, nucleus size increased with the growth of the nuclear-cytoplasmic ratio (NCR) and the decrease of fluorescence intensity of the cells labeled with SYBR Green I. It appears to be related to the activation of transcriptomic processes.

Key words: erythrocyte, cold shock, morphometry, flow cytometry, *Scorpaena porcus* L.

ВЛИЯНИЕ НЕОНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И АНТИДЕПРЕССАНТА ФЛУОКСЕТИНА НА КОГНИТИВНУЮ И СТРЕСС-ГОРМОНАЛЬНУЮ ФУНКЦИИ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС

© 2023 г. В. А. Михайленко^{1,*}, И. П. Буткевич¹, Е. А. Вершинина¹

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

*e-mail: viktormikhailenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.01.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 11.04.2023 г.

У взрослых самцов и самок крыс, подвергнутых на 2-й день жизни умеренной острой гипоксии и затем хроническому введению ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, исследовали способность к пространственному обучению и функциональность пространственной памяти, а также стрессорную реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАКС). При тестировании способности к пространственному обучению у взрослых крыс, подвергнутых неонатальной гипоксии, обнаружено увеличение латентного периода достижения платформы в водном лабиринте Морриса в первой пробе в первый из пяти дней тренировки по сравнению с животными, не подвергавшимися гипоксии. Полученные результаты по исследованию памяти в тесте распознавания нового объекта и в водном лабиринте Морриса свидетельствуют о том, что гипоксия не вызывала дефицит памяти у взрослых животных. Более того, гипоксия улучшала показатели памяти у самцов на первый день, а у самок – на 4-й день тестирования после удаления платформы из бассейна по сравнению с соответствующими контрольными значениями. Содержание кортикостерона в плазме крови самцов в ответ на тестирование памяти не различалось в контрольной и гипоксической группах и характеризовалось более высокими показателями, чем у самок соответствующих групп. Гипоксия увеличила реактивность ГГАКС у самок, что сочеталось у них с более длительным хранением памяти. Флуоксетин нормализовал показатель пространственного обучения, не вызвал изменений у контрольных животных и не изменил выявленное улучшение памяти у гипоксических крыс без введения этого препарата. Полученные новые данные расширяют представление о долговременном влиянии неонатальной нормобарической умеренной гипоксии на пространственную память и реактивность ГГАКС в зависимости от половой принадлежности и подчеркивают отсутствие вредного влияния флуоксетина на пространственную память как у контрольных крыс, так и у крыс с воздействием гипоксии.

Ключевые слова: неонатальная умеренная гипоксия, отдаленные последствия гипоксии, кортикостерон, пространственное обучение и память

DOI: 10.31857/S0044452923030063, **EDN:** YHNJYS

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач возрастной физиологии является изучение отдаленных последствий стрессорных воздействий в перинатальный период развития. Перенесенный в раннем возрасте стресс программирует развитие мозга, определяющее в дальнейшем реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАКС) и когнитивной сферы в ответ на различные стрессорные ситуации [1–3]. Ранний неонатальный период развития является критическим для приспособления новорожденных к внеутробному существованию, особенно к физиологическим изменениям в дыхательной системе и в функционировании малого круга кровообращения [4, 5]. В структурах головного мозга в это время активно протекают процессы пролиферации, миграции, дифференциров-

ки, синаптогенеза, миелинизации, апоптоза, что определяет, с одной стороны, высокий уровень пластичности, а с другой – высокую уязвимость мозга к неблагоприятным воздействиям [6, 7]. Перинатальная гипоксия, связанная с недостатком кислорода, является распространенным стрессором у новорожденных, у которых адаптация к стрессу осуществляется с участием комплекса физиологических систем, среди которых ключевой является ГГАКС [8, 9].

Исследованию разных типов гипоксии в зависимости от дозы и продолжительности при экспериментальном моделировании гипоксических состояний млекопитающих животных и человека посвящено большое число работ (для обзора см. [10–12]). Основное внимание в исследованиях на животных, преимущественно грызунах, уделяется

изучению влияния гипоксического стресса, вызванного гипоксией-ишемией, которая связана с недостатком кислорода, сочетающимся с нарушением кровоснабжения в головном мозге, что приводит к гибели нейронов мозга и тяжелым последствиям для организма. В экспериментальных условиях гипоксия-ишемия достигается снижением поступления кислорода в головной мозг и окклюзией сонных артерий. Установлено, что долговременными последствиями неонатальной гипоксии-ишемии являются нарушения функции ГГКС и когнитивных способностей [8, 10], что связано с отклонениями в развитии гиппокампа, главного регулятора функции памяти [12, 13].

Настоящая работа посвящена исследованию долговременного влияния умеренной неонатальной нормобарической гипоксии, вызывающей дефицит кислорода, не осложненной ишемическим вмешательством, на когнитивные функции и гормональный статус животных. Исследование влияния именно более мягкой неонатальной гипоксии особенно важно, поскольку даже слабо выраженное нарушение снабжения мозга кислородом может быть причиной задержки темпов развития систем мозга, обеспечивающих сложные интегративные функции. Ранее при использовании разработанной в нашей лаборатории модели недоношенной беременности у крыс, позволяющей исследовать последствия перинатальной гипоксии-энцефалопатии новорожденных, были выявлены отклонения от нормы структурно-функциональных характеристик неокортекса и гиппокампа у особей разного возраста (5, 10, 20, 30 и 40 дней жизни) [14]. В настоящей работе мы использовали аналогичные условия неонатальной гипоксии для исследования последствий ее влияния у взрослых крыс.

Серотонинергическая система (5-НТ система), как и ГГКС, участвует в процессах адаптации к гипоксии. Обе системы вовлечены в регуляцию функции гиппокампа благодаря наличию в нем глюкокортикоидных и серотонинергических рецепторов [15, 16]. Гиппокамп является ключевой структурой в формировании памяти [17], поэтому серотонинергической иннервации гиппокампа уделяется большое внимание [15]. Есть данные, что гипоксия-ишемия вызывает изменения всех компонентов серотонинергической системы в ядре шва, префронтальной коре, гиппокампе, включая синтез и количество 5-НТ, уровень экспрессии его рецепторов и транспортера, а также продуктов метаболизма [16]. Появляются работы о половых различиях во влиянии гипоксии на эти показатели [18]. Кроме повреждения серотонинергических нейронов гипоксия может вызывать нейровоспалительный процесс. Поскольку увеличение уровня серотонина способствует нормализации адаптивного поведения, направленную регуляцию серотонинергической системы можно использовать в терапевтических целях. Селективный ингибитор об-

ратного захвата серотонина антидепрессант флуоксетин применяется в клинике для лечения депрессии у беременных, хотя имеются разногласия в вопросе о его влиянии на развивающийся мозг [19]. Полагают, что действие флуоксетина заключается в блокаде серотонинового транспортера (SERT), что приводит к накоплению серотонина в синаптической щели с последующей большей активацией и захватом серотониновых рецепторов (5HT₁Rs). Усиление активности 5HT₁Rs взаимосвязано с изменениями нейропластичности, что приводит к повышению регуляции синаптических белков и плотности дендритных шипиков, которая является важным показателем нейронной пластичности. Кроме того, данные литературы свидетельствуют о способности флуоксетина стимулировать эндогенный нейрогенез, вызывать противовоспалительный эффект в центральной нервной системе, способствовать выживанию нейронов [20]. Однако экспериментальные и клинические данные о последствиях гипоксии, как и неонатального введения флуоксетина, противоречивы, а точный механизм их влияния на когнитивные функции и ГГКС остается не ясным, что требует дальнейших исследований. Поскольку диапазон современных терапевтических подходов к лечению последствий перинатальной гипоксии все еще ограничен, такие исследования имеют большое практическое значение.

Цель проведенного нами исследования состояла в изучении долговременного влияния острой умеренной неонатальной гипоксии на когнитивные функции, реактивность ГГКС у взрослых крыс обоего пола и в изучении влияния неонатального хронического введения флуоксетина на исследованные функциональные показатели у взрослых гипоксических и контрольных крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и экспериментальные группы

Работа выполнена на взрослых самцах и самках из потомства крыс линии Wistar, полученных из биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук. Всего было получено 15 взрослых первородящих самок и 10 самцов. После двух дней адаптации к условиям лабораторного вивария (свободный доступ к стандартизированной пище и воде, световой день с 8 до 20 ч, температура 21.0–23.0°C) трех первородящих самок (220–230 г) подсаживали к двум самцам (330–350 г) и помещали в стандартную пластиковую клетку; на следующее утро у самок брали мазки из влагалища для определения наличия беременности. Беременных самок отсаживали от самцов и содержали по 5 особей в клетке до 17-го дня беременности, а с 18-го дня – в индивидуальных клетках. День беременности и день появления потомства на свет принимали за нулевой (G0 и P0 соответственно). На

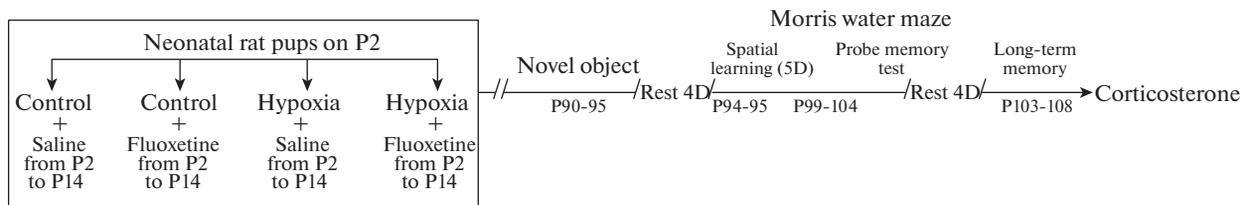


Рис. 1. Схематическое представление экспериментальных протоколов и возраста крыс.

второй день после рождения пометы сокращали до 8 крысят, оставляя по возможности равное число разнополовых особей. Крысят произвольно разделяли на группы: экспериментальные, которых подвергали гипоксии (гипоксические животные) и контрольные, которые находились в тех же условиях без воздействия гипоксии.

Модель гипоксии и введение флуоксетина

Двухдневных крысят экспериментальной группы помещали на 60 мин в барокамеру с проточной газовой смесью, содержащей 7.6–7.8% кислорода и 91.8% азота при температуре 35–36°C и нормальном атмосферном давлении 760 мм рт. ст.). Состав газовой смеси был аналогичен смеси, использованной в предыдущих работах лаборатории [14]. Считается, что мозг одно-двухдневного крысенка примерно соответствует развитию мозга недоношенного ребенка (23–24-я неделя беременности) [21]. Сразу после удаления из камеры экспериментальных и контрольных животных начинали подвергать ежедневной инъекции ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина (10 мг/кг, по 5 мкл в холку) или физиологического раствора. Инъекции продолжались в течение двух недель. Число животных в исследованных группах было следующим: контроль + физиологический раствор (самцы $n = 6$, самки $n = 10$), гипоксия + физиологический раствор (самцы $n = 8$, самки $n = 8$), контроль + флуоксетин (самцы $n = 13$, самки $n = 9$) и гипоксия + флуоксетин (самцы $n = 8$, самки $n = 8$) (рис. 1). Крысята находились со своими матерями до 30-дневного возраста, затем разнополовых животных рассаживали в разные клетки по 4–6 особей.

Тестирование памяти по распознаванию нового объекта

Начиная с 90–95-дневного возраста, у крыс исследовали функциональность памяти в тесте “Распознавание нового объекта”, основанном на естественном для грызунов предпочтении новизны [22]. В первый день крысу помещали на 10 мин в установку “открытое поле” (камера 50 × 50 см, ограниченная стенками из оргстекла) для адаптации к условиям опыта. На следующие сутки крысу помещали на 5 мин в знакомую установку, в центре которой были размещены два одинаковых объекта

(светлые пластмассовые кубики). Регистрировали время исследования каждого объекта (с). Затем крысу перемещали в домашнюю клетку на 10 мин. За это время левый объект заменяли новым незнакомым предметом, выполненным из темного пластика, округлой формы, правый объект оставляли неизменным. Животных помещали обратно в установку для исследования нового и знакомого предметов и регистрировали время, в течение которого крыса уделяла внимание каждому из них. После каждого животного предметы и установку протирали спиртом (40%). Для оценки функциональности памяти использовали коэффициент дискриминации (Кр) – разницу между временем исследования нового и знакомого предметов по отношению к суммарному времени их исследования. Нулевое значение этого параметра предполагает одинаковое время обследования знакомого и нового объектов. Чем меньше Кр, тем хуже память распознавания. $Kp = [Время (Объект Новый) - Время (Объект Знакомый)] / [Время (Объект Новый) + Время (Объект Знакомый)] \times 100\%$.

Тестирование обучения и памяти в водном лабиринте Морриса

Через три дня после проведения данного теста начинали тестирование обучения в водном лабиринте Морриса [23], которое продолжалось в течение пяти дней. Крысу на 60 с помещали в бассейн (диаметр 120 см, высота 72 см, температура воды 22–24°C), на дне которого находилась металлическая платформа, ее поверхность была на 2 см ниже уровня воды, окрашенной мелом, чтобы сделать платформу невидимой для крысы. Бассейн произвольно был разделен на четыре равных квадранта. Круглая стальная платформа (высота 39 см, диаметр 12 см) была помещена в центр квадранта 2, на расстоянии 30 см от стенки бассейна, ее локализация была фиксирована в течение всех дней тестирования обучения для всех крыс. Видеокамера была установлена на перекладине над центром бассейна. Бассейн был расположен в комнате с отдаленными визуальными сигналами различной формы, разного размера и цвета, чтобы обеспечить пространственную ориентацию во время обучения. Экспериментатор был виден крысе и всегда стоял в одном месте во время всех экспериментов. Первую попытку начинали с целевого квадранта 1, следую-

шую попытку с квадранта 2 и так далее против часовой стрелки. Регистрировали время, в течение которого крыса находила платформу (латентный период, с), на которой ей позволяли находиться в течение 20 с, давая крысе возможность сориентироваться в пространстве. Если попытка была неудачной, то латентный период принимали за 60 с, а крысу помещали на платформу на 20 с, затем следовал 15 с период покоя в сухой клетке, что вместе представляло первую попытку. Четыре такие попытки составляли первую пробу, после которой крысу вытирали бумажным полотенцем и помещали на 4 мин в сухую теплую клетку. Затем проводили вторую пробу, аналогичную первой. По такой схеме обучение продолжалось четыре дня. На пятый день после первой пробы обучения убрали платформу из бассейна и проводили пробное испытание, результат которого в дальнейшем рассматривали как память первого дня тестирования после удаления платформы (пробный тест на память), а через 96 ч отдыха – память четвертого дня тестирования после удаления платформы (долговременная память). С помощью веб-камеры и специальной компьютерной программы, разработанной в нашем институте, регистрировали траекторию движения крысы, латентный период достижения целевого квадранта (с), где в процессе обучения находилась платформа, а также время пребывания в целевом квадрате (с) за период времени, равный 60 с.

Через 30 мин после завершения тестирования долговременной памяти у крыс посредством декапитации собирали образцы крови для дальнейшего определения содержания кортикостерона в плазме крови, которую хранили при температуре минус 20°C. Кортикостерон определяли в двух пробах методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов (“Хема-Medica Co” Cat №: K210R; Россия) с помощью спектрофотометрической пластины (Spectrostar NANO, BMG Labtech, Германия).

Статистический анализ данных

После проверки гипотезы об отклонении распределений данных от нормального с использованием критерия Колмогорова–Смирнова проводили статистический анализ результатов с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программном комплексе SPSS Inc 13 с последующими множественными сравнениями по Бонферрони. Данные, полученные в тесте “Распознавание нового объекта”, анализировались с использованием смешанного дисперсионного анализа Mixed ANOVA. Зависимые переменные: время исследования нового и время знакомого объектов, факторы: пол, условие (гипоксия/контроль), воздействие (физиологический раствор/флуоксетин) и новый – знакомый объект. Анализ данных по обучению и памяти проводили с использованием разных моделей смешанного дисперсионного анализа. Во

всех моделях независимыми факторами выступали пол, условие (контроль/гипоксия) и воздействие (физиологический раствор/флуоксетин). Зависимыми факторами были день (1/2/3/4 или 5 дней) при изучении динамики обучения и памяти (на 1-й и 4-й дни тестирования). При изучении содержания кортикостерона факторами были: пол, условие (контроль/гипоксия) и воздействие (физиологический раствор/флуоксетин). При апостериорных сравнениях мы использовали поправку Бонферрони, когда число уровней факторов составляло более двух. Данные представлены средними значениями \pm стандартные ошибки среднего значения. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Визуально воздействие гипоксии проявлялось в цианозе (посинение кожного покрова) у крысят сразу после изъятия из камеры. Все экспериментальные и контрольные животные благополучно дожили до взрослого состояния, участвовали в экспериментах, что дало возможность получить следующие поведенческие и физиологические данные.

Тест “Распознавание нового объекта”

Смешанный дисперсионный анализ Mixed ANOVA был использован для обработки данных, полученных в тесте распознавание нового объекта. В качестве зависимых переменных мы рассматривали продолжительность времени исследования нового и старого объектов, факторы: пол, условие (гипоксия/контроль), воздействие (физиологический раствор/флуоксетин) и новый – знакомый объект.

Коэффициент дискриминации статистически значимо не различался между группами (рис. 2), что указывает на отсутствие влияний воздействия гипоксии и флуоксетина на функциональность памяти.

Водный лабиринт Морриса – способность к пространственному обучению

Смешанный дисперсионный анализ Mixed ANOVA был использован для исследования динамики латентного периода (ЛП) достижения платформы по дням для первой пробы, состоявшей из 4-х попыток. В качестве зависимых переменных мы рассматривали 1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дни, факторы: пол, условие (контроль, гипоксия) и воздействие (физиологический раствор, флуоксетин). Такой же анализ был проведен для второй пробы для четырех дней. В качестве зависимых переменных рассматривали значения латентного периода, факторы: пол, условие (контроль, гипоксия) и воздействие (физиологический раствор, флуоксетин). Для усредненных по четырем попыткам данным в первой пробе и первом дне получено значимое влияние условия (гипоксия) $F_{(1,62)} = 7.6$, $p = 0.007$,

$\eta^2 = 0.110$, воздействия (флуоксетин) $F_{(1,62)} = 11.8$, $p = 0.001$, $\eta^2 = 0.160$ и взаимодействия факторов условие и воздействие $F_{(1,62)} = 6.9$, $p = 0.011$, $\eta^2 = 0.100$. Апостериорный анализ с поправкой по Бонферрони показал, что в первый день обучения гипоксия увеличила ЛП в первой пробе у взрослых самцов ($p = 0.009$) (рис. 3а, с) и самок ($p = 0.017$) (рис. 3б, с) по сравнению с ЛП контрольных животных. В последующие дни обучения различий в ЛП между контрольными и гипоксическими крысами не наблюдалось. По результатам статистического анализа был проведен трехфакторный дисперсионный анализ для 1–4-й попыток первой пробы. Апостериорный анализ с поправкой по Бонферрони показал, что значимые различия между гипоксическими и контрольными крысами выявлены в первой попытке у самцов ($p = 0.01$) и самок ($p = 0.007$). Введение флуоксетина животным, подвергнутым в период новорожденности воздействию гипоксии, уменьшило данный показатель на первый день у взрослых самцов ($p = 0.003$) (рис. 3а, с) и самок ($p = 0.005$) (рис. 3б, с), т.е. флуоксетин восстановил ЛП до контрольного уровня (рис. 3с).

Оценка пространственной памяти

На пятый день после первой пробы тестирования обучения удаляли платформу из бассейна и исследовали у крыс пространственную память (1-й день тестирования памяти) и через четыре дня отдыха в “родной клетке” (4-й день тестирования памяти). Смешанный дисперсионный анализ Mixed ANOVA был использован для исследования функциональности памяти. В экспериментах по тестированию памяти обнаружено значимое влияние дня тестирования памяти (первый/четвертый дни), $F_{(1,62)} = 23.1$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.275$, условия (контроль/гипоксия) $F_{(1,61)} = 16.8$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.216$ и взаимодействия факторов память и условие $F_{(1,62)} = 11.5$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.159$. Апостериорный анализ с поправкой по Бонферрони показал, что гипоксия увеличила время пребывания в целевом квадранте у самцов по сравнению с контролем ($p = 0.001$), т.е. улучшила память на первый день тестирования, но вызвала недостоверную тенденцию у самок (рис. 4а). Неонатальное хроническое введение флуоксетина не изменило этот показатель памяти как у контрольных, так и гипоксических крыс. На первый день тестирования у животных с гипоксией и флуоксетином время пребывания в целевом квадранте было выше, чем у контрольных крыс с введением флуоксетина (самцы, $p = 0.024$; самки, $p = 0.021$) (рис. 4а).

При тестировании памяти на 4-й день обнаружено, что гипоксия увеличила время пребывания в целевом квадранте у самок ($p = 0.044$), то есть улучшила сохранность пространственной памяти, но не изменила ее у самцов (рис. 4б). Введение флуоксетина не изменило этот показатель памяти,

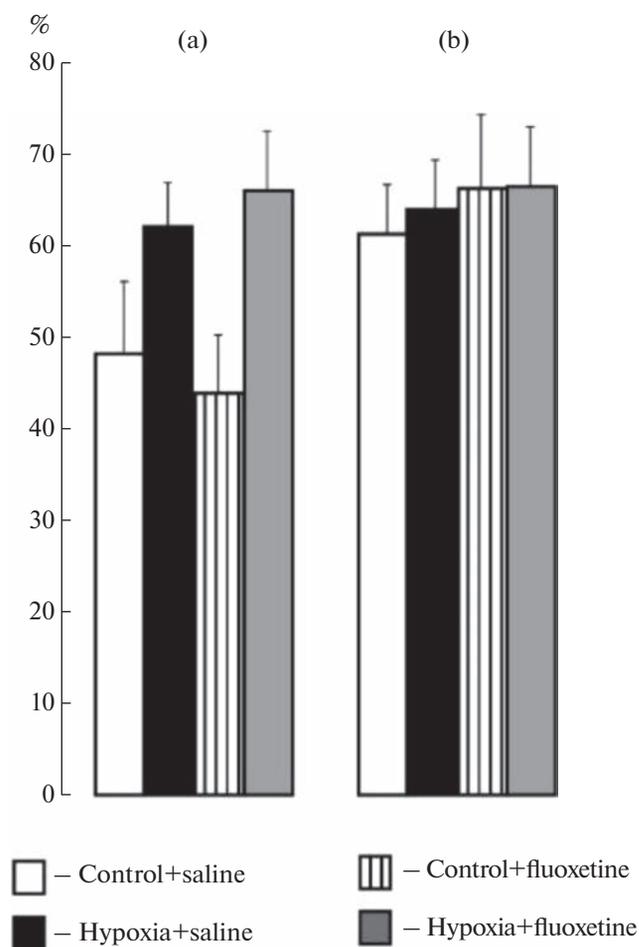


Рис. 2. Коэффициент дискриминации в исследовании функциональности памяти в тесте “распознавание нового объекта” у самцов (а) и самок (б) взрослых крыс контрольной группы или подвергнутых воздействию гипоксии, а также введению флуоксетина или физиологического раствора в неонатальный период развития. Ордината: коэффициент дискриминации (%).

как у контрольных, так и гипоксических крыс обоего пола (рис. 4а, б). Функциональность памяти на 4-й день тестирования по сравнению с 1-м днем была ниже у гипоксических самцов ($p < 0.001$), а также у гипоксических самцов ($p = 0.011$) и самок ($p = 0.004$), подвергнутых введению флуоксетина (рис. 4а, б).

Уровень кортикостерона в плазме крови у взрослых самцов и самок крыс после тестирования памяти на 4-й день в водном лабиринте Морриса

Одномерный трехфакторный дисперсионный анализ был использован для обработки данных по содержанию кортикостерона в плазме крови. В качестве зависимых переменных рассматривали содержание кортикостерона, факторы включали: пол, условие (контроль, гипоксия), воздействие

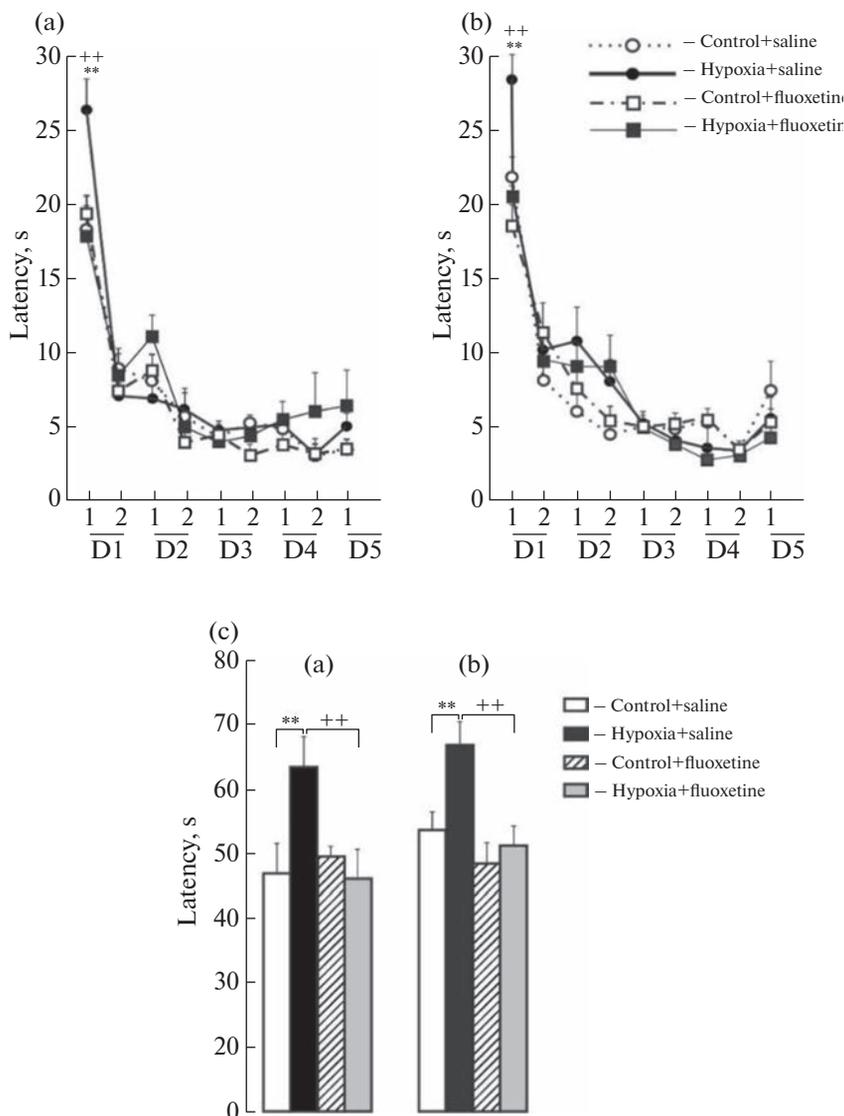


Рис. 3. Латентный период достижения платформы в водном лабиринте Морриса у самцов (а) и самок (б) взрослых крыс контрольной группы или подвергнутых воздействию гипоксии, а также введению флуоксетина или физиологического раствора в неонатальный период развития. Абсцисса: пробы (1, 2) и пять тренировочных дней (D1–D5). Ордината: латентный период (с) достижения платформы. (с): график иллюстрирует результаты статистического анализа в первый тренировочный день в пробе 1 у самцов (а) и самок (б). ** $p < 0.01$, контроль + физиологический раствор vs гипоксия + физиологический раствор; ++ $p < 0.01$, гипоксия + физиологический раствор vs гипоксия + флуоксетин. Данные представлены средними значениями \pm стандартные ошибки среднего.

(физиологический раствор, флуоксетин). Обнаружено значимое влияние факторов пол: $F_{(1,62)} = 36.4$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.370$ и условие: $F_{(1,62)} = 11.5$, $p = 0.001$, $\eta^2 = 0.158$ на содержание кортикостерона. Апостериорный анализ с поправкой по Бонферрони показал, что гипоксия увеличила содержание кортикостерона у самок крыс, по сравнению с контрольным значением ($p = 0.024$) (рис. 5b), но не изменила у самцов (рис. 5а).

Флуоксетин не изменил уровень гормона как у контрольных крыс, так и его повышенное содер-

жание у гипоксических крыс. При этом содержание кортикостерона в плазме крови у гипоксических самок с введением флуоксетина было выше, чем у контрольных самок с его введением ($p = 0.012$) (рис. 5b). Обращает на себя внимание более высокое содержание кортикостерона у контрольных ($p = 0.001$), гипоксических ($p = 0.024$) самцов, и у контрольных самцов с введением флуоксетина ($p = 0.001$) по сравнению с содержанием кортикостерона у самок соответствующих групп.

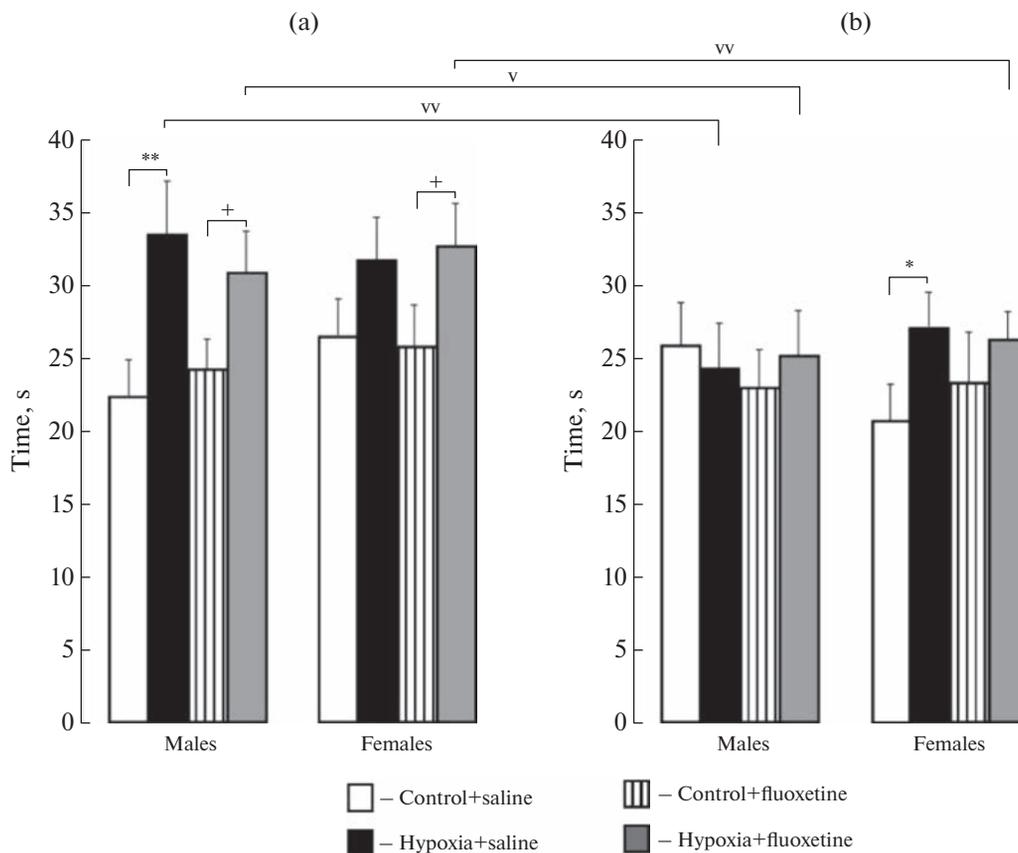


Рис. 4. Пространственная память на первый (а) и четвертый (б) дни тестирования без платформы в водном лабиринте Морриса у самцов и самок взрослых крыс контрольной группы или подвергнутых воздействию гипоксии, а также введению флуоксетина или физиологического раствора в неонатальный период развития. Ордината: время нахождения в целевом квадранте (с). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, контроль + физиологический раствор vs гипоксия + физиологический раствор; + $p < 0.05$, контроль + флуоксетин vs гипоксия + флуоксетин; $\gamma p < 0.05$, $^{\vee}p < 0.01$, память на первый vs четвертый дни тестирования. Данные представлены средними значениями \pm стандартные ошибки среднего.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование демонстрирует новые данные о влиянии неонатального стресса, вызванного умеренной гипоксией, на способность к пространственному обучению, функциональность пространственной памяти на разных сроках тестирования, реактивность ГГКС у взрослых самцов и самок крыс [17]. Гипоксия не изменила способность крыс обоего пола изучать местоположение платформы, о чем свидетельствует улучшение обучения с первого по пятый день тренировки. Только в первой пробе в первый из пяти дней тренировки обнаружено увеличение латентного периода достижения платформы в водном лабиринте Морриса у крыс обоего пола гипоксической группы по сравнению с контролем. Полученные результаты по исследованию памяти в тесте “Распознавание нового объекта” и водном лабиринте Морриса согласуются и свидетельствуют о том, что умеренная неонатальная гипоксия не вызвала дефицит памяти. Более того, гипоксия даже улучшила функциональность па-

мяти у самцов при тестировании долговременной памяти на 1-й день, а у самок — при тестировании на 4-й день по сравнению с соответствующими контрольными значениями. Тем не менее у гипоксических, но не контрольных крыс, обнаружены различия в сохранности пространственной памяти, о чем свидетельствует снижение памяти на 4-й день тестирования по сравнению с 1-м днем. Содержание кортикостерона в плазме крови было одинаково во всех группах самцов и характеризовалось более высокими показателями, чем у самок. Гипоксия увеличила реактивность ГГКС у самок, что сочеталось у них с более высокой функциональностью долговременной памяти. Флуоксетин ни в одной из групп крыс не оказал неблагоприятное влияние на исследованные когнитивные показатели, и даже нормализовал показатель пространственного обучения. Его введение также не нарушило улучшение памяти у самцов и самок, подвергнутых гипоксии.

Отсутствие нарушений в показателях обучения после первого дня тренировки, а также пространственной памяти, у гипоксических взрослых крыс

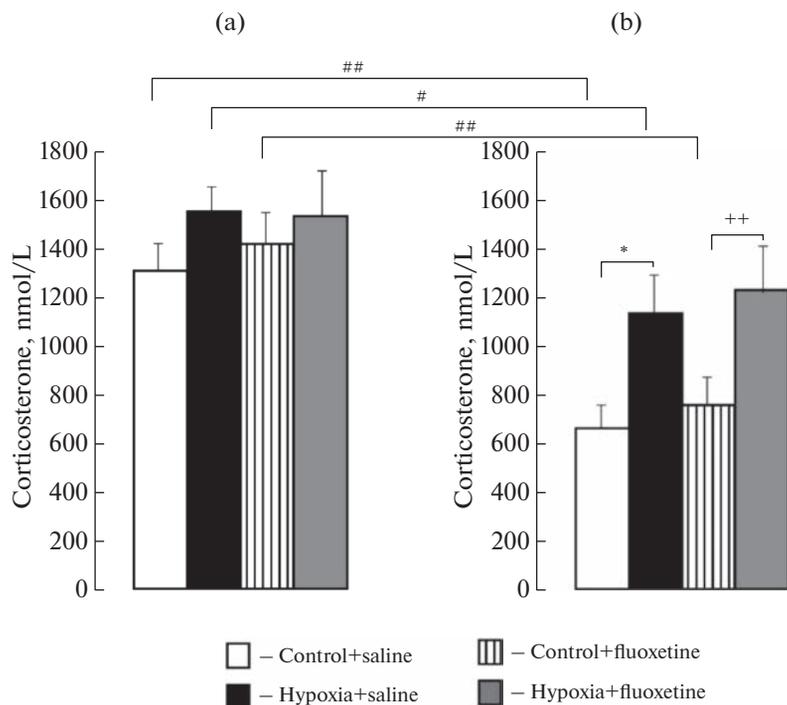


Рис. 5. Содержание кортикостерона в плазме крови у самцов (а) и самок (б) взрослых крыс контрольной группы или подвергнутых воздействию гипоксии, а также введению флуоксетина или физиологического раствора в неонатальный период развития. Ордината: содержание кортикостерона в плазме крови (нмоль/л). * $p < 0.05$, контроль + физиологический раствор vs гипоксия + физиологический раствор; ++ $p < 0.01$, контроль + флуоксетин vs гипоксия + флуоксетин, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, при сравнении половых различий. Данные представлены средними значениями \pm стандартные ошибки среднего.

по сравнению с контрольными значениями можно было бы объяснить использованием умеренной по степени и длительности нормобарической гипоксии, смоделированной путем снижения концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе, и вызывающей дефицит кислорода у новорожденных крысят. Как уже упоминалось во вступлении, имеются многочисленные данные о повреждающем влиянии гипоксии-ишемии на когнитивные, физиологические и морфогенетические показатели у грызунов [12, 13]. В небольшом числе работ, в которых исследовали влияние перинатальной нормобарической гипоксии без ишемии на пространственное обучение и память у грызунов, получены не однозначные результаты. Например, гипоксия (8% кислорода, продолжительность 120 мин) у крысят линии Wistar в возрасте двух дней не вызвала изменений в пространственной памяти в лабиринте Барнса при достижении 41–47 дней жизни [24]. При этом пренатальная нормобарическая гипоксия (7% кислорода, продолжительность 180 мин) на 14-й день беременности у крыс линии Wistar вызвала нарушение памяти в тесте “Распознавание нового объекта” у 20–30-дневного потомства [25]. Аноксия (100% азотная смесь, продолжительность 25 мин) однодневных крысят линии Wistar вызыва-

ла дефицит пространственной памяти в водном лабиринте Морриса при тестировании в возрасте 60 дней [26]. Умеренную гипоксию на взрослых млекопитающих животных часто применяют для повышения резистентности нервной системы к дальнейшему влиянию другого типа стресса, при этом акцентируется внимание на том, что в адаптивном механизме устойчивости мозга к дальнейшему влиянию нового стресс-фактора участвуют глюкокортикоиды [9]. Однако, как было показано ранее, умеренная нормобарическая неонатальная гипоксия не защитила у молодых крыс когнитивные способности в условиях добавления нового стресса (звуковой сигнал), который вызывал у животных дефицит памяти [24]. Перечисленные различия во влиянии гипоксии связаны с разными условиями гипоксического воздействия, возрастными характеристиками, а также используемым тестом для оценки последствий гипоксии, и самим дизайном экспериментов.

При изучении влияния пренатальной нормобарической гипоксии показано отклонение в развитии гиппокампа у крыс более раннего возраста по сравнению с возрастом крыс, исследованных в нашей работе. Так, у крыс в возрасте 23 дней жизни в морфометрических характеристиках пирамидного

слоя поля CA1 гиппокампа выявлено снижение числа клеток после гипоксии [25]. При использовании трансмиссионной электронной микроскопии обнаружено, что неонатальная аноксия индуцировала у 60-дневных крыс изменения в гиппокампе, приводящие к потере клеток и нарушению его функций. После сопоставления данных морфогенеза с поведенческими показателями авторы выдвинули предположение о связи изменений в гиппокампе с дефицитом пространственной памяти [26].

Отсутствие повреждающего влияния гипоксии на когнитивные показатели у взрослых крыс в нашей работе может быть связано и с нейрогенезом в гиппокампе. Показано, что в гиппокампе взрослых млекопитающих нейрогенез усиливает нейрональную пластичность, которая лежит в основе памяти [27, 28]. Результаты изучения, не исследованного ранее процесса нейрогенеза в ходе постнатального развития, позволило предположить, что функция нейронов, которые генерируются в зубчатой извилине в раннем подростковом возрасте и которые определяют появление пространственной навигации, является временной. При достижении половозрелого состояния в данной структуре гиппокампа появляются новые нейроны, выполняющие адаптивную функцию, что свидетельствует о вовлечении нейрогенеза в эти процессы [29, 30]. Поскольку мы не оценивали нейрогенез, мы можем только предполагать, что интенсивность и продолжительность примененного нами гипоксического стресса могут способствовать образованию новых нейронов в структурах гиппокампа у взрослых крыс и усилению пространственной памяти по сравнению с контрольными показателями.

Нивелированию вредных последствий гипоксии и усилению функциональности памяти также, вероятно, сопутствовал хэндлинг животных. Действительно, в нашем эксперименте крысята после гипоксии каждый раз подвергались взятию в руки после уколов флуоксетина или физиологического раствора в течение двух недель. Возможное протективное влияние хэндлинга при изучении последствий гипоксии-ишемии обсуждалось в литературе [31]. Кроме того, сочетание хэндлинга и исследование крыс в двух разных тестах, в наших экспериментах (тест распознавание нового объекта, а затем водный лабиринте Морриса) также могли привести к улучшению исследованных показателей. О модифицирующем влиянии сочетания стрессорных воздействий на поведенческий и физиологический ответы сообщалось нами ранее [32].

Данные о более слабой эффективности сохранения памяти на 4-й день тестирования по сравнению с 1-м днем тестирования у гипоксических крыс обоего пола, но отсутствие таких различий у контрольных крыс может указывать на разный механизм влияния гипоксии на синаптические процессы, вовлеченные в организацию памяти. В основе пространственной памяти первого и четвертого

дней тестирования после удаления платформы из бассейна лежат разные формы синаптической пластичности – кратковременная пластичность и долговременная потенциация, которые в разной степени зависят от активации рецепторов глутамата, играющего центральную роль в формировании памяти [33]. Глутаматергическая система участвует в регуляции памяти с помощью нескольких типов рецепторов, обнаруженных во всех областях кортиколимбических структур мозга. Увеличение времени пребывания в целевом квадранте у гипоксических самцов при тестировании памяти на первый день после удаления платформы, а у гипоксических самок при тестировании памяти на четвертый день может свидетельствовать об активации долговременной потенциации. В этом плане интересны данные о долговременном влиянии ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, хроническое введение которого осуществлялось нами сразу после однократного воздействия гипоксией двухдневных крысят. Протестированное нами влияние флуоксетина показало, что у контрольных крыс обоего пола флуоксетин не вызвал изменений в функциональности памяти, а в условиях, созданных гипоксией, сохранил усиление памяти первого дня тестирования у гипоксических самцов и памяти четвертого дня тестирования у гипоксических самок. Наши данные позволяют предполагать, что неонатальное введение флуоксетина гипоксическим крысам не оказывает влияния на долговременную потенциацию у гипоксических самцов и самок.

Увеличение времени пребывания в целевом квадранте в водном лабиринте Морриса у гипоксических самок и отсутствие изменений в этом показателе у гипоксических самцов сочетались с увеличением у первых содержания кортикостерона в плазме крови и отсутствием изменений в этом показателе у вторых. По данным литературы [17], тестирование в лабиринте Морриса вызывает у грызунов стресс, сопровождающийся изменением реактивности ГГКС (по содержанию кортикостерона в плазме крови). Уровень кортикостерона во всех группах был выше у самцов, чем у самок, что может быть связано с более ранней адаптацией процесса высвобождения кортикостерона в ответ на хронический стресс у самок [34, 35].

Флуоксетин не изменил содержание кортикостерона у контрольных крыс и не изменил также повышенный уровень этого стресс-гормона у гипоксических крыс обоего пола, т.е. введение флуоксетина не повлияло на содержание кортикостерона. Тесное взаимодействие ГГКС с серотонинергической системой в ответ на стресс в зависимости от пола подтверждают данные о том, что привыкание к стрессу сопровождается увеличением чувствительности пресинаптических рецепторов 5-HT_{1A} у самцов, но повышением чувствительности постсинаптических рецепторов 5-HT_{1A} у крыс обоего пола [36, 37]. Серотонин, как

уже упоминалось, участвует в регуляции функции гиппокампа, играющего ведущую роль в формировании пространственной памяти [15].

Половые различия во влиянии гипоксии на исследуемые нами системы связаны с половыми гормонами, которые модулируют пре- и постнатальное развитие многих систем, включая ГГКС и когнитивную систему, поэтому в ходе развития крысят могут определять влияние глюкокортикоидов и на когнитивные процессы. Под влиянием половых гормонов изменяется синаптическая пластичность — ключевой механизм памяти [25, 27, 38]. Ранее было обнаружено, что стресс, вызванный неонатальной нормобарической гипоксией, вызывает у новорожденных крыс усиление секреции кортикостерона и тестостероновой волны [8]. Вызванное гипоксией увеличение уровня тестостерона в первые два дня после рождения (во время нормального неонатального всплеска тестостерона) программирует последующую активность ГГКС. Нормальная динамика тестостерона у новорожденных необходима для правильного развития ГГКС и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. На основании результатов исследований, проведенных на гипоксических взрослых крысах, авторами был сделан вывод, что острая гипоксия в неонатальный период развития может иметь долгосрочные последствия для ГГКС и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы в зависимости от полового диморфизма [8].

Хотя мы не определяли стадию эстрального цикла у самок перед забором крови, полученные нами данные указывают на различное влияние гипоксии на показатели пространственной памяти в разные сроки тестирования и на уровень кортикостерона у разнополых взрослых особей. Имеющиеся данные о влиянии фаз эстрального цикла, касающиеся влияния стероидов яичников на когнитивные процессы, не всегда убедительны. В настоящее время полагают, что эстрадиол оказывает активационный эффект на пространственную память, опосредованную гиппокампом, как у особей женского, так и мужского пола [38]. Фактически, эстрогены являются важными модуляторами памяти и нейронной функции у обоего пола. Хотя эстрогены производятся в основном фолликулярным аппаратом яичников, но также присутствуют в семенниках у особей мужского пола, где они могут достичь концентрации, типичной для женского организма. Локальный синтез эстрогенов в гиппокампе также важен для процессов памяти у особей обоего пола. Поскольку стресс влияет на производство половых гормонов, исследование влияния эстрального цикла имеет важное значение как для нейробиологии, так и клиники, а также для развития терапии когнитивной сферы [39].

Таким образом, неонатальная умеренная нормобарическая гипоксия в нашем исследовании не изменила или даже усилила функциональность па-

мяти в зависимости от времени тестирования памяти и пола животных. Обнаружено долговременное протективное влияние флуоксетина, хроническое неонатальное введение которого нормализовало способность к обучению, не изменило функциональность памяти и реактивность ГГКС у контрольных и гипоксических крыс обоего пола. Содержание кортикостерона во всех группах самцов было выше по сравнению с содержанием данного гормона у самок. Гипоксия увеличила реактивность ГГКС у самок, что сочеталось у них с более высокой сохранностью памяти. Снижение памяти на 4-й день по сравнению с первым днем тестирования у самцов и самок крыс, подвергнутых действию неонатальной гипоксии и флуоксетина, может указывать на уменьшение синаптической пластичности в областях гиппокампа, вовлеченных в процессы консолидации и сохранения памяти. Полученные новые данные с использованием умеренной по интенсивности и длительности неонатальной нормобарической гипоксии расширяют представление о долговременном влиянии гипоксии на пространственную память и реактивность ГГКС в зависимости от половой принадлежности и подчеркивают отсутствие вредного влияния флуоксетина на функциональность памяти как у контрольных животных, так и после воздействия гипоксии в ранний постнатальный период развития.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено в соответствии с международными принципами биомедицинских исследований с использованием животных (CIOMS, Женева, 1985). Экспериментальный протокол был утвержден Комитетом по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 02/09 от “09” февраля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.), сбор данных (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.), обработка данных (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.), написание и редактирование манускрипта (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность старшим лаборантам-ассистентам лаборатории онтогенеза нервной системы Е.Н. Лавровой и Н.А. Улановой, за помощь в проведении экспериментов, а также д.б.н. Е.И. Тюльковой (лаб. регуляции функций нейронов мозга, профессор РАН, зав. лаб., д.б.н. Е.А. Рыбникова) за проведение количественного анализа кортикостерона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG (2017) Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front Cell Neurosci* 19: 11–87. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
2. Giannopoulou I, Pagida MA, Briana DD, Panayotacopoulou MA (2018) Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. *Hormones (Athens)* 17: 25–32. <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0007-7>
3. Matthews SG, McGowan PO (2019) Developmental programming of the HPA axis and related behaviours: epigenetic mechanisms. *J Endocrinol* 242: 69–79. <https://doi.org/10.1530/joe-19-0057>
4. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ (2014) The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J Neuroendocrinol* 26: 707–723. <https://doi.org/10.1111/jne.12175>
5. Renz H, Adkins BD, Bartfeld S, Blumberg RS, Farber DL, Garssen J, Ghazal P, Hackam DJ, Marstrand BJ, McCoy KD, Penders J, Prinz I, Verhasselt V, von Mutius E, Weiser JN, Wesemann DR, Hornef MW (2018) The neonatal window of opportunity-early priming for life. *J Allergy Clin Immunol* 141 (4): 1212–1214. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.019>
6. Rice D, Barone Jr S (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives* 108: 511–533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>
7. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
8. Gehrland AL, Phillips J, Malott K, Raff H (2020) Corticosterone, adrenal, and the pituitary-gonadal axis in neonatal rats: effect of maternal separation and hypoxia. *Endocrinology* 161: bqaa085. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa085>
9. Rybnikova E, Nalivaeva N (2021) Glucocorticoid-dependent mechanisms of brain tolerance to hypoxia. *Int J Mol Sci* 22: 7982. <https://doi.org/10.3390/ijms22157982>
10. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z (2017) Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Front Cell Neurosci* 11: 78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
11. Semenov DG, Belyakov AV, Rybnikova EA (2022) Experimental modeling of damaging and protective hypoxia of the mammalian brain. *J Evol Biochem Physiol* 58: 2021–2034. <https://doi.org/10.1134/s0022093022060291>
12. Sanches EFF, Arteni NSS, Nicola F, Boisserand L, Willborn S, Netto CAA (2013) Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* 237: 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.066>
13. Duran-Carabali LE, Odorcyk FK, Sanches EF, de Mattos MM, Anschau FCA, Netto CAA (2022) Effect of environmental enrichment on behavioral and morphological outcomes following neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: a systematic review and meta-analysis affilia-tions expand. *Mol Neurobiol* 59: 1970–1991. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02730-9>
14. Khozhai LI, Otellin VA (2022) Distribution of GABAergic neurons and expression levels of GABA transporter 1 in the rat neocortex during the neonatal period after perinatal hypoxic exposure. *J Evol Biochem Physiol* 58: 1432–1441. <https://doi.org/10.1134/S0022093022060023>
15. Bombardi C, Grandis A, Pivac N, Sagud M, Lucas G, Chagraoui A, Lemaire-Mayo V, De Deurwaerdere P, Di Giovanni G (2021) Serotonin modulation of hippocampal functions: From anatomy to neurotherapeutics. *Progress Brain Res* 261: 83–158. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2021.01.031>
16. Carneiro IBC, Toscano AE, da Cunha MSB, Lacerda DC, Pontes PB, de Castro RM, de Jesus Deiró TCB, Medeiros JMB (2022) Serotonergic mechanisms associated with experimental models of hypoxia: a systematic review. *Int J Dev Neurosci* 82(8):668–680. <https://doi.org/10.1002/jdn.10226>
17. Vorhees CV, Williams MT (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J* 55: 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
18. Nagano R, Nagano M, Nakai A, Takeshita T, Suzuki H (2017) Differential effects of neonatal SSRI treatments on hypoxia-induced behavioral changes in male and female offspring. *Neuroscience* 360: 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.051>
19. Tate K, Kirk B, Tseng A, Ulfers A, Litwa K (2021) Effects of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on developing neural circuits in a model of the human fetal cortex. *Int J Mol Sci* 22:10457. <https://doi.org/10.3390/ijms221910457>
20. Khodanovich M, Kisel A, Kudabaeva M, Chernysheva G, Smolyakova V, Krutenkova E (2018) effects of fluoxetine on hippocampal neurogenesis and neuroprotection in the model of global cerebral ischemia in rats. *Int J Mol Sci* 19: 162. <https://doi.org/10.3390/ijms19010162>
21. Dobbing J (1981) Nutritional growth restriction and the nervous system. Davidson AN, Thompson RHS (Eds.), *The Molecular Basis of Neuropathology*. Edward Arnold Co. London. 221–233.
22. Cohen SJ, Stackman RW (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object behavior. *Brain Res* 285: 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
23. Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12: 239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
24. Sukhanova IuA, Sebentsova EA, Khukhareva DD, Vysokikh MYu, Bezuglov VV, Bobrov MYu, Levitskaya NG (2019) Early-life N-arachidonoyl-dopamine exposure increases antioxidant capacity of the brain tissues and reduces functional deficits after neonatal hypoxia in rats. *Int J Dev Neurosci* 78: 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.06.007>
25. Zhuravin IA, Dubrovskaya NM, Vasilev DS, Postnikova TY, Zaitsev AV (2019) Prenatal hypoxia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats. *Neurobiol Learn Mem* 164: 107066. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107066>

26. Takada SH, Dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe I-S, Nogueira MI (2015) Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* 284: 247–259.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.054>
27. Toda T, Gage FH (2018) Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res* 373: 693–709.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
28. Kempermann G (2022) What is adult hippocampal neurogenesis good for? *Front Neurosci* 16: 852680.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.852680>
29. Bond AM, Ming G-I, Song H (2022) What is the relationship between hippocampal neurogenesis across different stages of the lifespan? *Front Neurosci* 16: 891713.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.891713>
30. Masachs N, Charrier V, Farrugia F, Lemaire V, Blin N, Mazier W, Tronel S, Montaron M-F, Ge S, Marsicano G, Cota D, Deroche-Gamonet V, Herry C, Abrous DN (2021) The temporal origin of dentate granule neurons dictates their role in spatial memory. *Mol Psychiatry* 26: 7130–7140.
<https://doi.org/10.1038/s41380-021-01276-x>
31. Munsant A, Shrivastava K, Recasens M, Giménez-Llort L (2019) Severe perinatal hypoxic-ischemic brain injury induces long-term sensorimotor deficits, anxiety-like behaviors and cognitive impairment in a sex-, age- and task-selective manner in C57BL/6 mice but can be modulated by neonatal handling. *Front Behav Neurosci* 13: 7.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00007>
32. Butkevich IP, Mikhailenko VA (2018) Effect of fluoxetine in prenatal period on nociceptive system reactivity and psychoemotional behavior in young female rats. *Bull Exp Biol Med* 165: 209–212.
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4131-9>
33. France G, Volianskis R, Ingram R, Bannister N, Rothärmel R, Irvine MW, Fang G, Burnell ES, Sapkota K, Costa BM, Vhpra DA, Michael-Titus AT, Monaghan DT, Georgiou J, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL, Volianskis A (2022) Differential regulation of STP, LTP and LTD by structurally diverse NMDA receptor subunit-specific positive allosteric modulators. *Neuropharmacology* 202: 108840.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108840>
34. Luine V (2002) Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. *Stress* 5: 205–216.
<https://doi.org/10.1080/1025389021000010549>
35. Luine V, Gomez J, Beck K, Bowman R (2017) Sex differences in chronic stress effects on cognition in rodents. *Pharmacology, Biochem Behav* 152: 13–19.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.08.005>
36. Goel N, Philippe TJ, Chang J, Koblanski ME, Viau V (2022) Cellular and serotonergic correlates of habituated neuroendocrine responses in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 136: 105599.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105599>
37. Philippe TJ, Bao L, Koblanski ME, Viau V (2022) Sex differences in serotonin 5-HT 1A receptor responses to repeated restraint stress in adult male and female rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 25: 863–876.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyac046>
38. Taxier LR, Gross KS, Frick KM (2020). Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nat Rev Neurosci* 21: 535–550.
<https://doi.org/10.1038/s41583-020-0362-7>
39. Rocks D, Kundakovic M (2022) Hippocampus-based behavioral, structural, and molecular dynamics across the estrous cycle. *J Neuroendocrinol* e13216.
<https://doi.org/10.1111/jne.13216>

EFFECTS OF NEONATAL HYPOXIA AND ANTIDEPRESSANT FLUOXETINE ON COGNITIVE AND STRESS-HORMONAL FUNCTIONS IN ADULT RATS

V. A. Mikhailenko^{a,#}, I. P. Butkevich^a, and E. A. Vershinina^a

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

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

The ability to spatial learning and the functionality of the spatial memory, and also the stressful reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis (the HPA axis) were investigated in adult male and female rats, subjected to moderate acute hypoxia on the 2nd day of life, and then to chronic administration of the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. When testing the ability to spatial training in adult rats subjected to neonatal hypoxia, an increase in the latent period of reaching the platform in the Morris water maze in the first try in the first of five days of training was found. The results of memory analysis in the novel object recognition test and in the Morris water maze testify that hypoxia did not cause memory deficiency in adult animals. Moreover, hypoxia improved the memory indices on the first day in males and on the fourth day in females after removing the platform from the pool compared to the corresponding control values. The content of corticosterone in blood plasma of males in response to memory testing did not differ between control and experimental groups and was characterized by higher rates than in females of corresponding groups. Hypoxia increased the HPA axis reactivity in females, which was combined with a longer memory storage. Fluoxetine normalized the indicator of spatial learning, did not cause changes in control animals and did not change the identified improvement of memory in hypoxic rats without administration of this drug. The new data obtained expand the idea of the long-term effect of neonatal normobaric moderate hypoxia on the spatial memory and the HPA axis reactivity depending on sex and emphasize the absence of the harmful effect of fluoxetine on spatial memory in both control rats and in rats with the effects of hypoxia.

Key words: neonatal moderate hypoxia, long-term consequences of hypoxia, corticosterone, spatial learning and memory

ВЛИЯНИЕ ПРЕДСЕРДНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА ТРАНСМУРАЛЬНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ СТЕНОК ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ЗОЛЕТИЛ-КСИЛАЗИНОВОМ НАРКОЗЕ

© 2023 г. В. П. Нужный¹, Н. А. Киблер^{1,*}, А. С. Цветкова¹, С. Н. Харин¹, А. Б. Байрхаев, Д. Н. Шмаков¹

¹Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

*e-mail: natanadya@mail.ru

Поступила в редакцию 09.01.2023 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Исследована трансмуральная последовательность деполяризации свободных стенок желудочков сердца крыс линии Вистар при увеличении частоты сердечных сокращений на фоне золетил-ксилазинового наркоза. Увеличение частоты сердечных сокращений вызывали посредством предсердной электрической стимуляции. Золетил-ксилазиновый наркоз при внутримышечном введении в дозе 0.15 мг/кг золетила и 3 мг/кг ксилазина вызвал значительный отрицательный хронотропный эффект с резко выраженной брадикардией, характеризующейся уменьшением частоты сердечных сокращений от исходной в два раза. При сниженном синусно-предсердном ритме с частотой 237 ± 34 уд/мин первоначально деполяризовались субэндокардиальные слои, затем интрамуральные и далее субэпикардиальные слои левой и правой свободных стенок желудочков сердца. Области оснований свободных стенок желудочков деполяризовались позже верхушечных областей приблизительно на 2–4 мс также движением волны активации от эндокарда к эпикарду. При увеличении частоты сердечных сокращений последовательность и трансмуральный градиент деполяризации не изменялись. Вместе с тем увеличение частоты стимуляции от 300 до 500 уд/мин приводило к уменьшению времени прибытия волны деполяризации к субэндокардиальным, интрамуральным и субэпикардиальным слоям стенок левого и правого желудочков. Несмотря на депрессивное действие золетил-ксилазинового наркоза на сердце и его хронотропную функцию, при высокой частоте предсердной электрической стимуляции градиент деполяризации от эндокарда к эпикарду и от верхушки к основанию желудочков сохранялся, происходили лишь незначительные изменения длительности процесса трансмуральной деполяризации стенок желудочков сердца. Это свидетельствует о резистентности активации желудочков сердца крыс линии Вистар к токсическому действию золетил-ксилазинового наркоза.

Ключевые слова: золетил-ксилазиновый наркоз, электрическая стимуляция, последовательность деполяризации, желудочки сердца, крысы

DOI: 10.31857/S0044452923030075, **EDN:** YHUEQA

ВВЕДЕНИЕ

Последовательность деполяризации миокарда желудочков играет ведущую роль в формировании начального желудочкового комплекса QRS ЭКГ. Ранее нами были подробно изучены пространственно-временные параметры процессов активации желудочков сердца и исследована их корреляция с элементами комплекса QRS у разных классов позвоночных животных [1].

При моделировании и изучении болезней сердца человека широкое распространение получили электрокардиографические методы исследования [2–4]. К настоящему времени за рубежом при про-

ведении острых опытов, чаще всего на крысах, хорошо изучено действие на сердечно-сосудистую систему кетамин-ксилазинового наркоза [5–7]. В ветеринарной практике и физиологических экспериментах для наркотизации крыс также широко используется золетил, а в качестве анальгетика и мышечного релаксанта — ксилазин. По данным исследователей при действии золетила у крыс происходит увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС) [8–11], которая выше по сравнению с ЧСС у животных, наркотизированных кетаминном, изофлураном, пентобарбиталом и кетамин/ксилазином [6, 12]. В противоположность золетилу, ксилазин угнетает сердечную деятельность [8] и ока-

зывает значительное отрицательное хронотропное воздействие на сердце [5]. Установлено, что для крыс сочетание ксилазина с золетилом является крайне токсичным и сильнодействующим сердечно-сосудистым депрессантом [8, 13].

Методами электрокардиографии изучено влияние различных анестетиков на ЧСС, длительность зубцов P, комплексов QRS, зубцов T и интервалов P-Q, Q-T [2–4]. Вместе с тем полученные разными авторами показатели ЭКГ значительно отличаются. Так, длительность комплекса QRS у крыс линии Wistar, анестезированных уретаном, составила 14–16 мс, кетамин в сочетании с ксилазином – 17–25 мс, пентобарбиталом – 18–19.6 мс, эфиром – 18–28 мс [14]. Влияние того или иного вида наркоза на механизм формирования зубцов, комплексов ЭКГ, в частности комплекса QRS, остается малоизученным. Поскольку последовательность процесса деполяризации миокарда лежит в основе механизма формирования ЭКГ [1], а комбинация золетила с ксилазином вызывает отрицательную хронотропную и депрессивную реакцию сердца, особый интерес представляет вопрос о сочетании влияния золетил-ксилазинового наркоза и высокой ЧСС, индуцированной электрокардиостимуляцией, на трансмуральную последовательность и длительность процесса деполяризации стенок желудочков сердца и их соотношение с комплексом QRS. Ранее нами [15] был подробно изучен процесс активации миокарда желудочков у белых лабораторных крыс линии Вистар и исследована корреляция показателей пространственно-временных фронтов волны деполяризации с элементами комплекса QRS при синусно-предсердном ритме. Целью настоящей работы являются исследование влияния увеличения ЧСС посредством предсердной электрокардиостимуляции на трансмуральную последовательность деполяризации стенок желудочков сердца у крыс линии Вистар и длительность комплекса QRS ЭКГ на фоне золетил-ксилазинового наркоза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на 30 взрослых самцах крыс линии Вистар. Животных наркотизировали золетилом (15 мг/кг, внутримышечно) и после их засыпания для миорелаксации внутримышечно вводили ксилазин в дозе 3 мг/кг. Затем животных переводили на искусственную вентиляцию легких с помощью медицинского компрессора Newport Breeze E-150 Ventilator. Вскрытие грудной клетки осуществляли по среднегрудинной линии, после чего разрезали перикард. Температура тела крысы поддерживалась на уровне 37–38°C, сердце смачивалось теплым физиологическим раствором.

Регистрация миокардиальных электрограмм производилась с помощью игольчатых электродов. Каждый игольчатый электрод содержал четыре макроэлектрода. Игольчатые электроды вводились

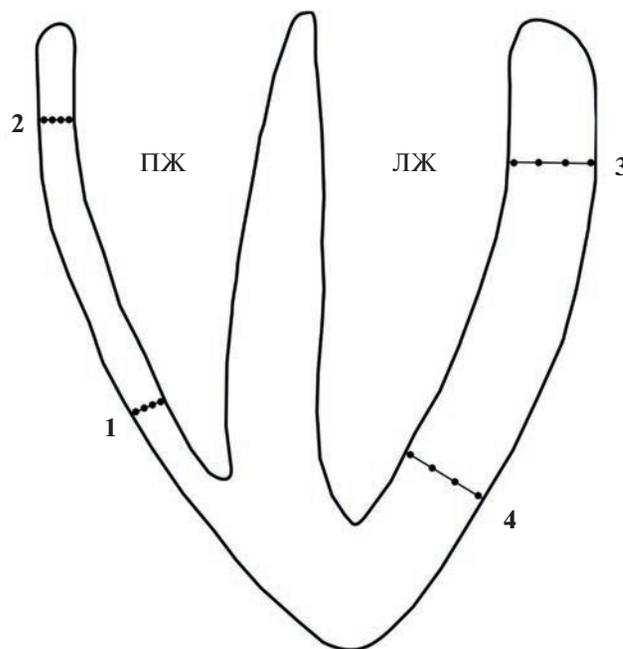


Рис. 1. Схема расположения игольчатых интрамуральных электродов (1–4) в свободных стенках правого (ПЖ) и левого (ЛЖ) желудочков сердца крысы.

перпендикулярно миокардиальным стенкам в областях основания и верхушки ЛЖ и ПЖ (рис. 1). Длина интрамуральных игольчатых электродов соответствовала предполагаемой толщине свободных стенок желудочков в зонах их введения.

Момент прихода волны возбуждения в область отведения потенциала (время деполяризации) определялся по минимуму первой производной внеклеточных потенциалов (электрограмм) (dV/dt_{\min}) в период комплекса QRS.

Частоту сердечных сокращений изменяли посредством электрокардиостимуляции при помощи диагностического электрокардиостимулятора ЧЭЭКС п-3 “Вектор-МС”, в диапазоне от исходного синусно-предсердного ритма, возникшего в результате воздействия ксилазина, до максимальной частоты сердечных сокращений, при которой возникали нарушения деятельности сердца. Стимулировали ушко правого предсердия импульсами прямоугольной формы длительностью 2 мс и амплитудой 3.5 V. Частоту сердечных сокращений изменяли от 300 уд/мин и выше с шагом 50 уд/мин.

В начале эксперимента до введения в наркоз у животных производили регистрацию электрокардиограммы в отведениях от конечностей. Для регистрации ЭКГ использовали устройство собственной конструкции (“крысиную нору”), выполненное из темного оргстекла в виде полуцилиндра с закрытой с одной стороны торцевой частью. К расположенному по продольной оси полуцилиндра основанию прикрепляли изолированные друг от

Таблица 1. Время деполяризации субэндокардиальных, интрамуральных и субэпикардиальных слоев миокарда желудочков сердца крыс и длительность комплекса QRS при синусно-предсердном и искусственных ритмах

Область желудочков	Слои желудочков	Синусно-предсердный ритм	Предсердный искусственный ритм				
			300	350	400	450	500
Частота сердечных сокращений, уд/мин		237 ± 34	300	350	400	450	500
Основание левого желудочка	1	6.7 ± 3.3*	6.3 ± 1.3*	5.5 ± 2*	5.4 ± 1.3*	5.8 ± 2*	5.5 ± 2.9*
	2	8.5 ± 3.1	8.3 ± 2.2	7.5 ± 1.3	6.7 ± 1.4	7.9 ± 2.2	7.5 ± 3.5
	3	9.6 ± 3.6	10.4 ± 2.4	9.6 ± 2.2	8.8 ± 2.1	9.8 ± 2.4	8.5 ± 3.7
Верхушка левого желудочка	1	3.6 ± 2.1*	3.6 ± 1.4*	3.5 ± 2*	3.2 ± 1.6*	3.9 ± 1.4*	3.7 ± 2.3*
	2	5.8 ± 2.7	5.7 ± 1.9	5.2 ± 2.2	5 ± 2	7.3 ± 3	5.5 ± 2.1
	3	7.5 ± 3.1	7.6 ± 2.3	6.1 ± 2.3	6.3 ± 2	9.7 ± 2.9	7.3 ± 1
Основание правого желудочка	1	12 ± 5.3*	10 ± 1.3*	9.7 ± 0.6*	8.9 ± 1.6*	9.3 ± 1.5*	9.2 ± 0.4*
	2	13.6 ± 4.7	10.7 ± 1.2	10.6 ± 0.8	10.3 ± 1.8	10.4 ± 1.6	10 ± 0.6
	3	14.4 ± 4.4	11.6 ± 1.1	11 ± 1.1	11.3 ± 1.5	12.2 ± 1.8	10.7 ± 0.4
Верхушка правого желудочка	1	9.4 ± 4.4*	7.9 ± 1.3*	8.4 ± 1.2*	7.5 ± 1.9*	8 ± 1.5*	7.7 ± 1*
	2	10.9 ± 4.4	10.3 ± 1.3	9.8 ± 1.2	8.9 ± 2	10.3 ± 2.1	10 ± 1.1
	3	12.2 ± 4.4	11.8 ± 1.6	10.3 ± 1.2	10.1 ± 2.1	11.8 ± 1.9	11.1 ± 0.4
Длительность QRS, мс		20.5 ± 6.3	22.1 ± 4.1	20.1 ± 3.8	19.5 ± 2.9	15.2 ± 2.1 [^]	12.8 ± 0.8 [^]

Примечание: субэндокардиальные (1), интрамуральные (2) и субэпикардиальные слои (3).

* $p < 0.01$ – время возбуждения субэндокардиальных слоев (1) по отношению к субэпикардиальным (3).

[^] $p < 0.01$ – длительность комплекса QRS по отношению к синусно-предсердному ритму.

друга четыре металлические пластины, которые служили отводящими электродами для регистрации ЭКГ. Перед записью ЭКГ их покрывали электропроводной пастой и далее животное запускали в “крысиную нору”. Исключение процедуры прикрепления электродов к животным уменьшало стрессовое влияние, и при записи ЭКГ они находились в более спокойном состоянии.

Результаты деполяризации субэндокардиальных, интрамуральных и субэпикардиальных слоев стенок желудочков анализировали с помощью программы для медико-биологической статистики BIOSTAT 4.03. с использованием непараметрических критериев Уилкоксона. Для оценки различий параметров до и после воздействия применяли критерий Стьюдента с применением поправки Бонферрони (с учетом множественных сравнений). Данные представлены в виде средней арифметической и стандартного отклонения средней. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частота сердечных сокращений до проведения анестезии у бодрствующих крыс линии Wistar составила 446.2 ± 18.4 уд/мин, длительность комплекса QRS – 17.1 ± 1.0 мс. При анестезии золетил-ксилазиновым раствором после торакотомии по сравне-

нию с интактными животными произошло уменьшение ЧСС с 446.2 ± 18.4 уд/мин до 237 ± 34 уд/мин ($p < 0.001$) и незначительное увеличение длительности комплекса QRS с 17.1 ± 1.0 мс до 20.5 ± 6.3 мс. При увеличении частоты стимуляции от 450 до 500 уд/мин наблюдалось уменьшение длительности комплекса QRS ($p < 0.01$) (табл. 1).

При синусно-предсердном ритме с частотой 237 ± 34 уд/мин первоначально деполяризовались субэндокардиальные слои, затем интрамуральные и далее субэпикардиальные слои свободных стенок в области верхушек и оснований как левого, так и правого желудочков (табл. 1). Так, в областях введения электродов первоначально деполяризовались зоны миокарда, расположенные в субэндокарде верхушечной трети ЛЖ (рис. 2а, 1) и в субэндокарде верхушечной трети ПЖ (рис. 3а, 1), затем интрамуральные слои и несколько позже – зоны субэпикарда стенок желудочков.

Как в правом, так и левом желудочках вся толщина свободных стенок в области верхушки деполяризовалась на 2 мс раньше основания.

Таким образом, при сниженном в результате воздействия золетил-ксилазинового наркоза синусно-предсердном ритме первоначально деполяризовались области субэндокарда верхушки ЛЖ и ПЖ с последующим движением волны активации к эпикарду. Области оснований свободных стенок желудочков деполяризовались позже верхушечных

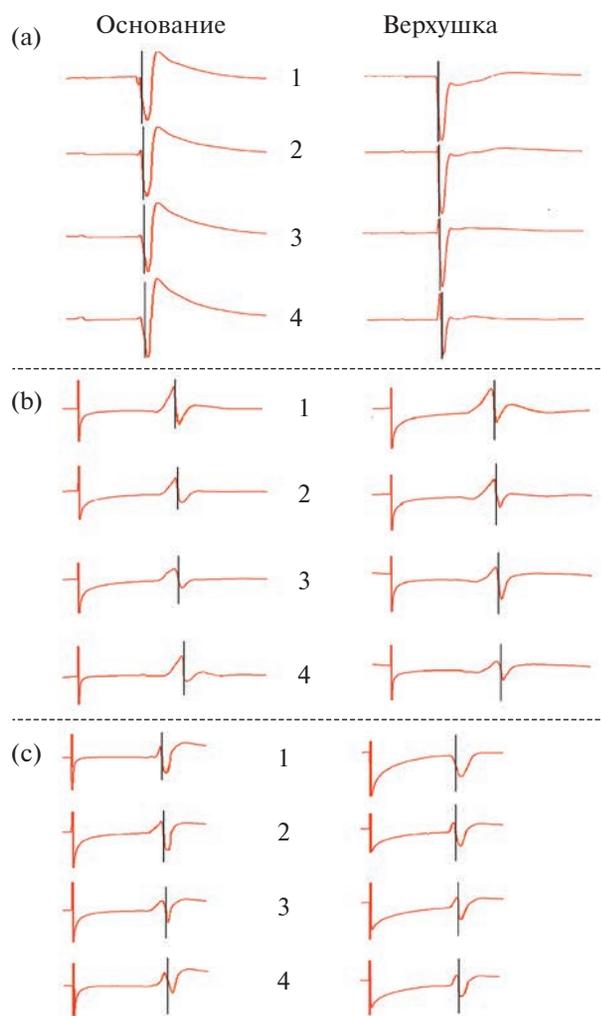


Рис. 2. Электрограммы (ЭГ) от интрамуральных игольчатых электродов, введенных в области основания и верхушки свободной стенки левого желудочка сердца крысы при синусно-предсердном (а), искусственных ритмах 300 уд/мин (б) и 500 уд/мин (с). 1 – субэндокард, 2,3 – интрамуральные слои, 4 – субэпикард. Момент прибытия волны возбуждения к электродам отмечен пересекающими ЭГ вертикальными линиями. Слева от ЭГ расположен стимулирующий импульс.

областей приблизительно на 2–4 мс, при этом эндокард также возбуждался раньше эпикарда.

При увеличении частоты стимуляции от 300 до 500 уд/мин волна возбуждения в свободных стенках обоих желудочков, как и при синусно-предсердном ритме, двигалась в направлении от эндокарда к эпикарду. Градиент деполяризации от эндокарда к эпикарду и от верхушки к основанию желудочков сохранялся при всех частотах стимуляции (табл. 1; рис. 2б, с; рис 3б, с).

Вместе с тем по сравнению с синусно-предсердным ритмом на частотах стимуляции от 300 до 400 уд/мин наблюдался более быстрый приход волны возбуждения к субэпикардиальным слоям основа-

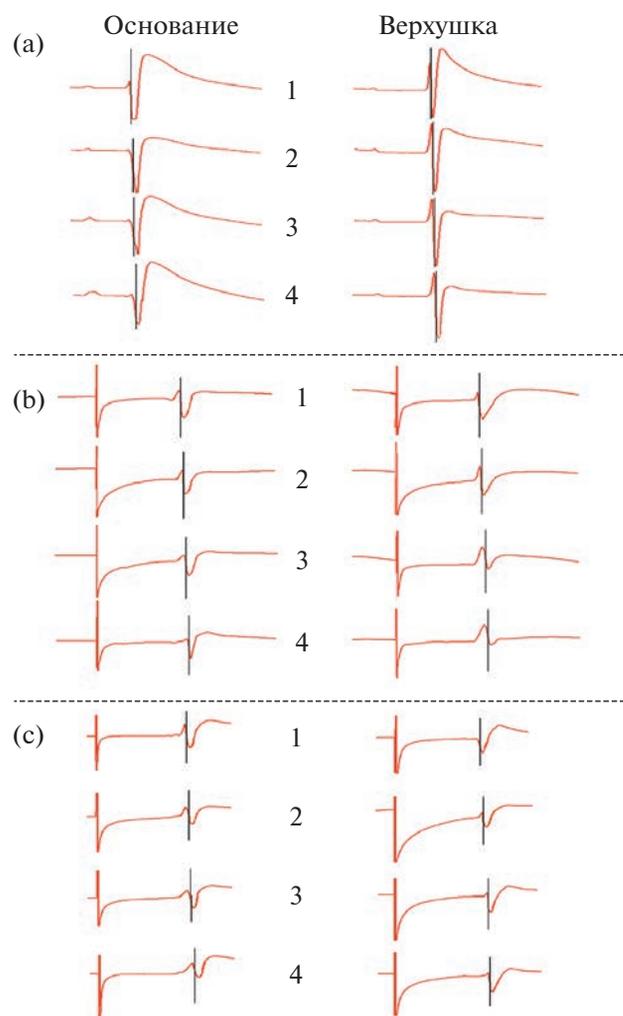


Рис. 3. Электрограммы (ЭГ) от интрамуральных игольчатых электродов, введенных в области основания и верхушки свободной стенки правого желудочка сердца крысы. Обозначения те же, что и на рис 2.

ния правого желудочка (табл. 1). При частоте стимуляции 450 уд/мин происходило увеличение времени прихода волны деполяризации ко всем слоям миокарда с последующим его уменьшением при увеличении частоты стимуляции до 500 уд/мин (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что у лабораторных крыс тилетамин-золазепамовый (золетилловый) наркоз увеличивает частоту сердечных сокращений [8–11]. В противоположность золетилу, ксилазин обладает значительным отрицательным хронотропным воздействием на сердце [5]. Комбинация золетила и ксилазина для крыс токсична, и ее сочетание является сердечно-сосудистым депрессантом [8, 13]. В нашем эксперименте у крыс линии Wistar при анестезии зо-

летил-ксилазиновым наркозом даже в значительно меньшей дозировке ксилазина [5–7] произошло уменьшение ЧСС по сравнению с контролем с 446.2 ± 18.4 уд/мин до 237 ± 34 уд/мин ($p < 0.001$).

Таким образом, золетил-ксилазиновый наркоз при внутримышечном введении в дозе 0.15 мг/кг золетила и 3 мг/кг ксилазина вызвал значительный отрицательный хронотропный эффект с резко выраженной брадикардией, характеризующейся уменьшением частоты сердечных сокращений от исходной в два раза. Известно, что ксилазин является агонистом α_2 -адренорецепторов (α_2 -АР) [16, 17]. Вероятно, столь значительное снижение ЧСС было вызвано активацией ксилазином пресинаптических α_2 -адренорецепторов, которые в сердце млекопитающих располагаются на постсинаптических мембранах кардиомиоцитов [18, 19] и на пресинаптических мембранах адренергических волокон [20, 21]. Основная роль пресинаптических α_2 -адренорецепторов заключается в их участии в системе отрицательной обратной связи, регулирующей освобождение медиатора норадреналина [20, 22]. Возбуждение этих рецепторов тормозит освобождение норадреналина из варикозных утолщений симпатического волокна [22, 23] и усиливает вагусное влияние на сердце [24]. Вероятно, активация пресинаптических α_2 -адренорецепторов в результате воздействия ксилазина привела к снижению секреции норадреналина, что уменьшило его воздействие на β -адренергические рецепторы пейсмейкерных клеток. В свою очередь это вызвало уменьшение уровня напрямую связанного с f-каналами циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). В результате произошло уменьшение f-тока и, соответственно, снижение частоты сердечных сокращений [25].

Установлено, что длительность QRS у крыс Wistar в зависимости от вида наркоза составляет от 14 до 28 мс [14]. По нашим данным исходно у крыс после введения в наркоз при синусно-предсердном ритме длительность комплекса QRS составила 20.5 ± 6.3 мс. При предсердной электрической стимуляции с частотой до 500 уд/мин продолжительность комплекса QRS имела частотно зависимый характер, увеличиваясь в зависимости от частоты искусственного предсердного ритма и варьировала от 12.8 ± 0.8 до 22.1 ± 4.1 мс, что обусловлено, по-видимому, развитием внутри желудочковых аберраций проведения импульса. Известно, что комплекс QRS отображает последовательность и длительность процесса деполяризации миокарда желудочков [1], решающую роль в котором выполняет фаза быстрой деполяризации. Фаза быстрой деполяризации клеток миокарда обусловлена входящим током ионов Na^+ через быстрые потенциал-зависимые натриевые каналы. Вероятно, при действии ксилазина происходит частичная блокада потенциал-зависимых натриевых каналов в клетках миокарда желудочков, что вызывает снижение

скорости нарастания переднего фронта потенциалов действия (ПД) в фазу 0 (dV/dt_{max}). Увеличение длительности фазы быстрой деполяризации потенциала действия в свою очередь приводит к повышению продолжительности охвата возбуждением желудочков сердца и, соответственно, комплекса QRS ЭКГ. К тому же воздействию ксилазина, на фоне синусно-предсердного ритма, вероятно, вызывает межклеточное разобщение, которое в свою очередь определяет задержку проведения возбуждения между соседними клетками или группами клеток [26], что увеличивает их трансмуральную электрофизиологическую гетерогенность [27], повышая тем самым продолжительность охвата возбуждением миокарда желудочков.

При увеличении ЧСС посредством предсердной электрической стимуляции последовательность и трансмуральный градиент деполяризации не изменялись (табл. 1). Вместе с тем увеличение частоты стимуляции от 300 до 500 уд/мин приводило к уменьшению времени прибытия волны деполяризации к субэндокардиальным, интрамуральным и субэпикардиальным слоям стенок левого и правого желудочков, что, вероятно, было вызвано уменьшением трансмуральной электрофизиологической неоднородности в связи с повышением ЧСС [27] и улучшением проведения возбуждения в миокарде [26]. В результате этого процесса произошла более быстрая деполяризация стенок желудочков, соответствующая по длительности таковой у исследованных нами ранее крыс линии Вистар при синусно-предсердном ритме [15]. При частотах стимуляции 400–500 уд/мин, находящихся в диапазоне частоты сердечных сокращений у интактных крыс (446.2 ± 18.4 уд/мин), длительность комплекса QRS на ЭКГ уменьшалась, что может быть вызвано развитием “сверхнормального проведения” по проводящей системе миокарда, когда увеличение сердечных сокращений приводит к замедлению проведения импульса по атриовентрикулярному узлу и прекращению аберраций в желудочках, тем самым улучшается скорость проведения импульса по миокарду.

Данные, полученные в последнее время [28], позволяют переосмыслить сложившиеся представления о механизмах генерации ритма сердца и демонстрируют существование генератора ритма в центральной нервной системе наряду с генератором сердечного ритма в самом сердце. Важную роль в авторитмической деятельности сердца играют норадреналин, выделяющийся из симпатических нервных окончаний, триггером которого является активация нейронов голубого пятна в стволе головного мозга, и адреналин, секретируемый мозговым слоем надпочечников. При этом контролируемая ЦНС симпатoadренальная активность у крыс является ключевым элементом в регуляции симпатической активности сердца [29]. Можно предположить, что предсердная электрокардио-

стимуляция с частотой, приближенной к ЧСС интактных животных, восстанавливает, вызванный ксилазином разрыв в системе центральной автономной регуляции деятельности сердца [30]. Поэтому, при частоте стимуляции 450 уд/мин, т.е. близкой к ЧСС крыс без анестезии – $446.2 \pm \pm 18.4$ уд/мин, продолжительность комплекса QRS имеет тенденцию к возврату его длительности, зарегистрированной у бодрствующих животных.

Таким образом, несмотря на депрессивное действие золетил-ксилазинового наркоза на сердце и его хронотропную функцию, при высокой частоте предсердной электрической стимуляции градиент деполяризации от эндокарда к эпикарду и от верхушки к основанию желудочков сохраняется, происходят лишь незначительные изменения длительности процесса трансмуральной деполяризации стенок желудочков сердца. Это свидетельствует об устойчивости процесса активации миокарда желудочков к токсическому действию золетил-ксилазинового наркоза.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям [Заключение Комиссии по биоэтике Института физиологии, Коми НЦ УрО РАН от 14.12.2021 г. б/н (без номера)].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках программы исследований темы НИР: “Сравнительно-физиологическое исследование пространственно-временной организации электрофизиологических процессов и сократимости миокарда позвоночных животных”, № ГР АААА-А17-117012310154-6, запланированных в Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, написание и редактирование манускрипта (В.П.Н., Н.А.К., С.Н.Х., А.Б.Б., Д.Н.Ш.), проведение эксперимента (Н.А.К., А.С.Ц.), сбор данных, обработка данных, проведение эксперимента (Н.А.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Roshchevsky MP, Shmakov DN* (2003) Excitation of the heart. M. Nauka.
2. *Farrar AK, Hazari MS, Cascio WE* (2011) The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol Sci* May 121 (1): 11–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr021>
3. *Лычева НА, Макарова МН, Макаров ВГ, Рыбакова АВ* (2018) Влияние различных видов анестезии на параметры электрокардиограммы у крыс. *Лаб жив научн исслед* 2: 16–23. [*Lycheva N, Makarova M, Makarov V, Rybakova A* (2018) Effect of different species of anesthesia on electrocardiogram parameters in rats. *Laboratory Animal Sci* 2: 16–23. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29926/2618723X-2018-02-02>
4. *Привалова ИЛ, Шевелев ОА, Ходорович НА, Кузнецова ТШ, Глотова ИВ, Легостаева ТН, Озерова ИЮ* (2019) Электрокардиография у крыс в экспериментальных исследованиях (обзор литературы). *Ген развед жив* 2: 108–120. [*Privalova I, Shevelev O, Hodorovich N, Kuznetsova T, Glotova I, Legostaeva T, Ozerova I* (2019) Electrocardiography in rats in experimental studies (review of the literature). *Gen Breed Animal* 2: 108–120. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-2-108-120>
5. *Piccolo C, Serra AJ, Levy RF, Antonio EL, Santos L, Tucci PJF* (2012) Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. *Arq Bras Med Vet Zootec* 64 (4): 860–864.
6. *Redfors B, Shao Y, Omerovic E* (2014) Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. *Lab Anim* 48 (1): 6–14. <https://doi.org/10.1177/0023677213502015>
7. *Gonca E* (2015) Comparison of thiopental and ketamine+xylazine anesthesia in ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in rats. *Turkish J Med Sci* 45 (6): 34. <https://doi.org/10.3906/sag-1403-25>
8. *Wilson RP, Zagon IS, Larach DR, Max Lang CM* (1993) Cardiovascular and respiratory effects of tiletamine-zolazepam. *Pharmacol, Biochem Behav* 44 (1): 1–8.
9. *Ивашов МН, Арльт АВ, Савенко ИА, Сергиенко АВ, Зацепина ЕЕ, Лысенко ТА, Куянцева АМ, Саркисян КХ* (2012) Особенности кардиодинамики при применении золетила у лабораторных животных. *Научные ведомости. Серия мед формация* 4 (123) 17/1: 168–171. [*Ivashev MN, Arlt AV, Savenko IA, Sergienko AV, Zatssepina EE, Lysenko TA, Kuyantseva AM, Sarkisyan KH* (2012) Features of cardiodynamics when using zoletil in laboratory animals. *Scientific bulletin. Med Pharmac Ser* 4 (123) 17/1: 168–171. (In Russ)].
10. *Савенко ИА, Усманский ЮВ, Ивашев МН, Сергиенко АВ, Лысенко ТА, Куянцева АМ, Арльт АВ, Зацепина ЕЕ, Саркисян КХ, Ефремова МП, Шемонаева МВ* (2012) Возможность применения ветеринарного препарата в экспериментальной фармакологии. *Фундамент исслед* 5 (2): 422–425. [*Savenko IA, Usmanskiy UV, Ivashev MN, Sergienko AV, Lysenko TA, Kuyantseva AM,*

- Arlt AV, Zatssepina EE, Sarkisyan KH, Efremova MP, Shemonaeva MV* (2012) Chance of veterinary medicine in experimental pharmacology. *Fundamental Res* 5 (2): 422–425. (In Russ)].
11. *Svore P* (2020) Heart rate variability and heart rate under general anesthesia in rats of both sexes. *Trends Med* 21: 1–3.
<https://doi.org/10.15761/TiM.1000257>
 12. *Saha DC, Saha AC, Malik G, Astiz ME, Eric C, Rackow EC* (2007) Comparison of Cardiovascular Effects of Tiletamine–Zolazepam, Pentobarbital, and Ketamine–Xylazine in Male Rats. *Vet Surg* 46 (2): 74–80.
 13. *Смирнова АВ, Лагутина ЛД, Трубицына ИЕ, Васнев ОС* (2012) Особенности проведения анестезии у крыс при полосных операциях. *Эксп клин гастроэнтерол* 5: 62–65. [*Smirnova AV, Lagutina LD, Trubitsyna IE, Vasnev OS* (2012) Features of anesthesia in rats during band operations. *Exp Clin Gastroenterol* 5: 62–65. (In Russ)].
 14. *Konopelski P, Ufnal M* (2016) Electrocardiography in rats: a comparison to human. *Physiol Res* 65 (5): 717–725.
 15. *Roshchevskaya IM, Roshchevsky MP, Shmakov DN, Arteeva NV, Antonova NA* (1999) Experimental and model investigation of cardioelectric field formation in Wistar rat at the period of ventricular depolarization. *Electrocardiology* 98/Ed:I Preda-London: World Sci: 173–176. (In Russ).
 16. *Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier DF, Vachon P* (2013) Pharmacokinetics of Ketamine and Xylazine in Young and Old Sprague–Dawley Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52 (5): 567–570.
 17. *Cepiel A, Noszczyk-Nowak A, Janiszewski A, Paśławski R, Paśławska U* (2018) Effect of xylazine, medetomidine and dexmedetomidine on cardiac conduction in pigs. *Med Weter* 74 (3): 187–192.
<https://doi.org/10.21521/mw.6057>
 18. *Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P* (2009) Alpha(2)-adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int* 55 (7): 447–453.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.05.014>
 19. *Maltsev AV, Kokož YuM, Evdokimovskii EV, Pimenov OY, Reyes S, Alekseev AE* (2014) Alpha-2 adrenoceptors and imidazoline receptors in cardiomyocytes mediate counterbalancing effect of agmatine on NO synthesis and intracellular calcium handling. *J Mol Cell Cardiol* 68: 66–74.
 20. *Berg T, Jensen J* (2013) Tyramine reveals failing alpha2-adrenoceptor control of catecholamine release and total peripheral vascular resistance in hypertensive rats. *Front Neurol* 4: 19.
 21. *Dudek M, Knutelska J, Bednarski M, Nowiński L, Zygmunt M, Mordyl B, Głuch-Lutwin M, Kazek G, Sapa J, Pytka K* (2015) A comparison of the anorectic effect and safety of the alpha2-adrenoceptor ligands guanfacine and yohimbine in rats with diet-induced obesity. *Plos One* 10: 1327–1371.
 22. *Knaus AE, Muthing V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R, Hein L* (2007) Alpha (2)-adrenoceptor subtypes-unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Internat* 51: 277–281.
 23. *Зефиров ТЛ, Хисамиева ЛИ, Зиятдинова НИ, Зефиров АЛ* (2015) Особенности селективной блокады подтипов α_2 -адренорецепторов на хронотропию сердца новорожденных крысят. *Бюл эксп биол мед* 160 (7): 10–12. [*Zefirov TL, Khisamieva LI, Ziyatdinova NI, Zefirov AL* (2015) Peculiar effects of selective blockade of α_2 -adrenoceptor subtypes on cardiac chronotropy in newborn rats. *Bull Exp Biol Med* 160 (1): 6–8. (In Russ)].
 24. *Коротаева ЮВ, Циркин ВИ* (2015) Альфа2-адренорецепторы миокарда (обзор литературы). *Известия Коми НЦ УрО РАН* 2 (22): 57–64. [*Korotaeva YuV, Tsirkin VI* (2015) Alpha 2-adrenoreceptors of the myocardium (literature review). *Izvestiya Komi NC UrO RAS*. 2 (22): 57–64. (In Russ)].
 25. *Асташкин ЕИ, Глезер МГ* (2007) Пейсмекерные f-каналы миоцитов синусового узла, как новая терапевтическая мишень для снижения частоты сердечных сокращений. *Кардиоваскуляр тер профилактика* 6 (8): 106–115. [*Astashkin EI, Glezer MG* (2007) Pace-maker f-channels of sinus node myocytes as a new therapeutic target for heart rate reduction. *Cardiovascular Therap Prevention* 6 (8): 106–115. (In Russ)].
 26. *Глухов АВ, Егоров ЮВ, Розенштраух ЛВ* Электрофизиологические механизмы устойчивости ритма сердца гибернирующих млекопитающих во время гипотермии. *Успехи физиол наук* 45 (1): 3–26. [*Gluukhov AV, Egorov YuV, Rosenshttraukh LV* (2014) Electrophysiological Mechanisms of Natural Resistance of the Hibernator Heart to Hypothermic Ventricular Fibrillation. *Success physiol sci* 45 (1): 3–26. (In Russ)].
 27. *Poelzing S, Akar FG, Baron E, Rosenbaum DS* (2004) Heterogeneous connexin43 expression produces electrophysiological heterogeneities across ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: 2001–2009.
 28. *Покровский ВМ* (2006) Интеграция уровней сердечного ритма: генератор ритма сердца в мозге *Бюллетень сиб мед* 5 (1): 26–31. [*Pokrovsky VM* (2006) Integration of cardiac rhythmogenesis levels: cardiac rhythm generator in the brain. *Bull Siberian Med* 5 (1): 26–31. (In Russ)].
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2006-1-26-31>
 29. *Бурсиан АВ* (2014) Катехоламиновая регуляция авторитмической висцеро и соматомоторной активности в раннем онтогенезе крыс. *Журн эвол биохим физиол* 50 (1): 3–11. [*Bursian AV* (2014) Catecholaminergic regulation of autorhythmical visceromotor activity in early rat ontogenesis. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 50 (1): 3–11 (In Russ)].
 30. *Шальдах М* (1992) Электрокардиотерапия (Технические аспекты электрокардиостимуляции). Санкт Петербург. [*Schaldach M* (1992) Electrocardiotherapy (Technical aspects of electrocardiostimulation). Saint Petersburg. (In Russ)].

INFLUENCE OF ATRIAL ELECTRICAL STIMULATION ON THE TRANSMURAL SEQUENCE OF DEPOLARIZATION OF VENTRICULAR WALLS IN RAT HEART UNDER ZOLETHYL-XYLAZINE ANESTHESIA

V. P. Nuzhny^a, N. A. Kibler^{a,#}, A. S. Tsvetkova^a, S. N. Kharin^a,
A. B. Barkhaev^a, and D. N. Shmakov^a

^a*Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*
[#]*e-mail: natanadya@mail.ru*

The transmural sequence of depolarization of the free walls of the ventricles of the heart of Wistar rats was studied with an increase in the heart rate under zoletyl- xylazine anesthesia. The increase in heart rate was caused by atrial electrical stimulation. Zoletyl-xylazine anesthesia with intramuscular injection at a dose of 0.15 mg/kg of zoletil and 3 mg/kg of xylazine caused a significant negative chronotropic effect with pronounced bradycardia, characterized by a decrease in heart rate from the initial two times. With a reduced sinoatrial rhythm with a frequency of 237 ± 34 beats/min, the subendocardial layers were initially depolarized, then the intramural and further subepicardial layers of the left and right free walls of the ventricles of the heart. The areas of the bases of the free walls of the ventricles depolarized later than the apical areas by approximately 2–4 ms, also by the movement of the activation wave from the endocardium to the epicardium. With an increase in heart rate, the sequence and transmural depolarization gradient did not change. At the same time, an increase in the stimulation frequency from 300 to 500 beats/min led to a decrease in the time of arrival of the depolarization wave to the subendocardial, intramural, and subepicardial layers of the walls of the left and right ventricles. Despite the depressive effect of zoletyl-xylazine anesthesia on the heart and its chronotropic function, at a high frequency of atrial electrical stimulation, the depolarization gradient from the endocardium to the epicardium and from the apex to the base of the ventricles was preserved, there were only minor changes in the duration of the process of transmural depolarization of the walls of the ventricles of the heart. This indicates the resistance of activation of the ventricles of the heart of Wistar rats to the toxic effect of zoletyl-xylazine anesthesia.

Key words: zoletyl-xylazine anesthesia, electrical stimulation, depolarization sequence, heart ventricles, rats

ПРОТИВОСУДОРОЖНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИРОВАНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ И ВНЕСИНАПТИЧЕСКИХ ГАМК-ТРАНСПОРТЕРОВ В ПРЕДОТВРАЩЕНИИ ГИПЕРБАРИЧЕСКИХ КИСЛОРОДНЫХ СУДОРОГ

© 2023 г. О. С. Алексеева^{1,*}, Б. А. Герда¹, А. С. Жилиева¹, И. Т. Демченко¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

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

*e-mail: osa72@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 18.04.2023 г.

Гипербарический кислород (ГБО₂) подавляет ГАМК-ергическую нейротрансдукцию в мозге, что может приводить к развитию судорожного синдрома, известного как “кислородная эпилепсия”. Дефицит ГАМК-ергической передачи в ГБО₂, возникающий за счет снижения уровня синаптического ГАМК, может быть компенсирован путем ингибирования нейрональных и глиальных ГАМК-транспортеров (GAT). В настоящем исследовании проводилась сравнительная оценка противосудорожного действия тиагабина, ингибитора GAT-1, и SNAP 5114, ингибитора GAT-2/3. Противосудорожные эффекты оценивались после введения препаратов в латеральный мозговой желудочек крыс за 30 мин до начала гипербарической кислородной экспозиции при давлении 5 АТА. В отдельных опытах измерялась концентрация ГАМК в стриатуме крыс при дыхании кислородом под давлением 5 АТА после ингибирования GAT с помощью тиагабина или SNAP 5114. Основными результатами выполненных исследований являются: (1) ингибирование GAT-1 или GAT-2/3 предотвращало развитие “кислородной эпилепсии” у крыс; (2) среди двух используемых ингибиторов, TGB оказался более эффективным в предотвращении кислородных судорог по сравнению со SNAP 5114; (3) совместное использование TGB и SNAP 5114 вызывало аддитивный противосудорожный эффект; (4) кислородные судороги появлялись при снижении ГАМК в головном мозге на 30–40% от исходного уровня; (5) ингибирование GAT с помощью тиагабина увеличивало содержание внеклеточного ГАМК в 2.9 раза и в 1.7 раза при использовании SNAP 5114. Таким образом, ингибирование GAT-1 или GAT-2/3 повышает внеклеточную концентрацию ГАМК до уровня, достаточного для восстановления нарушенной в ГБО₂ тормозной нейротрансдукции, и предотвращает развитие гипербарических кислородных судорог.

Ключевые слова: гипербарический кислород, кислородная нейротоксичность, гипербарические кислородные судороги, ГАМК транспортеры, тиагабин, SNAP 5114

DOI: 10.31857/S0044452923030026, **EDN:** YGRLBE

ВВЕДЕНИЕ

Кислород под давлением (гипербарический кислород или ГБО₂) используется в клинике при лечении заболеваний методом гипербарической оксигенации и для дыхания водолазами при осуществлении их профессиональной деятельности. Основным лимитирующим фактором использования кислорода под давлением выше 2 АТА (атмосфер абсолютных) является его нейротоксическое действие, проявляющееся в виде пароксизмальной активности на ЭЭГ и тонико-клонических судорог, известных как “кислородная эпилепсия” [1].

Принято считать, что “кислородная эпилепсия” может развиваться в результате снижения ГАМК-опосредованной тормозной нейротрансдукции в ЦНС [2–4]. Ослабление ГАМК-ергической нейротранс-

дукции в ГБО₂ связано с ингибированием синтеза медиатора и снижением его доступности к рецепторам [5]. Причиной снижения внутримозговой ГАМК при ГБО₂ является инактивация глутаматдекарбоксилазы (GAD), катализирующей синтез медиатора в нервных клетках [6–8]. Механизм снижения активности GAD при экстремальной гипероксии происходит за счет S-нитрозилирования фермента — ковалентного присоединения группы оксида азота (NO) к тиоловым остаткам цистеина в белке [9].

ГАМК является основным тормозным нейротрансмиттером в мозге млекопитающих. После высвобождения из пресинаптических окончаний и активации рецепторов излишек ГАМК быстро удаляется из синаптического пространства с помощью

ГАМК-транспортеров (GAT), которые прерывают синаптическую передачу [10, 11], регулируют спилловер ГАМК на соседние синапсы [12] и поддерживают гомеостаз медиатора для предотвращения чрезмерной тонической активации синаптических и экстрасинаптических рецепторов ГАМК [13]. На сегодняшний день описано четыре различных транспортера ГАМК: GAT-1, GAT-2, GAT-3 и транспортер бетаина/ГАМК типа 1 (BGT-1). Все они являются членами большого семейства 12-трансмембранных транспортеров [14]. GAT-1, транспортер обратного захвата медиатора в пресинаптический нейрон, был первым клонированным GAT [15]. Белковая последовательность GAT-1 крысы [15], мыши [16] и человека [17] демонстрирует высокую степень гомологии и почти идентичные фармакологические свойства. Согласно имеющимся морфологическим данным, GAT-2/3, скорее всего, расположены в астроглии и, частично, в синапсе в непосредственной близости к GAT-1 [18]. Клонированные GAT-2 и GAT-3 обнаруживают более высокую степень аминокислотной идентичности друг с другом (67% идентичности) и с BGT-1 (68 и 65% идентичности для GAT-2 и GAT-3 соответственно), чем с GAT-1 (~52% идентичности аминокислот). Аминокислотная последовательность GAT-3 у человека, крысы и мыши практически идентична лишь с несколькими заменами [10]. Транспортеры ГАМК способны создавать 105-кратный градиент между внутри- и внеклеточной концентрацией ГАМК [19].

Регулирование содержания синаптического ГАМК с участием GAT предполагает возможность повышения доступности медиатора для активации рецепторов путем использования фармакологических веществ, ингибирующих функцию транспортеров обратного захвата медиатора. Блокада GAT увеличивает синаптическую доступность ГАМК, тем самым облегчая активацию синаптических и внесинаптических ГАМК-рецепторов. Для этой цели широко применяются фармакологические вещества с селективным и неселективным ингибированием транспортеров ГАМК, такие как тиагабин, селективный ингибитор GAT-1, и SNAP 5114, неселективный ингибитор GAT-2 и GAT-3. Тиагабин содержит лиофильную группу, позволяющую препарату беспрепятственно проникать в головной мозг и оказывать противосудорожное действие. Благодаря этому свойству TGB нашел широкое применение в клинике для лечения эпилепсии. SNAP 5114 является неселективным ингибитором GAT-2 и GAT-3 с более высоким сродством к GAT-3, чем GAT-2 (IC₅₀ ~ 5 и 20 мкМ соответственно). Учитывая, что GAT-3 локализован преимущественно в глии, а GAT-2 в слоях лептоменинкса мозга, SNAP 5114 обычно используется в качестве неселективного блокатора GAT-2/3 в исследованиях регуляции GAT-опосредованной синаптической передачи в центральной нервной системе [20].

Можно предположить, что тиагабин и SNAP 5114, блокируя функцию GAT, повышают содержание ГАМК в синаптическом и внесинаптическом пространстве и оказывают выраженное противосудорожное действие. Действительно, тиагабин и SNAP 5114 продемонстрируют противосудорожное действие на разных моделях экспериментальной эпилепсии [18, 20, 21]. Тиагабин ослабляет развитие судорог и на модели “кислородной эпилепсии” [3, 5], однако противосудорожная потенция SNAP 5114 еще не тестировалась при развитии гипербарических кислородных судорог. Кроме того, динамика ГАМК в мозге при ингибировании GAT с помощью тиагабина или SNAP 5114 в условиях гипербарической гипероксии не изучалась.

Цель работы состояла в сравнительной оценке противосудорожного эффекта ингибирования синаптических и внесинаптических ГАМК-транспортеров при развитии гипербарических кислородных судорог. Для этого изучали противосудорожные эффекты тиагабина и SNAP 5114, а также их совместное действие в условиях гипероксической экспозиции. Кроме того, мы оценивали временной профиль изменений ГАМК в головном мозге после ингибирования GAT-1 с помощью тиагабина и GAT-2/3 с помощью SNAP 5114 у крыс, подвергшихся воздействию кислорода под давлением 5 АТА.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали крыс линии Вистар массой 278–311 г, полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Всеволожский район, Ленинградская область). Протокол опытов одобрен Комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 1-12/2022 от 27.01.2022). Было проведено две серии экспериментов.

В первой серии опытов за неделю до проведения экспериментов каждому животному под наркозом (нембутал 50 мг/кг, внутривенно) вводили металлическую канюлю в боковой желудочек мозга по стереотаксическим координатам [22]: AP = -1.2 мм, LM = ± 2.3 мм, V = 3.5 мм. Канюлю фиксировали акриловым стоматологическим цементом и двумя анкерными винтами, установленными билатерально в височной области черепа. Животному давали восстановиться после операции в течение 5–7 дней. Перед опытом с использованием гипербарического кислорода в боковой желудочек через имплантированную канюлю с помощью микрошприца вводили ингибиторы GAT (Sigma Aldrich, USA) – тиагабин или SNAP 5114. Контрольным животным вводили искусственный ликвор (CSF). Ингибиторы GAT растворяли в искусственном ликворе и вводили в объеме 10 мкл. Содержание препаратов в вводимом объеме CSF составляло: тиагабин – 0.05 мг, SNAP 5114–0.5 мг.

Животным контрольной группы вводили искусственный ликвор в объеме 10 мкл.

После введения препаратов крыс размещали в барокамере объемом 100 л по 2 особи в каждом эксперименте. Давление кислорода в камере повышали до 5 АТА со скоростью 1 АТА/мин. Температуру в камере поддерживали в пределах 23–25°C, относительную влажность – около 60%, содержание CO₂ – не более 0.05%. Во время экспозиции в ГБО₂ проводили непрерывную видеосъемку поведения животных. Гипербарическая экспозиция продолжалась до появления генерализованных клонико-тонических судорог или максимум 90 мин. Время декомпрессии составляло 8 мин. Для оценки противосудорожных эффектов препаратов отмечали время (в минутах) появления специфических двигательных нарушений от начала экспозиции 5 АТА, соответствующих известной шкале состояний судорожного синдрома [23]. При отсутствии генерализованных судорог латентный период принимали за 90 мин.

В опытах на бодрствующих животных было использовано 42 крысы, разделенных на 4 группы. За 30 мин до гипербарического воздействия животным контрольной группы 1 ($n = 12$) в мозговой желудочек вводили CSF, животным группы 2 ($n = 12$) вводили TGB, крысам группы 3 ($n = 10$) – SNAP 5114 и крысам группы 4 ($n = 8$) вводили комбинацию TGB + SNAP 5114. Экспозиция животных в барокамере продолжалась до появления судорог, но не более 90 мин.

Во второй серии опытов измеряли содержание внеклеточной ГАМК в мозге крыс при ингибировании GAT-1 и GAT-3 с помощью TGB и SNAP 5114. Для этого наркотизированным животным (уретан 750 мг/кг + хлоралоза 250 мг/кг) в стриатум (стереотаксические координаты: А = + 1.0 мм, LM ± 2.5 мм, D = 5.8 мм) вводили микродиализные зонды (СМА/11, СМА/Microdialysis AB, Sweden). Во время экспозиции в ГБО₂ зонды перфузировали искусственным ликвором со скоростью 1.0 мкл/мин, содержащим TGB (30 мкмоль/л) или SNAP 5114 (100 мкмоль/л), а пробы диализата автоматически отбирали каждые 15 мин (СМА 142 Microfraction Collector, AB, Sweden). Концентрацию ГАМК в пробах измеряли с помощью высокопроизводительной жидкостной хроматографии (HPLC) с электрохимической детекцией медиатора (ESA model 5100A), как было ранее подробно описано [24]. ГАМК в образцах количественно определяли в мкмоль/л, используя внешние стандарты. В данной серии опытов у крыс также регистрировали ЭЭГ. Для этого наркотизированным животным свертывали билатерально в теменную часть черепа до соприкосновения с поверхностью сенсомоторной коры два винта из нержавеющей стали, каждый диаметром 2 мм. При регистрации и анализе ЭЭГ использовали аппаратно-программный комплекс iWorx LX 228 с программным обеспечением

LabScribe 2 (iWorx System, Dover, США). Записи биоэлектрической активности использовали для определения латентного периода судорожной активности мозга, которая проявлялась в виде ЭЭГ-спайков.

Для измерения внеклеточной ГАМК было использовано 25 животных, разделенных на 5 групп. ГАМК измеряли у крыс при дыхании атмосферным воздухом с введенным TGB (группа 1, $n = 5$) или SNAP 5114 (группа 2, $n = 5$). У крыс групп 1 и 2 измеряли также контрольные значения ГАМК в стриатуме в период постоянной перфузии микродиализных зондов искусственным ликвором до введения ингибиторов. Крыс групп 3–5 подвергали воздействию гипербарического кислорода 5 АТА. Во время экспозиции в ГБО₂ животным в стриатум через микродиализные зонды вводили CSF (группа 3, $n = 5$), TGB (группа 4, $n = 5$) или SNAP 5114 (группа 5, $n = 5$). Пробы диализата собирали каждые 15 мин во время ГБО₂-экспозиции для измерения ГАМК после декомпрессии с помощью HPLC.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, США) и GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., США) с использованием критерия Колмогорова–Смирнова для оценки нормальности распределения. Оценку равенства дисперсий проводили с помощью F-критерия Фишера. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA применяли для выявления отличий латентного периода судорожных реакций в ГБО₂ у животных при введении ингибиторов GAT по сравнению с контролем (искусственный ликвор). Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA применяли для сравнения изменений мозговой ГАМК у крыс двух экспериментальных групп. Оценку значимости различий между группами проводили с использованием двухвыборочного t-теста Стьюдента и пост-хок теста Тьюки, внутригрупповые сравнения зависимых признаков оценивали с помощью парного t-теста Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, при этом в качестве статистически значимых различий принимали значения $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У контрольной группы бодрствующих крыс, находящихся в барокамере под давлением кислорода 5 АТА, были выявлены характерные двигательные нарушения, соответствующие известной шкале состояний судорожного синдрома [23]. В течение первых 10 мин воздействия ГБО₂ животные оставались неподвижными. После этого у них проявились интенсивный груминг, легкое дрожание головы и передних лап, которое у части животных переходило во встряхивание всего тела, известное как

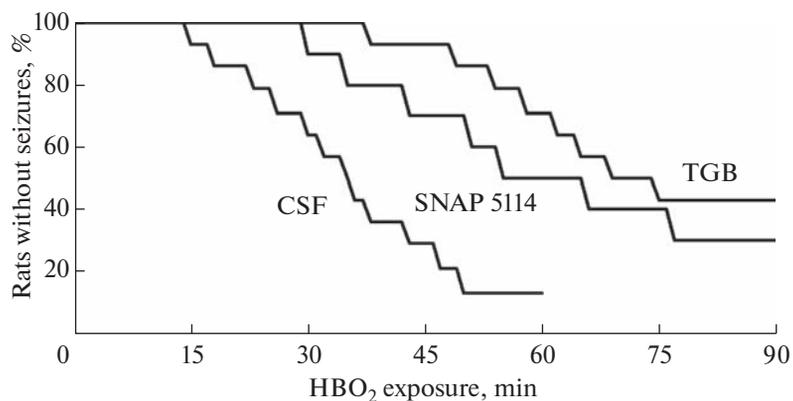


Рис. 1. Зависимость появления судорожных реакций у бодрствующих крыс в кислородной среде под давлением 5 АТА с введенными GAT-ингибиторами от времени гипероксической экспозиции.

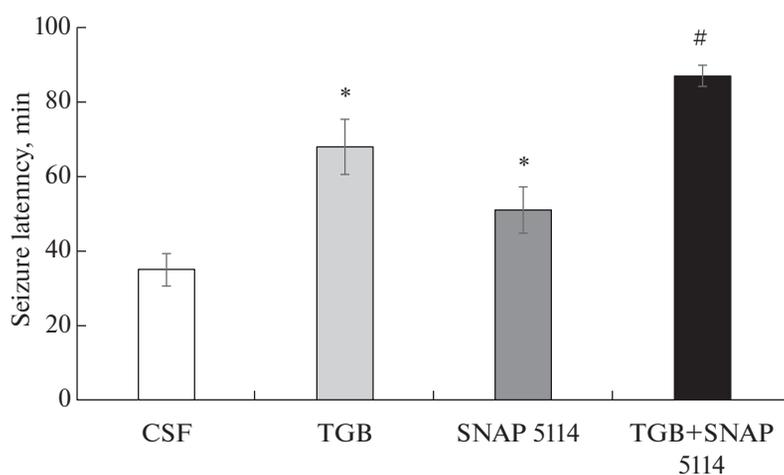


Рис. 2. Средние значения латентного периода появления судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА после введения в мозговую желудочек искусственного ликвора (CSF), тиагабина (TGB) и SNAP 5114. * $p < 0.05$ по сравнению с CSF, # $p < 0.05$ по сравнению с TGB и SNAP 5114.

симптом “мокрой собаки” (стадия 1). На стадии 2 наблюдались повторяющиеся локальные подергивания мышц мордочки, головы и передних конечностей, а также дрожь всего тела. Миоклонии продолжались от 5 до 15 с и могли повторяться. На стадии 3 у животных наблюдались ритмичные сокращения мышц всего тела продолжительностью 5–15 с, некоторые крысы вставали на задние лапы и двигались назад. На 4-й стадии у животных присутствовали генерализованные клонические или тонические конвульсии. Приступы сопровождалась тахикардией и гипервентиляцией.

Начальные стадии судорожной активности (стадии 1–3) отчетливо проявлялись также у животных после введения GAT-ингибиторов. Генерализованные судороги (стадия 4) не выявлялись у 40% крыс, получавших TGB, и у 25% крыс после введения SNAP 5114 в течение 90 мин ГБО₂-экспозиции (рис. 1).

Латентное время появления четвертой стадии судорожной активности у крыс, получавших GAT-ингибиторы, было достоверно большим, чем у контрольной группы, причем TGB вызывал более выраженное противосудорожное действие, чем SNAP 5114 (рис. 2). Совместное введение TGB+SNAP 5114 аддитивно усиливало противосудорожное действие ингибиторов и латентное время появления судорог было еще больше, чем после введения каждого из препаратов в отдельности (рис. 2).

Концентрация ГАМК в стриатуме крыс при дыхании атмосферным воздухом составила 0.059 ± 0.011 мкмоль/л. После введения GAT-ингибиторов уровень ГАМК повышался и пиковые значения медиатора были максимальными после введения TGB по сравнению с SNAP 5114 ($F_{(2,21)} = 3.349$, $p = 0.0347$) (рис. 3). Двухфакторный анализ ANOVA с повторными измерениями (в конфигурации “mixed model ANOVA”) с пост-хок тестами Тьюки

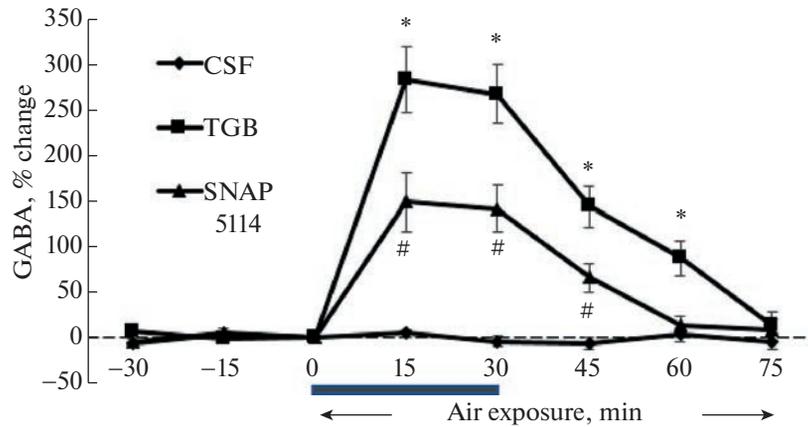


Рис. 3. Временной профиль изменения концентрации ГАМК в стриатуме крыс при дыхании атмосферным воздухом и 30-минутном введении в стриатум через микродиализный зонд искусственного ликвора (CSF), тиагабина (TGB) или SNAP 5114. *,# $p < 0.05$ по сравнению с CSF.

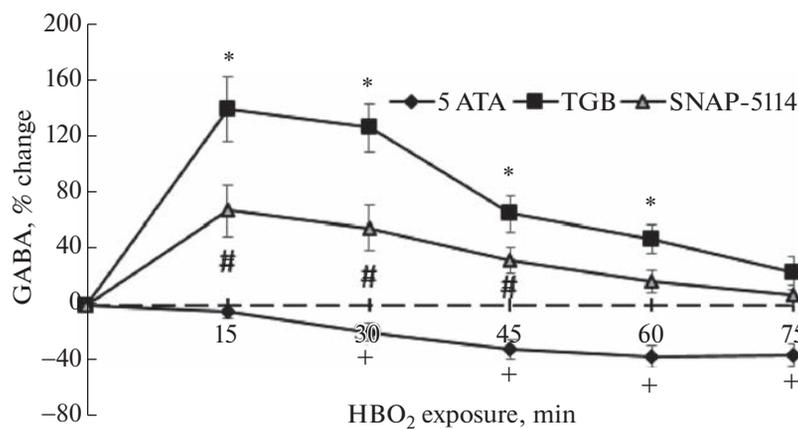


Рис. 4. Изменение концентрации ГАМК в стриатуме крыс под давлением кислорода 5 АТА и постоянном введении в стриатум искусственного ликвора (CSF), TGB или SNAP 5114, *,#, + $p < 0.05$ по сравнению с базовым уровнем.

показал достоверность различий между контрольной (ГБО₂ 5 АТА) и обеими опытными группами с введением препаратов ($p < 0.05$). Достоверных различий между экспериментальными группами не было выявлено ($p > 0.05$).

У наркотизированных животных, подвергшихся воздействию кислорода под давлением 5 АТА, двигательных нарушений не наблюдалось, но эпилептиформная активность на ЭЭГ появлялась через 69 ± 5.3 мин. Кислород под давлением 5 АТА вызывал прогрессирующее снижение уровня медиатора в стриатуме контрольных животных, которое в конце кислородной экспозиции достигало $32 \pm 4.4\%$ от начального значения (рис. 4). Микродиализное введение TGB в стриатум повышало уровень ГАМК в этом отделе мозга перед началом ГБО₂-экспозиции, а в период гипероксического воздействия уровень медиатора постепенно снижался и к концу экспозиции оставался выше, чем у кон-

трольных животных ($F_{(2,15)} = 8.726$, $p = 0.003$) (рис. 4). После внутримозгового введения SNAP 5114 уровень ГАМК в стриатуме повышался, но на меньшую величину, чем после введения TGB и снижение под давлением кислорода 5 АТА было более выражено, чем у крыс, которым вводился ингибитор GAT-1 (рис. 4), причем двухфакторный ANOVA с пост-хок тестами Тьюки показал достоверность различий между контрольной (CSF) и обеими опытными группами с введением препаратов ($p < 0.05$), но не между группами с введением SNAP 5114 или TGB ($p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований получено несколько новых данных: (1) ингибирование GAT-1 или GAT-2/3 с помощью TGB или SNAP 5114 соответственно предотвращало развитие ги-

пербарических кислородных судорог; (2) совместное ингибирование GAT-1 и GAT-2/3 вызывало аддитивный противосудорожный эффект; (3) при ингибировании GAT-1 или GAT-3 уровень внеклеточного ГАМК в стриатуме повышался; (4) в условиях гипероксии 5 АТА ингибирование GAT-1 или GAT-2/3 компенсировало понижение внеклеточного ГАМК, наблюдаемого в ГБО₂ без введения препаратов.

Причастность ГАМК-ергической системы к развитию кислородных судорог давно установлена и первым доказательством этому являлось снижение содержания тормозного медиатора в мозге животных, подвергшихся воздействию гипербарического кислорода [6–8, 25]. Позднее были получены данные о том, что судорожные разряды на ЭЭГ появлялись, когда внеклеточный ГАМК в мозге понижается у наркотизированных крыс на 37% [24] и на 28% у бодрствующих животных [26]. Скорость снижения внеклеточного медиатора зависела от парциального давления вдыхаемого кислорода. Так, после первых 30 минут дыхания кислородом под давлением 6 АТА снижение внеклеточного ГАМК было в 1.5 раза больше, чем при 5 АТА [5].

Уменьшение внеклеточной ГАМК в ГБО₂ связано с понижением активности GAD – фермента, обеспечивающего синтез тормозного медиатора в мозге. Ферментативная активность GAD быстро снижается в ГБО₂, о чем свидетельствует показанное нами появление судорог уже через 30–50 мин после начала гипероксического воздействия при 5 АТА, а при 6 АТА менее чем через 30 мин кислородной экспозиции [27, 28]. Для сравнения, в нормальных условиях ингибирование синтеза ГАМК с помощью 3-меркаптопропионовой кислоты понижало уровень ГАМК в мозжечке морских свинок на 39% через 15 мин, в гипоталамусе на 27% через 30 мин и в коре головного мозга на 43% через 90 мин [29]. Потеря каталитической активности GAD связана с посттрансляционной модификацией ее молекулярной структуры под действием различных редокс-молекул [30–32]. Во время гипероксической экспозиции образование окислительно-восстановительных молекул достигает чрезмерных уровней, способных модифицировать структуру GAD посредством окисления или нитрозилирования аминокислотных остатков [33–36]. Наши исследования показали, что механизм инактивации GAD состоит в S-нитрозилировании белка по цистеину путем присоединения группы оксида азота (NO) к его тиоловым остаткам [9]. Валидность такого механизма подавления каталитической активности GAD с участием NO подтверждается экспериментами, в которых ингибирование NO-синтазы (NOS) в мозге крыс с помощью L-NAME защищало животных от развития кислородных су-

дорог [27], а у мышей с нокаутом нейрональной NOS наблюдался более длительный латентный период начала судорог, чем у обычных животных [37].

Экспериментальные данные настоящей работы показывают, что раздельное ингибирование транспортеров GAT-1 или GAT-2/3 восстанавливает нарушенную в экстремальной гипероксии ГАМК-нейропередачу. Доказательством этому может служить следующее. Во-первых, у крыс с предварительно введенными в мозговую желудочек TGB или SNAP 5114 развитие кислородных судорог не проявлялось, что может свидетельствовать о восстановлении ГАМК-передачи за счет увеличения концентрации тормозного медиатора в межклеточном пространстве. Во-вторых, у крыс при дыхании воздухом ингибирование GAT-1 с помощью TGB увеличивало концентрацию ГАМК в стриатуме в 2.9 раза, а внутримозговое введение SNAP 5114 повышало уровень медиатора в 1.7 раза (рис. 1). Эти данные согласуются с другими исследованиями, в которых показано, что внутримозговое введение антагонистов GAT-1 с помощью микродиализа повышало внеклеточную концентрацию ГАМК в мозге грызунов в 1.5–4 раза по сравнению с исходным уровнем [38]. Точно так же применение SNAP 5114 в дозе 100 мкМ увеличивало уровень ГАМК на 250% [21]. В-третьих, в данной работе после ингибирования транспортеров ГАМК уровень мозговой ГАМК при 5 АТА кислорода оставался повышенным, тогда как у контрольных животных концентрация медиатора в стриатуме снижалась на $37 \pm 5.4\%$. Принимая во внимание, что внутримозговой микродиализ позволяет оценивать уровень ГАМК, на 50–70% состоящий из синаптического нейротрансмиттера [39], и некоторой части ГАМК, высвобождаемой из глиальных клеток [40], можно полагать, что ингибирование ГАМК-транспортеров восстанавливает ГАМК-ергическую функцию в ГБО₂ за счет усиления фазической синаптической и тонической экстраинаптической передач. Используемые в работе TGB и SNAP 5114 нацелены на GAT, локализованные в пресинаптической мембране и в астроцитах. Противосудорожная аддитивность действия двух ингибиторов, вероятно, является следствием ингибирования как синаптических, так и внесинаптических ГАМК-транспортеров.

Вместе с тем имеющиеся данные пока не дают прямого ответа на вопрос, какая из двух ГАМК-ергических нейропередач, синаптическая или экстраинаптическая, угнетается больше в условиях гипероксического воздействия. Показанное в нашей работе увеличение межклеточной ГАМК в стриатуме или в гиппокампе крыс у Kersante и соавт. [20] при ингибировании GAT-1 и более эффективное противосудорожное действие TGB по сравнению с SNAP 5114 косвенно указывают на разный вклад синаптической и внесинаптической нейропередач в снижение ГАМК-опосредованной

нейротрансмиссии в ГБО₂. В то же время зависимость между содержанием медиатора в синаптической щели и в прилежащем межклеточном пространстве позволяет предположить, что внесинаптическая ГАМК-ергическая передача также может подавляться при ГБО₂. Это предположение основано на известных данных о наличии в головном мозге тонической экстраинаптической ГАМК-опосредованной нейротрансмиссии через ГАМКА-рецепторы, локализованные на теле нейронов [13].

Выраженный противосудорожный эффект применяемых препаратов свидетельствует о том, что ГБО₂ не подавляет функцию транспортеров ГАМК. В противном случае, вводимые в головной мозг антагонисты ГАМК транспортеров не вызывали бы столь выраженного противосудорожного действия. Среди двух ингибиторов GAT, использованных в данной работе, TGB оказался более эффективным в предотвращении кислородных судорог по сравнению с SNAP 5114. Тиагабин является селективным ингибитором транспортеров ГАМК, переносящих медиатор преимущественно в пресинаптические нейроны, поэтому при их ингибировании синаптический уровень медиатора повышается, обеспечивая противосудорожный эффект за счет усиления тормозных постсинаптических потенциалов [41].

Дефицит ГАМК-ергической функции при ГБО₂, возникающий из-за ингибирования синтеза ГАМК, может быть преодолен повышением уровня ГАМК в синаптическом пространстве и во внесинаптической среде. Проверка этой гипотезы показала, что ингибиторы транспортера ГАМК, вводимые в мозговой желудочек, повышают уровень ГАМК в головном мозге и предотвращают развитие кислородных судорог. Следовательно, блокирование механизмов синаптического клиренса ГАМК может компенсировать снижение синтеза ГАМК в ГБО₂, повысить концентрацию ГАМК до уровня, достаточного для обеспечения тормозной нейротрансмиссии, и тем самым предотвратить развитие кислородного судорожного синдрома.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00539).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зальцман ГЛ (1968) Стадии развития кислородной эпилепсии и функциональное состояние нервной системы. В кн. Гипербарические эпилепсия и наркоз. Л. Наука. [Zaltsman GL (1968) Stages of formation of oxygen epilepsy and the functional state of the centres of the nervous system. In book: Hyperbaric epilepsy and narcosis. Ed. Zaltsman G.L. Leningrad. Nauka. (In Russ)].
2. Demchenko IT, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Krivchenko AI, Piantadosi CA, Allen BW (2017) Antiepileptic drugs prevent seizures in hyperbaric oxygen: A novel model of epileptiform activity. *Brain Res* 1657: 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.032>
3. Demchenko IT, Zhilyaev SY, Alekseeva OS, Krivchenko AI, Piantadosi CA, Gasier HG (2019) Increased Antiseizure Effectiveness with Tiagabine Combined with Sodium Channel Antagonists in Mice Exposed to Hyperbaric Oxygen. *Neurotox Res* 36 (4): 788–795. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00063-5>
4. Ciarlone GE, Hinojo CM, Stavitzski NM, Dean JB (2019) CNS function and dysfunction during exposure to hyperbaric oxygen in operational and clinical settings. *Redox Biol* 27: 101–159. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101159>
5. Demchenko IT, Zhilyaev SY, Platonova TF, Alekseeva OS, Nikitina ER (2021) Inhibition of GABA-Transaminase and GABA-Transporters in the Brain with Vigabatrin and Tiagabine Prevents Seizure Development in Rats Breathing Hyperbaric Oxygen. *J Evol Biochem Physiol* 57 (5): 1101–1109. <https://doi.org/10.1134/S0022093021050112>
6. Щербак ГВ (1962) Активность глутаматдекарбоксилазы и содержание γ -аминомасляной кислоты в мозге крыс при разных функциональных состояниях, вызванных повышенным давлением кислорода. *ДАН СССР* 146(5): 1213–1215. [Shcherbakova GV Glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid content in rat brain at different functional states caused by high oxygen pressure. *DAN USSR* 146 (5): 1213–1215. (In Russ)].

7. Wood JD, Watson WJ (1964) The effect of oxygen on glutamic acid decarboxylase and gamma-aminobutyric acid-alpha-ketoglutaric acid transaminase activities in rat brain homogenates. *Can J Physiol Pharmacol* 42: 277–279.
<https://doi.org/10.1139/y64-032>
8. Mialon P, Gibey R, Bigot JC, Barthelemy L (1992) Changes in striatal and cortical amino acid and ammonia levels of rat brain after one hyperbaric oxygen-induced seizure. *Aviat Space Environ Med* 63 (4): 287–291.
9. Gasier HG, Demchenko IT, Tatro LG, Piantadosi CA (2017) S-nitrosylation of GAD65 is implicated in decreased GAD activity and oxygen-induced seizures. *Neurosci Lett* 653: 283–287.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.067>
10. Borden LA, Dhar TG, Smith KE, Branchek TA, Gluchowski C, Weinshank RL (1994) Cloning of the human homologue of the GABA transporter GAT-3 and identification of a novel inhibitor with selectivity for this site. *Recept Channels* 2 (3): 207–213.
11. Richerson GB, Wu Y (2003) Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake any more. *J Neurophysiol* 90 (3): 1363–1374.
<https://doi.org/10.1152/jn.00317.2003>
12. Overstreet LS, Westbrook GL (2003) Synapse density regulates independence at unitary inhibitory synapses. *J Neurosci* 23 (7): 2618–2626.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02618.2003>
13. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonic active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27 (5): 262–269.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.005>
14. Böck MC, Höfner G, Wanner KT (2020) N-Substituted Nipicotic Acids as (S)-SNAP-5114 Analogues with Modified Lipophilic Domains. *Chem Med Chem* 15 (9): 756–771.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201900719>
15. Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA, Kanner BI (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249 (4974): 1303–1306.
<https://doi.org/10.1126/science.1975955>
16. Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1993) Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J Biol Chem* 268 (3): 2106–2112.
17. Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett* 269 (1): 181–184.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81149-i](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81149-i)
18. Jin XT, Galvan A, Wichmann T, Smith Y (2011) Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Front Syst Neurosci* 5: 63.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00063>
19. Schousboe A (1981) Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Rev Neurobiol* 22: 1–45.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(08\)60289-5](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(08)60289-5)
20. Kersanté F, Rowley SC, Pavlov I, Gutiérrez-Mecinas M, Semyanov A, Reul JM, Walker MC, Linthorst AC (2013) A functional role for both-aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J Physiol* 591 (10): 2429–2441.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246298>
21. Dalby NO (2000) GABA-level increasing and anticonvulsant effects of three different GABA uptake inhibitors. *Neuropharmacology* 39 (12): 2399–2407.
[https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00075-7](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00075-7)
22. Paxinos G, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Boston, MA: Elsevier.
23. Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (3): 281–294.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
24. Demchenko IT, Piantadosi CA (2006) Nitric oxide amplifies the excitatory to inhibitory neurotransmitter imbalance accelerating oxygen seizures. *Undersea Hyperb Med* 33(3): 169–174.
25. Faiman MD, Nolan RJ, Baxter CF, Dodd DE (1977) Brain gamma-aminobutyric acid, glutamic acid decarboxylase, glutamate, and ammonia in mice during hyperbaric oxygenation. *J Neurochem* 28 (4): 861–865.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10640.x>
26. Zhang S, Takeda Y, Hagioka S, Takata K, Aoe H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Morita K (2005) Measurement of GABA and glutamate *in vivo* levels with high sensitivity and frequency. *Brain Res Brain Res Protoc* 14 (2): 61–66.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.03.005>
27. Demchenko IT, Boso AE, O'Neill TJ, Bennett PB, Piantadosi CA (2000) Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* (1985) 88 (4): 1381–1389.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1381>
28. Dean JB, Mulkey DK, Garcia AJ 3rd, Putnam RW, Henderson RA 3rd (2003) Neuronal sensitivity to hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J Appl Physiol* (1985) 95 (3): 883–909.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00920.2002>
29. Alsip NL, DiMicco JA (1992) Time course of effects of 3-mercaptopropionic acid on GABA levels in different brain regions in guinea pigs: possible relationship with associated cardiovascular changes. *Neurochem Res* 17 (5): 443–448.
<https://doi.org/10.1007/BF00969890>
30. Dickinson BC, Chang CJ (2011) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* 7 (8): 504–511.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.607>
31. Corcoran A, Cotter TG (2013) Redox regulation of protein kinases. *FEBS J* 280 (9): 1944–1965.
<https://doi.org/10.1111/febs.12224>
32. Go YM, Jones DP (2013) The redox proteome. *J Biol Chem* 288 (37): 26512–26520.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R113.464131>
33. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1): 444–448.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.444>

34. Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE (2013) Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ Res* 112 (2): 382–392. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268680>
35. Gould N, Doulias PT, Tenopoulou M, Raju K, Ischiropoulos H (2013) Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem* 288 (37): 26473–26479. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.460261>
36. Kovacs I, Lindermayr C (2013) Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Front Plant Sci* 4: 137. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00137>
37. Atochin DN, Demchenko IT, Astern J, Boso AE, Piantadosi CA, Huang PL (2003) Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23 (10): 1219–1226. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000089601.87125.E4>
38. Fink-Jensen A, Suzdak PD, Swedberg MDB, Judge ME, Hansen L, Nielsen PG (1992) The γ -aminobutyric acid (GABA) uptake inhibitor, tiagabine, increases extracellular brain levels of GABA in awake rats. *Eur J Pharmacol* 220 (2–3): 197–201. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90748-s](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90748-s)
39. Van der Zeyden M, Oldenziel WH, Rea K, Cremers TI, Westerink BH (2008) Microdialysis of GABA and glutamate: analysis, interpretation and comparison with microensors. *Pharmacol Biochem Behav* 90 (2): 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.09.004>
40. Del Arco A, Segovia G, Fuxe R, Mora F (2003) Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: An index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 85: 23–33. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01692>
41. Keros S, Hablitz JJ (2005) Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABA conductances in rat neocortex. *J Neurophysiol* 94 (3): 2073–2085. <https://doi.org/10.1152/jn.00520.2005>

ANTICONVULSANT EFFICACY OF INHIBITION OF SYNAPTIC AND EXTRASYNAPTIC GABA-TRANSPORTERS IN PREVENTION OF HYPERBARIC OXYGEN SEIZURES

O. S. Alekseeva^{a,#}, B. A. Gerda^a, A. S. Zhilyaeva^a, and I. T. Demchenko^a

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

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

Hyperbaric oxygen (HBO₂) inhibits GABAergic neurotransmission in the brain, which can lead to the development of a seizure disorders known as “oxygen epilepsy”. Deficiency in GABAergic transmission in HBO₂, resulting from a decrease in the level of synaptic GABA, can be compensated by inhibition of neuronal and glial GABA transporters (GAT). The present study compared the anticonvulsant efficacy of two types of GABA transporters with tiagabine, a GAT-1 inhibitor, and SNAP 5114, a GAT-3 inhibitor. Anticonvulsant effects were assessed after administration of drugs into the lateral cerebral ventricle of rats 30 min before the start of hyperbaric oxygen exposure at 5 ATA. In separate experiments, the concentration of GABA in the striatum of rats was measured when breathing oxygen at a pressure of 5 ATA after GAT inhibition with tiagabine or SNAP 5114. New results obtained in the study were: (1) inhibition of GAT-1 or GAT-3 prevented the development of “oxygen epilepsy” in rats; (2) among the two inhibitors used, TGB was found to be more effective in preventing oxygen convulsions compared to SNAP 5114; (3) the combined use of TGB + SNAP 5114 caused an additive anticonvulsant effect; (4) oxygen convulsions appeared when GABA in the brain decreased by 30–40% of the initial level; (5) GAT-1 inhibition with tiagabine increased extracellular GABA 2.9-fold and 1.7-fold with SNAP 5114. GAT-1 and GAT-3 inhibition increased GABA to a level sufficient to restore impaired inhibitory neurotransmission in HBO₂, and prevented the development of hyperbaric oxygen convulsions.

Keywords: hyperbaric oxygen, oxygen neurotoxicity, hyperbaric oxygen seizures, GABA transporters, tiagabine, SNAP 5114

БИЛАТЕРАЛЬНАЯ СИНХРОНИЗАЦИЯ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ ТЕТА-ОСЦИЛЛЯЦИЙ *IN VITRO*

© 2023 г. И. Халилов^{1,2,§}, А. Гайнутдинов^{1,§}, Р. Хазипов^{1,2,*.§}

¹Институт нейробиологии Средиземноморья АМН Франции,
Университет Экс-Марселя, Марсель, Франция

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: roustem.khazipov@inserm.fr

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 22.04.2023 г.

Тета-осцилляции гиппокампа являются ключевым сетевым паттерном активности, вовлеченным в реализацию таких функций, как пространственная навигация, обучение и память. У животных *in vivo* тета-осцилляции гиппокампа демонстрируют билатеральную синхронизацию. Осцилляции в тета-частотном диапазоне также были описаны в интактных препаратах гиппокампа *in vitro*. Однако остается неясным, каким образом тета-осцилляции синхронизируются между левым и правым гиппокампами. Для исследования этого вопроса был использован препарат интактных гиппокампов, соединенных вентральными гиппокампальными комиссурами *in vitro*, полученных от ювенильных и взрослых крыс или мышей. Локальные полевые потенциалы и спайковая активность нейронов регистрировались с помощью внеклеточных электродов из слоя пирамидных клеток и *stratum radiatum* CA1 области левого и правого гиппокампа. Было обнаружено, что активность нейронной сети в левом и правом гиппокампе организована в тета-осцилляции, которые модулируют спайковую активность CA1 нейронов. Как спайковая активность CA1 нейронов, так и полевые тета-осцилляции демонстрировали высокий уровень двусторонней синхронизации в левом и правом гиппокампах. После хирургического рассечения вентральной комиссуры тета-осцилляции сохранялись с обеих сторон, но их двусторонняя синхронизация полностью устранялась. Таким образом, тета-осцилляции синхронизированы в левом и правом гиппокампах *in vitro*, и билатеральная синхронизация тета-осцилляций *in vitro* обеспечивается межгиппокампальными комиссуральными связями.

Ключевые слова: гиппокамп, тета-осцилляции, двусторонние, синхронизация, вентральная комиссура гиппокампа

DOI: 10.31857/S004445292303004X, **EDN:** YHGGYA

ВВЕДЕНИЕ

Межполушарная (билатеральная) синхронизация является важным свойством нейронной сетевой активности в гиппокампальной системе. Одновременная регистрация активности в правом и левом гиппокампах позволила выявить высокий уровень синхронизации различных паттернов электрической активности в этих структурах [1–12]. Билатеральная синхронизация нейрональной активности является характерным свойством также и тета-осцилляций в гиппокампальной системе *in vivo* [3]. Тета-осцилляции возникают в гиппокампе во время движения животного (а также во время быстрого сна) и являются инструментом для связывания нейрональных ансамблей гиппокампа (так называемых “клеток места”) при навигации в пространстве [13–16]. Предполагается, что этот

процесс основан на сравнении сенсорной информации, поступающей в гиппокамп из энторинальной коры, и внутренних моделей, закодированных в нейронных сетях самого гиппокампа, в каждом цикле тета-осцилляций. Учитывая контралатеральную организацию сенсорных потоков, билатеральная синхронизация тета-активности в гиппокампальной системе является необходимым условием для их интеграции в ходе пространственной навигации. Было предположено, что это может достигаться синхронным входом из энторинальной коры, а также в результате билатеральной синхронизации в энторинальной коре посредством межкорковых связей [9, 17–19]. Было также предположено, что билатеральная синхронизация внутренних моделей может, в свою очередь, осуществляться посредством CA3-CA3 и CA3-CA1 билатеральных связей в составе гиппокампальной комиссуры [20]. Однако механизмы билатеральной синхронизации

§ В равной степени участвующие авторы.

тета-осцилляций до сих пор остаются лишь гипотетическими и требуют прямой экспериментальной проверки.

Ранее было показано, что в *in vitro* препарате изолированного гиппокампа ювенильных и взрослых мышей возникают автономные спонтанные осцилляции в частотном диапазоне, близком к частоте тета-осцилляций, наблюдаемых *in vivo* [21–24]. Мы предположили, что более комплексная модель гиппокампальной системы *in vitro*, которая включает в себя оба изолированных интактных гиппокампа, соединенных вентральной комиссурой [25–28], может быть использована для исследования межгиппокампальной синхронизации тета-осцилляций посредством комиссуральных связей, что и было реализовано в настоящем исследовании.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на препаратах целых гиппокампов, соединенных вентральной гиппокампальной комиссурой, выделенных у крыс породы Вистар в возрасте от P13 до P15 ($n = 4$; P – возраст в днях после рождения) и мышей линии C57BL в возрасте P22, P57 и 1 год ($n = 3$). Процедуры приготовления препарата гиппокампов подробно описаны ранее [26]. После декапитации под изофлюрановым наркозом мозг животных быстро извлекали и погружали в ледяной оксигенированный (95% O₂/5% CO₂) раствор искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦСЖ) следующего состава (в mM): NaCl – 126; KCl – 3.5; CaCl₂ – 2.0; MgCl₂ – 1.3; NaHCO₃ – 25; NaH₂PO₄ – 1.2; глюкоза – 11 (pH – 7.4). После удаления мозжечка и лобных долей комплекс, включающий два взаимосвязанных комиссурой гиппокампа, изолировался от окружающих структур с помощью следующей процедуры: ствол мозга, средний мозг и полосатое тело аккуратно отделялись от гиппокампа двумя шпательями. Затем неокортекс отсекался путем скольжения вдоль мозолистого тела вдоль дорсальной поверхности гиппокампа и перегородки шпателем, вставленным в боковой желудочек. Далее препарат двойного гиппокампа выделялся из септо-гиппокампального комплекса. В препарате сохранялись небольшие фрагменты окружающей ткани для механической фиксации в камере с дном, покрытым силгардом, с использованием энтомологических игл. Полная процедура извлечения препарата гиппокампов занимала 8–10 мин. Затем препарат осторожно переносили и выдерживали в ИЦСЖ при комнатной температуре (20–22°C) не менее одного часа перед регистрацией. Для регистрации препарат помещали в специальную камеру с дном из нейлоновой сетки и непрерывно перфузировали ИЦСЖ со скоростью ~15 мл/мин. Внеклеточную регистрацию локальных полевых потенциалов (ЛПП [local field potentials, LFP]) и множественных потенциалов действия нейронов (МПД [multiple

unit activity, MUA]) проводили с помощью электродов, изготовленных из вольфрамовой проволоки (диаметр 50 мкм, California Fine Wire, Grover Beach, CA, США), располагаемых в зоне пирамидного слоя или в stratum radiatum CA1 зоны гиппокампов. Регистрирующие электроды располагались в средней части гиппокампов на равном удалении от септального полюса. Усиление и оцифровку регистрируемых сигналов осуществляли с помощью усилителя DAM-8A ($\times 1000$, в полосе 0.1 Гц – 3 кГц) и аналого-цифрового преобразователя Digidata 1440A (Molecular Devices, CA, США) с частотой 10 кГц. Исходные данные были предварительно обработаны с помощью разработанных нами функций на основе пакета программ Matlab. Исходный сигнал был прорежен до 1 кГц и в дальнейшем использовался для анализа ЛПП. Для детекции потенциалов действия исходный сигнал был пропущен через фильтр низких частот (порог пропускания 200 Гц), и отрицательные события с амплитудой, превышающей 3 стандартные девиации, принимались за потенциалы действия. ЛПП и МПД анализировались с помощью разработанных нами функций на основе пакета программ Matlab (MathWorks, США). Для определения фазы тета-осцилляций применялись следующие операции. ЛПП раскладывался на реальную и воображаемую часть через преобразование Гильберта. Затем, чтобы получить угол в радианах в интервале $[-\pi, \pi]$, над полученными реальной и воображаемой частью применялась операция четырех-квадрантного арктангенса. Для анализа фазовой модуляции частоты МПД тета-осцилляциями использовался тест Релея из пакета функций для Matlab – circular statistics. Амплитуда результирующего вектора Релея показывает степень модуляции частоты МПД тета-осцилляциями, а его угол – фазу тета-осцилляции, на которой располагается результирующий вектор Релея. Групповые данные представлены как медиана (Q1 – Q3). Для сравнения тета-частот до и после перерезки комиссуральных связей применялся тест Уилкоксона для связанных выборок. Статистическую оценку различий в сравниваемых выборках оценивали для 5%-ного уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спонтанная активность в изолированном гиппокампе крыс и мышей в возрасте старше 2 нед характеризовалась осцилляциями в тета-частотном диапазоне с циклическими изменениями ЛПП с максимальной амплитудой в stratum radiatum CA1 (рис. 1). По результатам анализа с использованием быстрого преобразования Фурье пиковые значения мощности 1.8 (0.6 – 8.0) мкВ²/Гц тета-осцилляций наблюдались на частоте 2.0 (1.5 – 2.4) Гц ($n = 7$; минимум 1.5 и максимум 8.1 Гц). Спайковая активность в пирамидном слое CA1 значительно модулировалась тета-осцилляциями, что характеризо-

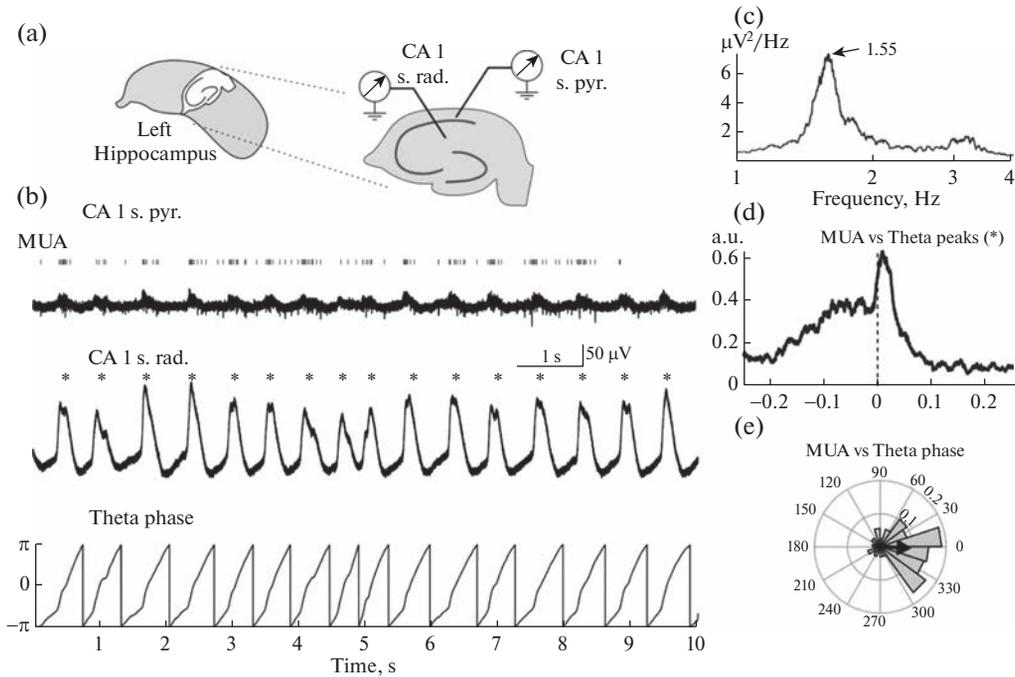


Рис. 1. Тета-осцилляции в изолированном гиппокампе *in vitro*. (a) – Схема расположения электродов в интактном гиппокампе *in vitro*. (b) – Примеры одновременной регистрации ЛПП и МПД в пирамидном слое и stratum radiatum CA1 гиппокампа. МПД обозначены вертикальными серыми линиями. * – пики тета-осцилляций. Под записью ЛПП в stratum radiatum слое представлен результат преобразования Гильберта ЛПП-сигнала в фазы тета-осцилляции. (c) – График спектра мощности ЛПП в stratum radiatum CA1. (d) – Временная кросс-корреляция МПД в CA1 пирамидном слое с пиком ЛПП тета-осцилляций, записанных в stratum radiatum. (e) – Циркулярная гистограмма частоты МПД относительно фазы тета-осцилляции. Вектор Релея обозначен черным цветом.

валось высокими значениями кросс-корреляции между МПД и ЛПП тета-осцилляций (рис. 1d). В соответствии с этими наблюдениями, циркулярный статистический анализ активности нейронов выявил, что амплитуда значений вектора Релея (0.075 (0.054 – 0.112)) достигается непосредственно перед пиком тета-осцилляций (угол вектора Релея –32.8 (–35.7 – –5.1) градусов) ($n = 7$) (рис. 1e).

Для исследования билатеральной организации тета-осцилляций была проведена одновременная регистрация активности в левом и правом гиппокампах с сохраненными комиссуральными связями (рис. 2). Было обнаружено, что тета-осцилляции высоко синхронизированы между обоими гиппокампами, о чем свидетельствовал высокий уровень кросс-корреляции между ЛПП в двух гиппокампах, значения которой достигали 0.77 (0.55 – 0.93), с временной задержкой 4.4 (–10.3 – 6.6) мс пиковых значений кросс-корреляции между правым и левым гиппокампом ($n = 7$). Также о высоком уровне билатеральной синхронизации тета-осцилляций свидетельствовала высокая корреляция между МПД в правом и левом гиппокампах, достигающая значений 0.15 (0.12 – 0.18) с временной задержкой 2.9 (–43.7 – 19.8) мс пиковых значений кросс-корреляции МПД между правым и левым гиппокампами ($n = 5$). В различных экспериментах наблю-

далось преобладающее лидерование либо левого, либо правого гиппокампа, но достоверного лидерования одной из сторон в генерации тета-осцилляций на групповом уровне не выявлялось.

Перерезка комиссуральных связей приводила к полной десинхронизации тета-осцилляций в левом и правом гиппокампах, о чем свидетельствовало исчезновение достоверной билатеральной корреляции между колебаниями ЛПП и МПД ($n = 4$; рис. 3). Частота тета-осцилляций после перерезки комиссуральных связей достоверно не изменялась ни в правом, ни в левом гиппокампах ($p = 0.93$; $n = 4$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными результатами настоящего исследования являются демонстрация высокого уровня синхронизации тета-осцилляций в препарате левого и правого гиппокампов ювенильных и взрослых крыс и мышей *in vitro*, и доказательство того, что билатеральная синхронизация этих тета-осцилляций обеспечивается комиссуральными связями между гиппокампами.

Модель гиппокампальной системы *in vitro*, которая включает в себя оба изолированных интактных гиппокампа, соединенных вентральной ко-

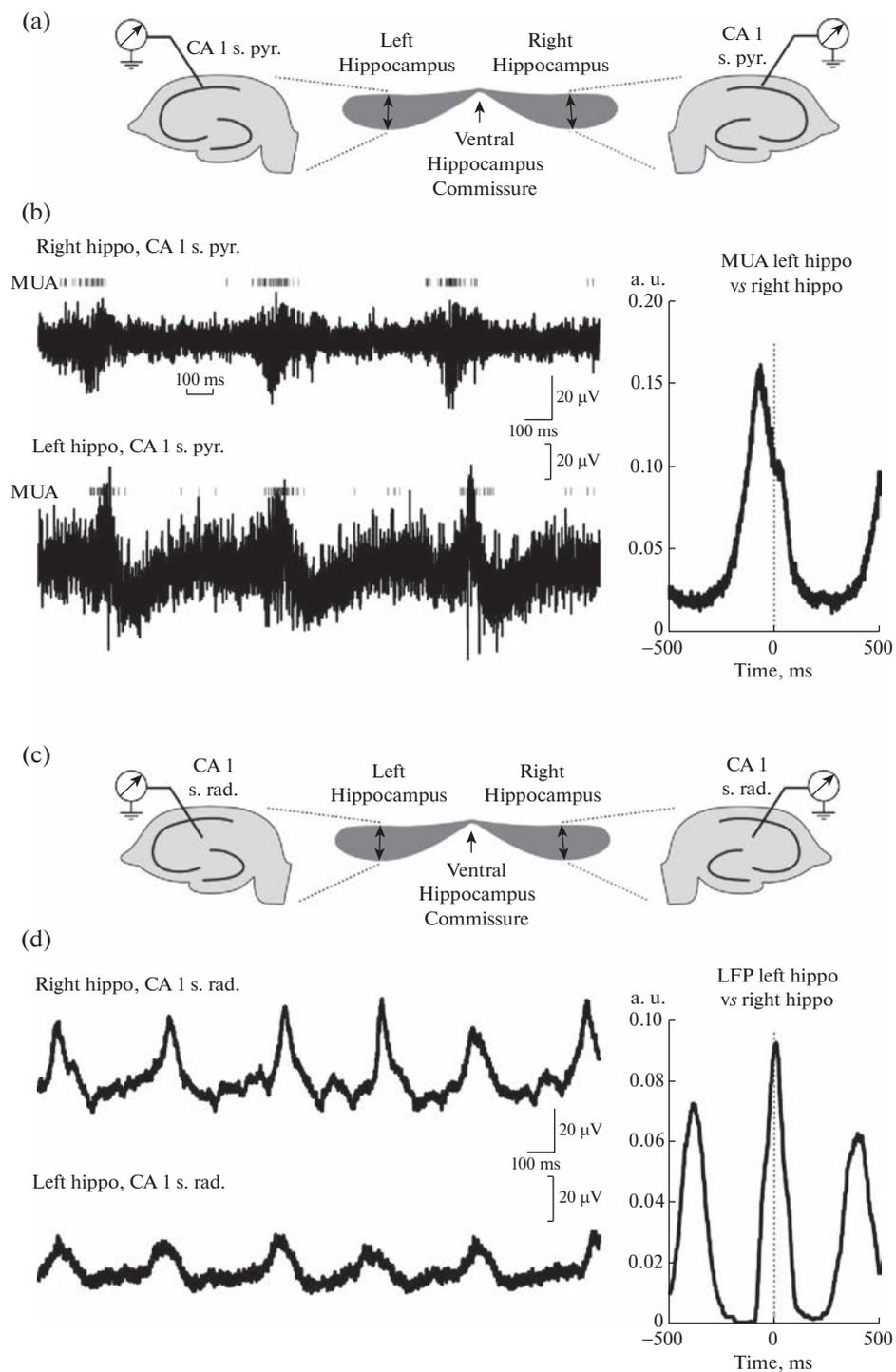


Рис. 2. Билатеральная синхронизация тета-осцилляции в связанных комиссурой правом и левом гиппокампах *in vitro*. (a) – Схема расположения электродов в препарате связанных комиссурой гиппокампов *in vitro*. (b) – Примеры одновременной регистрации ЛПП и МПД в пирамидном слое CA1 левого и правого гиппокампов. МПД обозначены вертикальными серыми линиями. Справа – график кросс-корреляции МПД в CA1 пирамидном слое левого и правого гиппокампов. (c) – Схема расположения электродов в препарате связанных комиссурой гиппокампов *in vitro* для регистрации ЛПП. (d) – Примеры одновременной регистрации ЛПП в stratum radiatum CA1 левого и правого гиппокампов. Справа – график кросс-корреляции ЛПП в левом и правом гиппокампах.

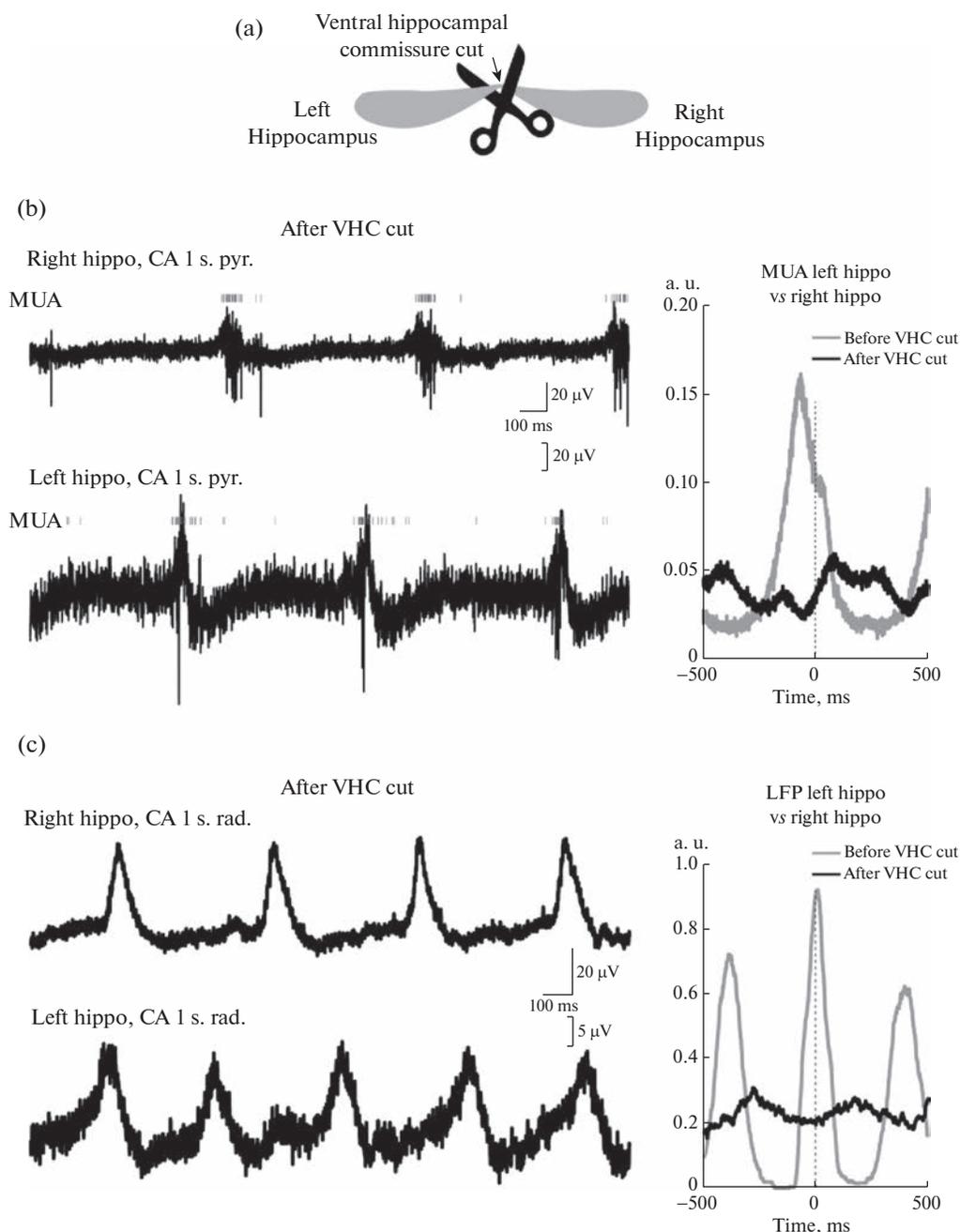


Рис. 3. Перерезка гиппокампальной комиссуры устраняет билатеральную синхронизацию тета-осцилляций. (a) – Схема расположения электродов в препарате двух гиппокампов *in vitro* после полной перерезки вентральной и дорсальной комиссур. (b) – Примеры одновременной регистрации ЛПП и МПД в пирамидном слое CA1 левого и правого гиппокампов. МПД обозначены вертикальными серыми линиями. Справа – график кросс-корреляции МПД в CA1 пирамидном слое левого и правого гиппокампов до и после перерезки вентральной комиссуры. (c) – Примеры одновременной регистрации ЛПП в stratum radiatum CA1 левого и правого гиппокампов. Справа – график кросс-корреляции ЛПП в левом и правом гиппокампах до и после перерезки вентральной комиссуры.

миссурой [25–28], была изначально разработана для онтогенетических исследований. Эта модель позволила охарактеризовать билатеральную синхронизацию посредством комиссуральных связей во время гигантских деполяризующих потенциалов [28], а также при распространении пароксиз-

мальных разрядов [25, 27, 29–31] в развивающейся гиппокампальной системе крыс и мышей. Изначально предполагалось, что данная модель имеет возрастные ограничения и может быть использована лишь в постнатальном периоде (до постнатального дня P10) в связи с увеличением толщины гип-

покампа и сужения внеклеточного пространства, что ухудшает проникновение метаболитов из омывающего раствора вглубь препарата по мере взросления, а также в связи с возрастным увеличением энергопотребления [26]. Однако оптимизация экспериментальных условий, в первую очередь, значительное увеличение скорости протока омывающего препарат раствора позволили добиться условий, при которых сохраняются мембранный потенциал нейронов, функциональные синаптические связи и сетевые взаимодействия в интактных гиппокампах даже взрослых животных [21]. Обнаружилось, что в этих условиях в изолированном гиппокампе ювенильных и взрослых мышей возникают автономные спонтанные осцилляции в частотном диапазоне, близком к частоте тета-осцилляций, наблюдаемых *in vivo*. Данная модель тета-осцилляций позволила получить важные знания о клеточных, синаптических и сетевых механизмах тета-осцилляций [21–24]. Очевидно, что данная модель имеет ограничения, связанные с отсутствием ряда ключевых корковых и подкорковых структур, которые принимают участие в тета-генезе *in vivo*, но при этом является вполне адекватной для исследования интрагиппокампального компонента тета-осцилляций.

Тета-осцилляции в изолированных гиппокампах *in vitro*, которые описываются в настоящем исследовании, генерируются в нейрональных сетях самих гиппокампов, поскольку энторинальная кора в этом препарате отсутствует. Таким образом, тета-осцилляции изолированных гиппокампов могут быть релевантными компоненту “внутренних моделей” тета-осцилляций *in vivo* и также соответствовать, например, генерируемому в СА3 сетях тета-осцилляциям у животных, находящихся под уретановым наркозом или после билатеральной резекции энторинальной коры [32–34]. Соответственно билатеральная синхронизация тета-осцилляций в препарате двух гиппокампов *in vitro*, которая была обнаружена в настоящем исследовании, может свидетельствовать о наличии механизма интеграции “внутренних моделей” путем билатеральной синхронизации нейрональных сетей гиппокампов в тета-осцилляции посредством прямых связей, организованных в вентральной гиппокампальной комиссуре. Для того, чтобы установить значимость комиссуральных связей в билатеральной синхронизации физиологических тета-осцилляций *in vivo*, в дальнейших исследованиях представляет интерес проверить эффект перерезки комиссуральных связей на билатеральную тета-синхронизацию в интактном животном.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые с использованием животных, соответствовали этическим стандартам, утвер-

жденным законодательными актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации и рекомендациям Директивы 2010/63/EU по проведению экспериментов на животных, все протоколы по использованию животных были одобрены Национальным институтом здравоохранения и медицинских исследований Франции (APAFIS #16992- 2020070612319346 v2) и локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (#24/ 22.09.2020).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Agence Nationale de la Recherche (проект № ANR-21-CE16-0005-01 “DevHippo”) и в рамках программы исследований Приоритет-2030, запланированных в Казанском (Приволжском) федеральном Университете.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Р.Х.), сбор данных (И.Х.), обработка данных (А.Г.), написание и редактирование манускрипта (Р.Х., А.Г., И.Х.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suzuki SS, Smith GK (1987) Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates, laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67 (4): 348–359. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(87\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(87)90123-4)
2. Buzsaki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience* 31 (3): 551–570. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90423-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90423-5)
3. Buzsaki G, Buhl DL, Harris KD, Csicsvari J, Czeh B, Morozov A (2003) Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* 116 (1): 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00669-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00669-3)
4. Buzsaki G (2015) Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25 (10): 1073–1188. <https://doi.org/10.1002/hipo.22488>
5. Carr MF, Karlsson MP, Frank LM (2012) Transient slow gamma synchrony underlies hippocampal memory replay. *Neuron* 75 (4): 700–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.014>
6. Shinohara Y, Hosoya A, Hirase H (2013) Experience enhances gamma oscillations and interhemispheric asymmetry in the hippocampus. *Nat Commun* 4: 1652. <https://doi.org/10.1038/ncomms2658>
7. Pfeiffer BE, Foster DJ (2015) PLACE CELLS. Autoassociative dynamics in the generation of sequences of hippocampal place cells. *Science* 349 (6244): 180–183. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9633>

8. Wang Y, Toprani S, Tang Y, Vrabec T, Durand DM (2014) Mechanism of highly synchronized bilateral hippocampal activity. *Exp Neurol* 251: 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.014>
9. Benito N, Martin-Vazquez G, Makarova J, Makarov VA, Herreras O (2016) The right hippocampus leads the bilateral integration of gamma-parsed lateralized information. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16658>
10. Tanaka M, Wang X, Mikoshiba K, Hirase H, Shinohara Y (2017) Rearing-environment-dependent hippocampal local field potential differences in wild-type and inositol trisphosphate receptor type 2 knockout mice. *J Physiol* 595 (20): 6557–6568. <https://doi.org/10.1113/JP274573>
11. Valeeva G, Nasretdinov A, Rychkova V, Khazipov R (2019) Bilateral Synchronization of Hippocampal Early Sharp Waves in Neonatal Rats. *Front Cell Neurosci* 13: 29. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00029>
12. Khazipov R, Holmes GL (2003) Synchronization of kainate-induced epileptic activity via GABAergic inhibition in the superfused rat hippocampus *in vivo*. *J Neurosci* 23 (12): 5337–5341. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-05337.2003>
13. Buzsaki G (2002) Theta Oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325–340. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00586-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00586-x)
14. Buzsaki G, Moser EI. (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 16 (2): 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
15. Colgin LL (2013) Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annu Rev Neurosci* 36: 295–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170330>
16. Hasselmo ME (2005) What is the function of hippocampal theta rhythm?—Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus* 15 (7): 936–949. <https://doi.org/10.1002/hipo.20116>
17. Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Buzsaki G (2009) Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. *Neuron* 64 (2): 267–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.037>
18. Shinohara Y, Hosoya A, Yahagi K, Ferecsko AS, Yaguchi K, Sik A, Itakura M, Takahashi M, Hirase H (2012) Hippocampal CA3 and CA2 have distinct bilateral innervation patterns to CA1 in rodents. *Eur J Neurosci* 35 (5): 702–710. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.07993.x>
19. Fernandez-Ruiz A, Oliva A, Nagy GA, Maurer AP, Berenyi A, Buzsaki G (2017) Entorhinal-CA3 Dual-Input Control of Spike Timing in the Hippocampus by Theta-Gamma Coupling. *Neuron* 93: 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.017>
20. Buzsaki G, Eidelberg E (1982) Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Res* 237 (2): 283–295. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90442-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90442-5)
21. Goutagny R, Jackson J, Williams S (2009) Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12 (12): 1491–1493. <https://doi.org/10.1038/nn.2440>
22. Ducharme G, Lowe GC, Goutagny R, Williams S (2012) Early Alterations in Hippocampal Circuitry and Theta Rhythm Generation in a Mouse Model of Prenatal Infection: Implications for Schizophrenia. *Plos One* 7 (1):8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029754>
23. Jackson J, Amilhon B, Goutagny R, Bott JB, Manseau F, Kortleven C, Bressler SL, Williams S (2014) Reversal of theta rhythm flow through intact hippocampal circuits. *Nat Neurosci* 17 (10): 1362–1370. <https://doi.org/10.1038/nn.3803>
24. Amilhon B, Huh CYL, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, Williams S (2015) Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron* 86 (5): 1277–1289. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.027>
25. Khalilov I, Dzhala V, Medina I, Leinekugel X, Melyan Z, Lamsa K, Khazipov R, Ben-Ari Y (1999) Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures *in vitro*. *Eur J Neurosci* 11 (10): 3468–3480. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00768.x>
26. Khalilov I, Esclapez M, Medina I, Aggoun D, Lamsa K, Leinekugel X, Khazipov R, Ben-Ari Y (1997) A novel *in vitro* preparation: the intact hippocampal formation. *Neuron* 19 (4): 743–749. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80956-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80956-3)
27. Khazipov R, Desfreres L, Khalilov I, Ben-Ari Y (1999) Three-independent-compartment chamber to study *in vitro* commissural synapses. *J Neurophysiol* 81 (2): 921–924. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.2.921>
28. Leinekugel X, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1998) Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex *in vitro*. *J Neurosci* 18 (16): 6349–6357. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06349.1998>
29. Khalilov I, Holmes GL, Ben Ari Y (2003) *In vitro* formation of a secondary epileptogenic mirror focus by inter-hippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 6 (10): 1079–1085. <https://doi.org/10.1038/nn1125>
30. Khalilov I, Le Van QM, Gozlan H, Ben Ari Y (2005) Epileptogenic Actions of GABA and Fast Oscillations in the Developing Hippocampus. *Neuron* 48 (5): 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.026>
31. Nardou R, Ben-Ari Y, Khalilov I (2009) Bumetanide, an NKCC1 antagonist, does not prevent formation of epileptogenic focus but blocks epileptic focus seizures in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 101 (6): 2878–2888. <https://doi.org/10.1152/jn.90761.2008>
32. Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, Buzsaki G (1995) Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus* 5 (1): 78–90. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050110>

33. Buzsaki G, Czopf J, Kondakor I, Kellenyi L (1986) Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat: current-source density analysis, effects of urethane and atropine. *Brain Res* 365 (1): 125–137.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90729-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90729-8)
34. Kamondi A, Acsady L, Wang XJ, Buzsaki G (1998) Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precission of action potentials. *Hippocampus* 8 (3): 244–261.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J)

BILATERAL SYNCHRONIZATION OF HIPPOCAMPAL THETA-OSCILLATIONS *IN VITRO*

I. Khalilov^{a,b}, A. Gainutdinov^a, and R. Khazipov^{a,b,#}

^a*Aix-Marseille University, INMED, INSERM, Marseille, France*

^b*Laboratory of Neurobiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia*

[#]*e-mail: roustem.khazipov@inserm.fr*

Hippocampal theta oscillations are pivotal for hippocampal functions of spatial navigation, learning and memory. In the behaving animals *in vivo*, hippocampal theta oscillations display bilateral synchronization. Internally generated oscillations in the theta frequency range have also been described in the intact hippocampus preparation *in vitro*. How theta oscillations are synchronized between the left and right hippocampi remains elusive, however. We used preparation of the intact hippocampi interconnected by the ventral hippocampal commissure prepared from juvenile and adult mice and rats *in vitro*. Local field potentials and multiunit activity were recorded using extracellular electrodes from the pyramidal cell layer and stratum radiatum of the left and right hippocampi. Neuronal network activity in the left and right hippocampi was organized in theta oscillations, which strongly modulated neuronal firing of CA1 neurons. Both neuronal activity and field potential theta oscillations showed high levels of bilateral synchronization. Theta oscillations persisted on both sides, but their bilateral synchronization was eliminated after surgical cut of the ventral hippocampal commissure. Thus, theta oscillations are synchronized in the left and right hippocampi *in vitro*, and their bilateral synchronization is provided by the ventral commissural connections.

Keywords: hippocampus, theta oscillations, bilateral, synchronization, ventral hippocampal commissure

ИММУНОФЕНОТИП МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ И ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2023 г. Е. Г. Учасова^{1,*}, Ю. А. Дылева¹, Е. В. Белик¹, В. Г. Матвеева¹, С. М. Гусев¹, О. Л. Тарасова², О. В. Груздева^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

²Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

*e-mail: evg.uchasova@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 21.04.2023 г.

Цель работы – оценить иммунофенотип стволовых клеток жировой ткани, выделенных из жировых депозитов эпикардиальной и периваскулярной области у пациентов с ишемической болезнью сердца и приобретенными пороками сердца. В культуре клеток, полученной из эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани (2-й пассаж) у пациентов как с ишемической болезнью сердца, так и с приобретенными пороками сердца, наблюдалась высокая (более 90%) экспрессия мембранных белков, характерных для стволовых клеток. Кроме основной популяции, как в культуре эпикардиальной, так и в периваскулярной жировой ткани присутствовали две минорные: 1) – CD90⁻, CD105⁺, CD34^{+/+}, CD73⁺, CD45⁻ – предположительно эндотелиальная популяция; 2) – CD90⁺, CD105⁻, CD34⁻, CD73⁻, CD45⁻ – самая малочисленная популяция. Вывод: на ранних сроках культивирования клетки стромально-васкулярной фракции, выделенные из эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани, экспрессируют поверхностные маркеры, характерные для стволовых клеток жировой ткани.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, ишемическая болезнь сердца, приобретенные пороки сердца

DOI: 10.31857/S0044452923030099, EDN: YHWKHY

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря набору уникальных свойств, например, способности дифференцироваться в различные типы клеток соединительной ткани, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) все больше привлекают внимание исследователей. До настоящего времени большое число работ было посвящено изучению мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Однако не так давно в стромально-васкулярной фракции жировой ткани обнаружили стволовые клетки, которые в отличие от стволовых клеток костного мозга быстрее растут и доступны в большом количестве при сборе из небольшого объема жировой ткани [1, 2]. Так, например, только 0.001–0.01% мононуклеарных клеток в костном мозге являются стволовыми, в то время как из 1 г жировой ткани можно выделить 5×10^3 стволовых клеток, что в 500 раз больше, чем из такого же количества клеток в костном мозге [3]. В результате, в последнее время МСК жировой ткани (МСК-ЖТ)

становятся привлекательной и альтернативной популяцией мультипотентных клеток – как для исследований, так и для тканевой заместительной терапии [4].

Согласно определению Международного общества по клеточной терапии (ISCT), МСК обладают следующим иммунофенотипом: CD73⁺, CD90⁺ и CD105⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, CD11b⁻, CD79a⁻, CD19⁻ и характеризуются отсутствием поверхностных молекул HLA-DR. Учитывая различные источники выделения МСК, в 2013 г. ISCT внесла небольшую редакцию для характеристики мезенхимальных клеток, выделенных из жировой ткани [3]. Помимо уже описанных положительных маркеров [4], были включены поверхностные маркеры CD13, CD29, CD44; к отрицательным маркерам были отнесены CD31 и CD235a. Кроме того, были описаны и другие маркеры, но их экспрессия на МСК-ЖТ достаточно вариабельна и сильно зависит от условий культивирования и количества пассажей [5]. Есть предположения, что иммунофено-

тип МСК-ЖТ может различаться в зависимости от условий культивирования, количества пассажей и локализации жировой ткани в организме [6].

В настоящее время большое количество исследований посвящено изучению морфологии и иммунофенотипа подкожных и висцеральных МСК-ЖТ из-за возможности легкого получения клеток. Экспериментальных работ, направленных на изучение МСК кардиальной локализации, в настоящее время недостаточно.

Цель работы – оценить иммунофенотип стволовых клеток жировой ткани, выделенных из эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани, у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и приобретенными пороками сердца.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

В исследование было включено 8 пациентов, подписавших добровольное информированное согласие на участие, среди которых было 4 пациента с ИБС в возрасте до 75 лет (основная группа) и 4 пациента с некоронарогенной патологией сердца – дегенеративные приобретенные неревматические пороки сердца (аортальный стеноз/недостаточность) и показаниями для проведения открытой операции на клапанах сердца, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Все пациенты имели показания для проведения открытого вмешательства на сердце – прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования или операции на клапанах сердца. В исследование не включали пациентов старше 75 лет, с наличием клинически значимых сопутствующих патологий (сахарного диабета 1-го и 2-го типа, инфаркта миокарда, анемии, почечной и печеночной недостаточности, онкологических и инфекционно-воспалительных заболеваний в период обострения, аутоиммунных заболеваний). Стволовые клетки жировой ткани выделяли из биоптатов жировой ткани подкожной, эпикардиальной и периваскулярной локализации (3–5 г). Источник эпикардиальной жировой ткани – правые отделы сердца, зоны ее наибольшего присутствия (правое предсердие и правый желудочек); периваскулярной жировой ткани – область правой коронарной артерии. Полученные образцы жировой ткани тщательно промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS) (Gibco, Китай) для очистки поверхности жировой ткани от тромбов, эритроцитов и местных анестетиков. Затем жировую ткань помещали в 20 мл PBS с добавлением пенициллина (600 ЕД/мл) (Gibco, США) и стрептомицина (300 мг/мл, Gibco, США) в пробирку объемом 50 мл на 5–10 мин при комнатной температуре для удаления остатков кровеносных сосудов, соедини-

тельной ткани и/или дермы жировой ткани. После повторной промывки и очистки ткань была перенесена в культуральную чашку диаметром 10 см с добавлением 2 мл PBS и разрезана на маленькие кусочки неправильной формы (1–3 мм²) ножницами, средняя масса кусочков была около 4 г. Далее маленькие кусочки жировой ткани были пипетированы в культуральные флаконы (Biologix, Германия) объемом 25 см² и выровнены с интервалами расстояния 0.3–0.4 см. Клетки инкубировали в CO₂ – инкубаторе (5% CO₂, 95% воздуха, 37°C), в среде, поддерживающей рост МСК (MesenCult Proliferation Kit, STEMCELL Technologies, Канада), с добавлением антибиотиков и антимикотика (100 Ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина, 0.4% амфотерицина В, Gibco, США). Когда первичные клетки достигали 80–90% конфлюентности, их обрабатывали 0.25%-ным раствором трипсина, содержащим 0.02% ЭДТА (Trypsin/EDTA, CELL, США), переносили в культуральные флаконы объемом 75 см² (Biologix, Германия) и культивировали до 80–90% слияния клеток. Далее производили подсчет клеток с помощью автоматического клеточного счетчика Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) и осуществляли иммунофенотипирование клеток.

Иммунофенотипирование клеток (проточная цитометрия)

Клеточную суспензию МСК-ЖТ на пассаже 2, собранную с использованием 0.25%-ного трипсина/ЭДТА, центрифугировали при 100 g в течение 5 мин. Для окрашивания в пробирки отбирали 1×10^5 клеток культуры, снятых с пластика и отмытых PBS. В работе использовали комбинацию конъюгированных моноклональных антител: CD90 FITC (BC, IM1839U), CD 34 APC (BC, PN IM2472U), CD73 APC Cy7 (Biolegend, 344022), CD 105 PE (Biolegend, 323206), Pacific Blue CD 45 (Biolegend, 304029). В пробу вносили антитела в объеме, указанном производителем, с дальнейшей инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Окрашенные пробы ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном лазерном цитометре CytoFlex (США) в программе CytExpert 2.1. Для настройки прибора использовали образцы с соответствующими изотипическими контролями и последующим выполнением всех этапов аналогично основной пробе. Анализ всех образцов выполняли на единых настройках прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стромально-сосудистую фракцию, взятую из эпикардиальной и периваскулярной области у пациентов с ишемической болезнью сердца и приобретенными пороками сердца, культивировали в

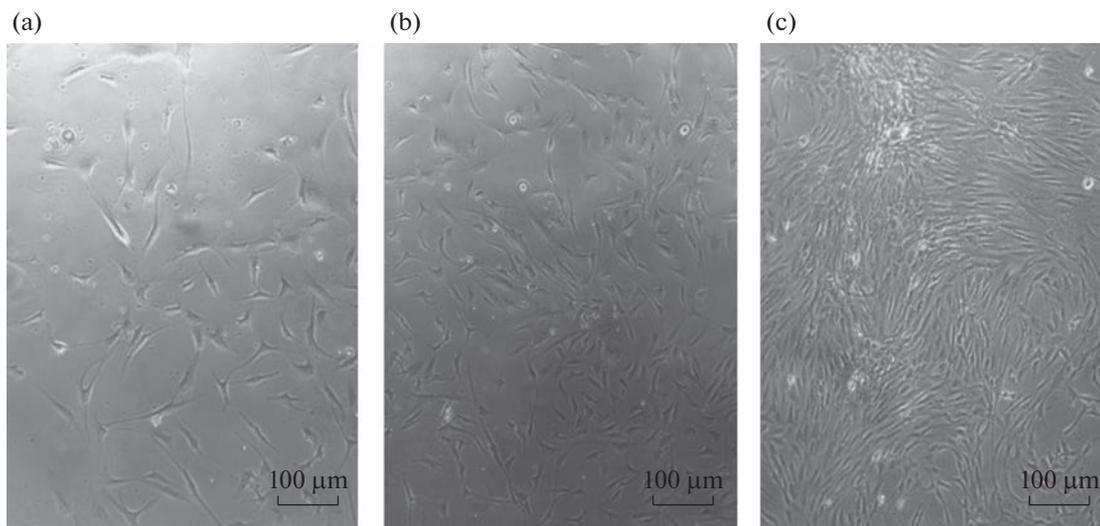


Рис. 1. МСК в культурах, полученных из эпикардиальной жировой ткани на 5-е сутки (а), эпикардиальной жировой ткани на 9-е сутки (б), эпикардиальной жировой ткани на 16-е сутки (с) у пациента с ИБС.

стандартных условиях. На третий день первичной культуры во всех флаконах эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани по краям кусочков ткани появилось множество мелких пятнистых клеток, которые продолжали расти и пролиферировать. На 5–6-е сутки культивируемые *in vitro* жировые стволовые клетки стали приобретать фибробластоподобную и веретеновидную форму, и эта морфология сохранялась на протяжении всего времени культивирования. При этом морфология клеток не различалась от локализации жировой ткани (рис. 1).

К 9–11-м суткам культивирования стали появляться множественные колонии клеток, при этом у пациента с ишемической болезнью сердца процент конfluентности монослоя в периваскулярной жировой ткани составил около 45%, а в эпикардиальной жировой ткани в среднем 35%, в то время как у больного с приобретенным пороком сердца данный процент во всех жировых депо составил больше 50%.

На 16-й день культивирования процент плотности заселения монослоя клеток во всех исследованных образцах составил более 80%, и клетки были пересажены на культуральный флакон объемом 75 см². При достижении клетками 80–90% монослоя производили подсчет клеток и получили, что у пациента с ИБС из эпикардиальной жировой ткани выделено 2.53×10^6 /мл клеток, в то время как из периваскулярной жировой ткани – 9.44×10^6 /мл клеток. У пациента с приобретенными пороками сердца число выделенных клеток из эпикардиальной жировой ткани составило 5.51×10^6 /мл, из периваскулярной жировой ткани – 1.57×10^6 /мл.

При оценке иммунофенотипа культур клеток второго пассажа получено, что в эпикардиальной жировой ткани пациента с ИБС на 79.7% клеток присутствовали поверхностные маркеры CD105 и CD 90, при этом один антигенный маркер CD105 был на 17.5% клеток (рис. 2). Мезенхимальные маркеры CD73 и CD90 присутствовали на 79.5% клеток, один CD73 на поверхности 18.3% клеток, в то время как CD34 был только на 3.8% клеток. Таким образом, фенотип культуры клеток, полученной из эпикардиальной жировой ткани, был CD73+, CD 90+, CD 105+, CD34-/+ . Кроме основной популяции клеток в культуре эпикардиальной жировой ткани присутствовали 2 минорные популяции: 1) CD90+, CD34+, CD73+, CD105- (зеленый цвет на рис. 2) – предположительно эндотелиальная популяция; 2) CD90+, CD105-, CD34-, CD73- (розовый цвет) – самая малочисленная популяция клеток, полученных из эпикардиальной жировой ткани.

В культуре клеток, полученной из периваскулярной жировой ткани пациента с ИБС, так же, как и в клетках, полученных из эпикардиальной жировой ткани, наблюдалась высокая (более 90%) экспрессия мембранных белков, характерных для стволовых клеток (рис. 3). Так, клеточные маркеры CD90 и CD105 совместно экспрессировались у 90.3% клеток, похожий процент мембранных белков отмечен в отношении CD73 и CD90 (90.9%). Антигенный маркер CD34 экспрессировали только 0.9% клеток, полученных из культуры периваскулярной жировой ткани. Так же, как и в культуре эпикардиальной жировой ткани в периваскулярной жировой ткани, мы наблюдали 3 популяции клеток (рис. 3).

Клетки, полученные из эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани пациентов с приоб-

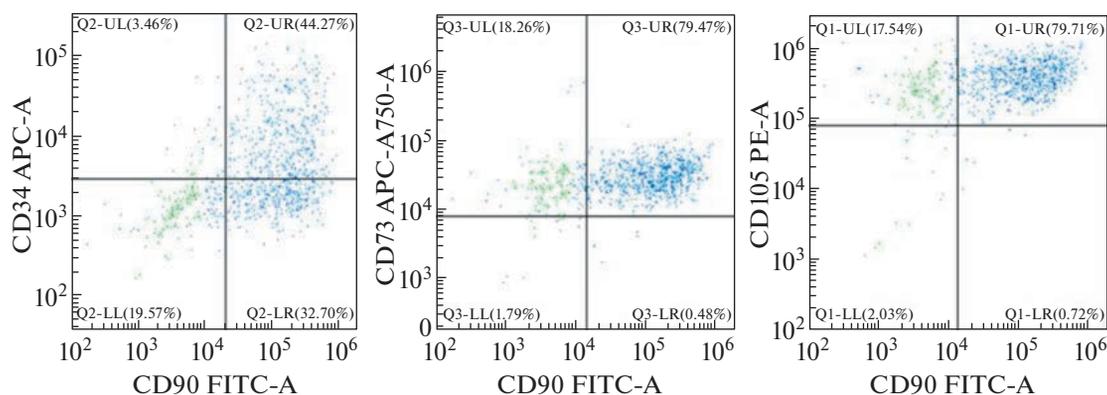


Рис. 2. Проточная цитометрия клеток, полученных из эпикардиальной жировой ткани пациента с ИБС. Синим цветом на рисунке обозначена самая большая популяция клеток по иммунофенотипу, принадлежит к МСК, зеленый и розовый цвет — две минорные популяции клеток.

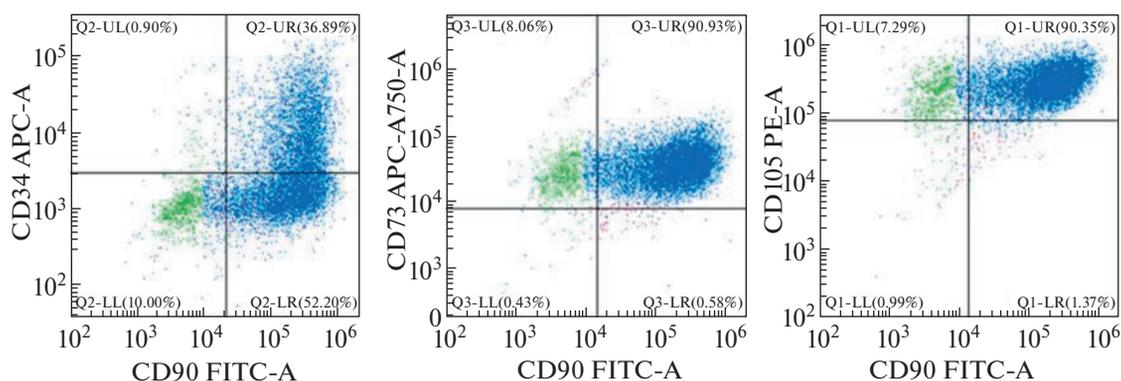


Рис. 3. Проточная цитометрия клеток, полученных из периваскулярной жировой ткани пациента с ИБС. Синим цветом на рисунке обозначена самая большая популяция клеток, которая по иммунофенотипу принадлежит к МСК, зеленый и розовый цвет — две минорные популяции клеток.

ретенным пороком сердца и ИБС имели схожий фенотип, однако были некоторые особенности. В культуре клеток эпикардиальной жировой ткани пациента с приобретенным пороком сердца уровень совместной экспрессии основных поверхностных маркеров МСК был немного ниже, чем в эпикардиальной жировой ткани пациента с ИБС. CD90 и CD105 одновременно экспрессировали около 61% клеток, а CD90 и CD73 — около 59%. Уровень поверхностного маркера CD34 был равен 32.3%, а совместный уровень CD90 и CD34 — 47.3%. При иммунофенотипировании клеток, полученных из эпикардиальной жировой ткани, также обнаружили три популяции клеток с преобладанием основной популяции с фенотипом, характерным для МСК (рис. 4).

В культуре клеток, полученных из периваскулярной жировой ткани, были обнаружены высокие уровни совместной экспрессии CD90 и CD105 — 78.4%, CD90 и CD73 — 90.5%. Экспрессия антигенного маркера CD34 обнаружена на 1.5% клеток (рис. 5).

Таким образом, на ранних сроках культивирования на клетках стромально-васкулярной фракции, выделенных из периваскулярной и эпикардиальной жировой ткани пациентов с ИБС и приобретенными пороками сердца, доминируют поверхностные маркеры, характерные для мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МСК-ЖТ локализируются в стромально-васкулярной фракции, присутствующей в сосудистой нише, и имеют специфичный для этой области профиль экспрессии маркеров клеток [6, 7]. Клетки стромально-васкулярной фракции представляют собой гетерогенную смесь эндотелиальных и гладкомышечных клеток, перипоцитов, фибробластов, тучных клеток и преадипоцитов [8]. На ранних этапах культивирования (1–2 пассажа клеток) в составе стромально-васкулярной фракции обнаруживаются клетки, несущие не только стволовые маркеры (CD44, CD73, CD90, CD105, CD166), но и

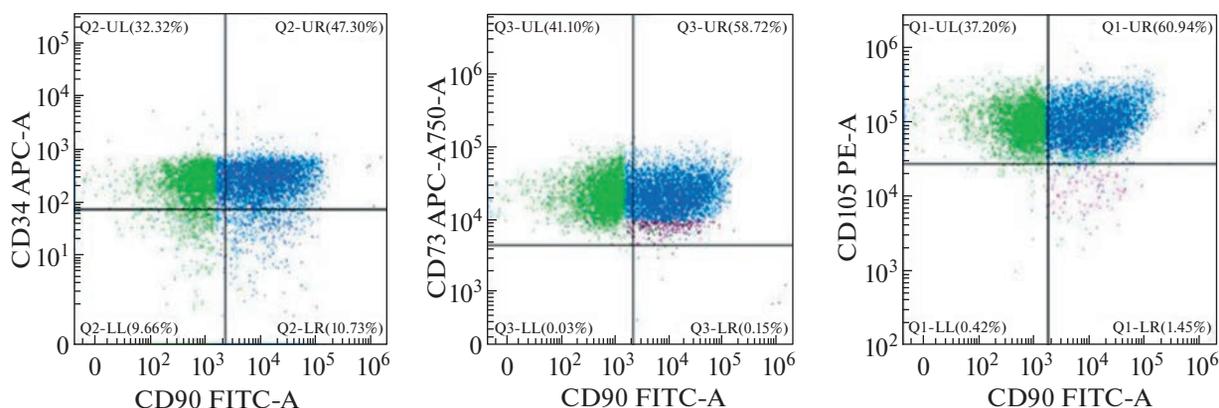


Рис. 4. Проточная цитометрия клеток, полученных из эпикардиальной жировой ткани пациента с приобретенными пороками сердца. Синим цветом на рисунке обозначена самая большая популяция клеток, которая по иммунофенотипу принадлежит к МСК, зеленый и розовый цвет — две минорные популяции клеток.

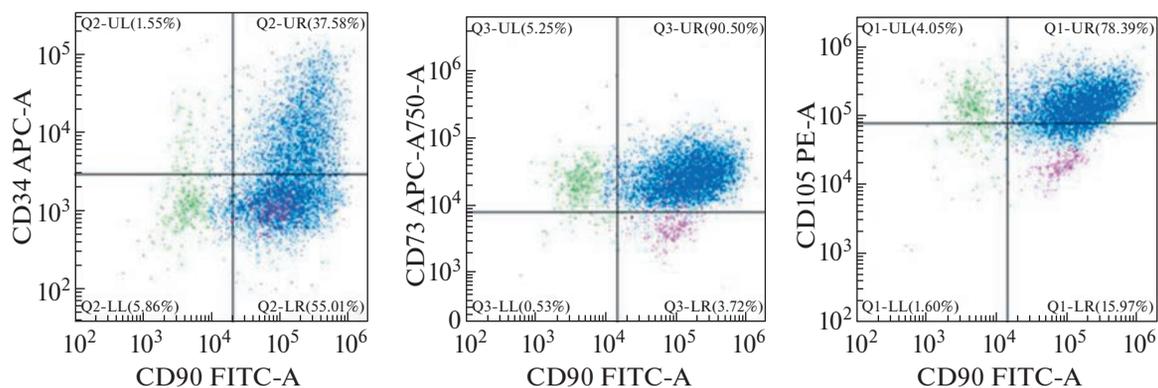


Рис. 5. Проточная цитометрия клеток, полученных из периваскулярной жировой ткани пациента с приобретенными пороками сердца. Синим цветом на рисунке обозначена самая большая популяция клеток, которая по иммунофенотипу принадлежит к МСК, зеленый и розовый цвет — две минорные популяции клеток.

маркеры гемопоэтических стволовых клеток (CD34, митохондриальный ALDH, ABCG2). По данным Mohamed-Ahmed и соавт., классические маркеры МСК (CD73, CD90, CD105) присутствуют на 0.8–54% клетках на ранних стадиях культивирования (1 пассаж) [9]. К 4–5-му пассажу количество стромальных маркеров на культивированных клетках увеличивается, достигая 98% [7, 10, 11].

К одним из стромальных маркеров относится CD90, также известный как Thy-1, он представляет собой заякоренный белок клеточной поверхности, обычно экспрессируемый различными типами клеток, в том числе, и стволовыми. В исследовании Рап и соавт. обнаружено, что степень экспрессии стволовыми клетками CD90 может отличаться в зависимости от локализации жировой ткани [12]. В работе было получено, что CD90 в большей степени экспрессируется на стволовых клетках подкожной, а не висцеральной жировой ткани. Уровень экспрессии другого поверхностного маркера — CD73 — также может зависеть от локализации ство-

ловых клеток. Так, показано, что экспрессия CD73 на МСК-ЖТ, выделенной из перикарда у экспериментальных животных (мыши), выше, чем экспрессия CD73 на стволовых клетках, полученных из подкожно-жировой ткани [13, 14]. CD105 — еще один классический маркер стволовых клеток, также имеет более высокий процент экспрессии в клетках подкожного жира по сравнению с таковым в висцеральном жире [15, 16].

Стоит отметить, что в настоящее время большое количество экспериментальных работ посвящено изучению стромально-васкулярной фракции, выделенной из висцеральных и подкожных депо, в то время как исследований, посвященных жировой ткани кардиальной области у человека, недостаточно.

В данном исследовании нами был впервые изучен иммунофенотип клеток, полученных из стромально-васкулярной фракции эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани у пациентов с ИБС и приобретенными пороками сердца. Полученные результаты показали, что культура МСК 2-го пассажа

характеризовалась повышенной экспрессией антигенов CD73, CD90, CD105. Примерно 90% клеток 2-го пассажа, полученных из эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани пациента с ИБС, экспрессировали классические маркеры МСК (CD73, CD90, CD105). В культуре клеток эпикардиальная жировая ткань у пациента с приобретенными пороками сердца наблюдался более низкий уровень совместной экспрессии основных маркеров стволовых клеток в отличие от пациента с ИБС (CD90 и CD105 около 61% клеток, а CD90 и CD73 – 58.2%). Процентное содержание изучаемых стволовых маркеров на клетках, выделенных из периваскулярной жировой ткани у пациента с пороком сердца, существенно не отличалось от уровня экспрессии этих маркеров у пациента с ИБС. Уровень экспрессии CD34 варьировал в зависимости от локализации жировой ткани и заболевания: так, у пациентов с ИБС уровень CD34 не превышал 3.5% как в эпикардиальной, так и в периваскулярной жировой ткани. При этом в эпикардиальной жировой ткани у пациента с пороками сердца обнаружен более высокий процент CD34 (32.3%). Относительно экспрессии маркера гемопоэтических стволовых клеток – CD34 на МСК-ЖТ в литературе существуют некоторые противоречия. Некоторые исследовательские группы [17, 18] выявили популяцию CD34 в стромально-васкулярной фракции. Эти данные позволили предположить наличие общего предшественника у клеток с эндотелиальным и адипоцитарным фенотипом [18]. В то же время по данным других авторов [13, 19] экспрессия CD34 была слабой, либо не обнаруживалась. Однако более поздние исследования иммунофенотипа клеток стромально-васкулярной фракции показали, что гемопоэтические CD34+ клетки попадают в жировую ткань из циркулирующей крови и при длительном культивировании клеток с увеличением количества пассажей уровень экспрессии CD34 уменьшался [8, 10].

В то же время в культуре клеток второго пассажа были обнаружены две минорные популяции клеток, которые отличались по экспрессии CD73, CD90 и CD105. Фенотип клеток первой популяции был представлен положительными CD105+, CD73+ и отсутствием экспрессии или экспрессией в малом количестве – CD90 и CD34. Содержание клеток с фенотипом CD105+, CD73+/CD90-, CD34- варьировало в зависимости от типа жировой ткани, максимальное содержание клеток этой популяции было обнаружено в эпикардиальной жировой ткани пациентов с приобретенными пороками сердца. Третья популяция клеток была самая малочисленная, и ее количество варьировало в зависимости от типа жировой ткани, из которой были получены клетки.

Таким образом, на ранних этапах культивирования клеток в составе стромально-васкулярной фракции эпикардиальной и периваскулярной жировой ткани у пациентов с сердечно-сосудистыми

заболеваниями идентифицируются клетки, несущие поверхностные маркеры, присущие стволовым клеткам жировой ткани.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены биоэтическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний” (Кемерово). Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена в рамках проекта фундаментальных исследований НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний № 0419-2022-0002 “Разработка инновационных моделей управления факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и сопутствующими заболеваниями на основе изучения фундаментальных, клинико-эпидемиологических механизмов и методов управления здравоохранением в условиях промышленного района Сибири”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (У.Е.Г. и Г.О.В.), сбор литературы и ее анализ (Д.Ю.А., Б.Е.В., Т.О.Л.), планирование эксперимента (У.Е.Г., Д.Ю.А., Б.Е.В., Г.О.В., М.В.Г.), получение биоматериала (биопатов жировой ткани) во время хирургического вмешательства (С.М.Г.), редактирование и подготовка финальной версии обзора (У.Е.Г.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
2. Robert AW, Marcon BH, Dallagiovanna B, Shigunov P (2020) Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. *Front Cell Dev Biol* 8: 561. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00561>

3. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the international So. Cytotherapy 15: 641–648.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
4. Bucan A, Dhumale P, Jørgensen MG, Dalaei F, Wiinholt A, Hansen CR, Hvidsten S, Baun C, Hejbøl EK, Schröder HD, Sørensen JA (2020) Comparison between stromal vascular fraction and adipose derived stem cells in a mouse lymphedema model. *J Plast Surg and Hand Surg* 54 (5): 302–311.
<https://doi.org/10.1080/2000656X.2020.1772799>
5. Krawczyński A, Klimczak A (2022) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci* 23 (5): 2425.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052425>
6. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Deng YH, Tsai FC, Deng WP (2018) Revisiting the Advances in Isolation, Characterization and Secretome of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Int J Mol Sci* 19 (8): 2200.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082200>
7. Silva KR, Baptista S (2019) Adipose-derived stromal/stem cells from different adipose depots in obesity development. *World J Stem Cells* 11 (3): 147–166.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i3.14>
8. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonick S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells* 24 (2): 376–385.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>
9. Mohamed-Ahmed S, Frisstad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB (2018) Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther* 9 (1): 168.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
10. Ni H, Zhao Y, Ji Y, Shen J, Xiang M, Xie Y (2019) Adipose-derived stem cells contribute to cardiovascular remodeling. *Aging* 11 (23): 11756–11769.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
11. Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM, Kota DJ (2017) Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Transl Med* 6 (4): 1096–1108.
<https://doi.org/10.1002/sctm.16-0337>
12. Pan Z, Zhou Z, Zhang H, Zhao H, Song P, Wang D, Yin J, Zhao W, Xie Z, Wang F, Li Y, Guo C, Zhu F, Zhang L, Wang Q (2019) CD90 serves as differential modulator of subcutaneous and visceral adipose-derived stem cells by regulating AKT activation that influences adipose tissue and metabolic homeostasis. *Stem Cell Res Ther* 10 (1): 355.
13. Tang Y, Pan ZY, Zou Y, He Y, Yang PY, Tang QQ, Yin FA (2017) A comparative assessment of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat as a potential cell source for knee osteoarthritis treatment. *J Cell Mol Med* 21 (9): 2153–2162.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13138>
14. Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, Qiu L, Liu X, Ding Z, Deng X (2019) CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem Cells Internat* 8717694.
<https://doi.org/10.1155/2019/8717694>
15. Lv XJ, Zhou GD, Liu Y, Liu X, Chen JN, Luo XS, Cao YL (2012) In vitro proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells isolated using anti-CD105 magnetic beads. *Int J Mol Med* 30 (4): 826–834.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1063>
16. Li Q, Qi LJ, Guo ZK, Li H, Zuo HB, Li NN (2013) CD73+ adipose-derived mesenchymal stem cells possess higher potential to differentiate into cardiomyocytes *in vitro*. *J Mol Histol* 44 (4): 411–422.
<https://doi.org/10.1007/s10735-013-9492-9>
17. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189: 54–63.
<https://doi.org/10.1002/jcp.1138>
18. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L (2004) Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656–663.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61>
19. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24 (4): 150–154.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>

IMMUNOPHENOTYPE OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM EPICARDIAL AND PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

E. G. Uchasova^{a, #}, Yu. A. Dyleva^a, E. V. Belik^a, V. G. Matveeva^a, S. M. Gusev^a,
O. L. Tarasova^b, and O. V. Gruzdeva^{a, b}

^aResearch Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

^bKemerovo State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, Kemerovo, Russia

[#]e-mail: evg.uchasova@yandex.ru

Aim: to evaluate the immunophenotype of adipose tissue stem cells isolated from epicardial and perivascular fat depots in patients with coronary heart disease and acquired heart defects. **Results:** In cell culture obtained from epicardial adipose tissue (EAT) and perivascular adipose tissue (PVAT) (2nd passage) in patients with both coronary heart disease and acquired heart defects, a high (over 90%) expression of membrane proteins characteristic of stem cells. In addition to the main population, with both in the EAT culture and in the PVAT, there were 2 minor ones: 1 – CD90-, CD105+, CD34-/+, CD73+, CD45- is presumably endothelial population, 2 – CD90+, CD105-, CD34-, CD73-, CD45- is the smallest population.

Conclusion: In the early stages of cultivation, cells of the stromal vascular fraction isolated from epicardial and perivascular adipose tissue express surface markers characteristic of adipose tissue stem cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, adipose tissue, ischemic heart disease, acquired heart disease

ДЛИТЕЛЬНАЯ СВЕТОВАЯ ДЕПРИВАЦИЯ ВЛИЯЕТ НА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ У КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2023 г. Е. П. Антонова^{1,*}, А. В. Морозов¹, В. А. Илюха¹,
Е. А. Хижкин^{1,2}, С. Н. Калинина^{1,2}

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

²Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

*e-mail: antonova88ep@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 22.04.2023 г.

Проведено исследование влияния световой депривации на возрастные изменения массы тела, кормов и водопотребления, а также активности пищеварительных ферментов в тканях поджелудочной железы у самцов крыс. Животные были разделены на три группы: первая находилась в стандартном регулярно чередующемся освещении (12 ч свет/12 ч темнота, контроль, LD), вторая содержалась в условиях длительной световой депривации с момента рождения (LD/DD), а третья – с периода эмбрионального развития (DD/DD). Длительное пребывание крыс в условиях световой депривации приводило к нарушению возрастной динамики изученных показателей, при этом обнаруженные изменения в ответ на специфический световой режим различались в зависимости от того, на каком этапе онтогенеза началось его воздействие. Так, масса тела (возраст 3 и 18 мес) и потребление корма и воды (12 мес), активности амилазы и липазы (18 месяцев) были ниже, а активности протеаз после окончания стадии стабильного роста (12, 18 и 24 мес) были выше у крыс в LD/DD режиме, чем у LD. Значительные изменения изученных показателей наблюдались в условиях DD/DD в возрасте 12 и 18 мес – масса тела была максимальной, а потребление корма и воды минимальны по сравнению с LD и LD/DD. В дополнение у крыс в DD/DD отмечены максимальная активность амилазы (1 и 6 месяцев) и более высокие значения общей протеолитической активности в период стабильного роста (6 и 12 мес) по сравнению с контролем. Таким образом, в результате настоящего исследования показано, что световая депривация нарушает онтогенетическую программу развития пищеварительной системы млекопитающих.

Ключевые слова: онтогенез, масса тела, общая протеолитическая активность, амилаза, липаза, световая депривация

DOI: 10.31857/S0044452923030038, EDN: YGXTXU

ВВЕДЕНИЕ

В основе циклических проявлений жизнедеятельности находится эндогенная программа циркадианной ритмичности, нарушение которой может приводить к системной десинхронизации и к пагубным для здоровья последствиям. Для большинства живых существ временным синхронизатором служит внешний фактор – световой режим. У позвоночных животных информация о свете поступает в центральные циркадные биологические часы (супрахиазматические ядра передней части гипоталамуса, СХЯ), затем распространяется по всему организму посредством автономной нервной системы и гормона пинеальной железы – мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамина) [1]. Показано, что условия освещенности оказывают значительное влияние на морфологию пинеальной железы [2], которая, в свою очередь, участвует в

регуляции функций физиологических систем [3, 4]. Так, в условиях стандартного светового режима LD (12 ч свет/12 ч темнота) колебания синтеза мелатонина достаточно стабильны в течение суток [5] и сохраняются, но становятся менее выраженными или нерегулярными у крыс, перемещенных из LD в режим постоянной темноты (DD) [3, 5]. Хроническое воздействие как постоянной темноты DD, так и постоянного света (LL) приводит к нарушению циркадных ритмов [1, 3, 5], снижению массы пинеальной железы [6], изменению морфологии этого органа [2], а также к тревожно-депрессивному поведению [1, 3] и к световому десинхронозу [1, 7].

На сегодняшний день существует очень ограниченное число работ, целью которых являлось изучение влияния светового десинхроноза в период беременности на циркадные ритмы физиологиче-

ских систем у потомства [1, 8, 9]. В отличие от циркадной системы взрослого организма, скоординированной с циклами свет/темнота, циркадная система плода и новорожденного в значительной степени зависит от эндогенных материнских ритмов (в частности, ритма мелатонина) [8, 9]. При этом, если становление и синхронизация циркадной системы эмбриона происходят под влиянием материнских циркадианных ритмов через плацентарный барьер, то в раннем постнатальном периоде — за счет мелатонина, содержащегося в материнском молоке, и интенсивного социального взаимодействия с матерью [1, 8, 9]. Такие сигналы от матери напрямую управляют ритмами в раннем постнатальном онтогенезе до тех пор, пока у новорожденного не сформируются собственный генератор эндогенных ритмов в СХЯ и суточный ритм синтеза мелатонина пинеальной железы [4]. В организме новорожденных животных мелатонин участвует в регуляции большого количества биохимических процессов и физиологических функций (пролиферация и дифференцировка клеток, половое созревание, поведение, ритм сна и бодрствования, иммунный ответ) [9, 10]. Поэтому нарушение циркадного ритма секреции мелатонина в период беременности и в раннем постнатальном онтогенезе может привести к негативным последствиям и проявиться на более поздних сроках развития.

Пинеальная железа претерпевает в процессе онтогенеза перестройки инволютивного характера [11]. Уменьшение продукции мелатонина при старении индуцирует резистентность к инсулину, нарушение сна, метаболизма и приводит к ожирению [12]. Поэтому среди проблем физиологии очевидный интерес представляет и возрастной аспект исследования модификации циркадной ритмики физиологических систем у млекопитающих, особенно при системной десинхронизации. Анализ современных источников литературы показывает, что воздействие как света ночью, так и длительных периодов темноты, оказывает значительное влияние на эндогенные циркадные ритмы гормонов, участвующих в метаболизме липидов и углеводов у млекопитающих [1, 7]. Однако несмотря на активные исследования в этой области, недостаточно изучена роль пинеальной железы и продуцируемого ею мелатонина в регуляции пищеварительной функции, особенно в возрастном аспекте.

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение влияния длительной (пожизненной) световой депривации, воздействие которой начиналось с периода эмбрионального развития (DD/DD) или с момента рождения (LD/DD), на возрастные изменения массы тела, кормо- и водопотребления, а также активности пищеварительных ферментов в тканях поджелудочной железы у самцов крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”. Опыты проводили на крысах Вистар (самцы и самки) собственной разводки, первоначально полученных из питомника лабораторных животных “Пушино” (научно-производственное подразделение Филиала Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Московская область). Всех животных содержали в стандартных помещениях вивария Петрозаводского государственного университета площадью 25 м² в индивидуальных клетках размером 42 × 26 × 18.5 см при температуре 23 ± 1° и влажности в диапазоне от 45 до 55%, в качестве подстилочного материала использовали древесную стружку. Крысы получали стандартный готовый лабораторный корм (РФ, ЗАО “Тосненский комбикормовый завод”, ГОСТ Р50258-92) и фильтрованную водопроводную воду без ограничений. Для разведения 4-месячных самцов и самок крыс содержали в условиях стандартного фиксированного режима освещения (12 ч света 750 лк/12 ч темноты; LD) или при постоянной темноте (0–0.5 лк, DD). После рождения потомства самок первой группы вместе с приплодом в случайном порядке разделили на две подгруппы — либо оставили при стандартном регулярно чередующемся освещении (LD; контрольные животные), либо перенесли в постоянную темноту (LD/DD). Самок и потомство, рожденное в группе DD, оставили в условиях постоянной темноты (DD/DD). Последующие исследования проводили на потомстве. Все манипуляции с животными проводились при красном свете ламп (не более 0.5 лк). В ходе эксперимента проводилось определение таких физиологических показателей, как масса тела (ежемесячно), а также с использованием метаболических клеток для лабораторных животных кормо- и водопотребление (в 6, 12 и 18 мес).

В возрасте 1, 2, 3, 6-ти, 12, 18 и 24 мес по 4 самца из каждой группы декапитировали и отбирали образцы тканей поджелудочной железы для последующего анализа. Для определения активности пищеварительных ферментов образцы тканей гомогенизировали в 2.0 мл ледяного буферного раствора (рН 6.9, состоящего из 20 мМ Na₂HPO₄ и 6.7 мМ NaCl). Гомогенаты поджелудочной железы центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин, при 4°С. Общую протеолитическую активность определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-2000, Россия) с использованием субстрата гемоглобина — по приросту тирозина при 280 нм. Активность амилазы определяли с помощью спектрофотометра Thermo Spectronic Genesys 20 (Thermo

Таблица 1. Медианы значений потребления корма и воды самцами крыс линии Wistar в разных экспериментальных группах (в скобках указаны нижний и верхний квартили)

Возраст, месяц	Потребление корма в сутки, г			Потребление воды в сутки, мл		
	LD	LD/DD	DD/DD	LD	LD/DD	DD/DD
6	46 (43; 50)	43.5 (34.5; 50)	35.5* (29.5; 38)	52.5 (47.5; 62.5)	62.5 (53; 68.5)	45 (33; 50)
12	45.5 (38; 51.5)	35◇ (26; 36)	28* (26; 32)	49 (41; 69.5)	33◇ (30; 40)	31* (29; 36)
18	43.5 (40; 45)	40 (30; 49)	28*◆ (25; 34)	50 (41; 58)	44 (37; 50)	32*◆ (23; 36)

* Здесь и в табл. 2: LD, LD/DD и DD/DD – группы животных; ◇ – различия достоверны между животными LD и LD/DD ($p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом по Манна–Уитни, поправка FDR), * – различия достоверны между животными LD и DD/DD ($p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом по Манна–Уитни, поправка FDR), ◆ – различия достоверны между животными LD/DD и DD/DD ($p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом по Манна–Уитни, поправка FDR); в каждой группе $n = 4$.

Fisher Waltham, США), используя в качестве субстрата крахмал (концентрацию продукта комплекс крахмала с йодом измеряли при 600 нм). Липаза гидролизует трибутират глицерина до свободной жирной кислоты и глицерина. Количество продукта активности липазы (глицерина) определяли спектрофотометрически при 530 нм (спектрофотометр Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Fisher Waltham, США). Активность ферментов выражали в мкмоль продуктов гидролиза (для амилазы – в мг крахмала), образующихся за 1 мин в расчете на 1 г ткани [подробное описание методик см. 13].

Полученные данные обработаны общепринятыми статистическими методами, используя пакеты программ MS Excel и Prism 7, и были представлены в виде медианы (Me) и процентилей (25%, 75%) (распределение, отличное от нормального). Ввиду небольшого количества образцов использовали критерий Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis H-test, непараметрический дисперсионный анализ) с post-hoc тестом по Манна–Уитни, использовали поправку на множественность сравнений FDR (false discovery rate). Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$. Взаимосвязь между исследуемыми показателями у крыс ($n = 24$) в разных режимах освещения анализировали с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Анализ статистической мощности не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние длительной световой депривации, воздействие которой начиналось с момента рождения (LD/DD), на исследуемые показатели

В результате проведенного исследования обнаружено, что крысы в режиме LD/DD в возрасте 12 мес

потребляли меньше корма ($H = 13.768, p < 0.05$) и воды ($H = 13.789, p < 0.05$) по сравнению с LD (табл. 1), и масса их тела в возрасте 3 и 18 мес была минимальна среди всех исследуемых групп (значения $H = 8.375$ и 8.909 соответственно, $p < 0.05$) (рис. 1a). Помимо этого, содержание крыс в LD/DD режиме привело к изменению активности пищеварительных ферментов в поджелудочной железе в месячном возрасте (липаза, $H = 11.61, p < 0.05$) (рис. 1d) и с 12-месячного возраста (протеазы, амилаза и липаза) по сравнению с контролем. Так, в 6, 12, 18 и 24 мес активность протеаз была выше у животных LD/DD (рис. 1b), чем у LD ($p < 0.05$). При этом активности амилазы (рис. 1c) и липазы (рис. 1d) в 18 мес были ниже у LD/DD животных по сравнению с контрольными животными ($p < 0.05$).

Влияние длительной световой депривации, воздействие которой начиналось с периода эмбрионального развития (DD/DD), на изучаемые параметры

Содержание крыс в DD/DD привело к минимальным значениям потребления корма (6, 12 и 18 мес, $p < 0.05$) и воды (12 и 18 месяцев, $p < 0.05$) (табл. 1), но при этом масса тела животных увеличивалась с 3 мес – животные в этой группе имели большие размеры тела по сравнению с LD и LD/DD в 3 ($H = 8.375, p < 0.05$), 12 ($H = 7.449, p < 0.05$) и 18 мес ($H = 8.909, p < 0.05$) (рис. 1a). Обнаружено, что в возрасте 6 и 12 мес общая протеолитическая активность у крыс в режиме DD/DD была выше в среднем на 20%, чем у LD-животных ($p < 0.05$), однако в 18 и 24 мес активность протеаз снизилась до контрольных значений (рис. 1b). Активность амилазы к 6 месяцам в DD/DD увеличилась до максимальных значений ($H = 8.721, p < 0.05$),

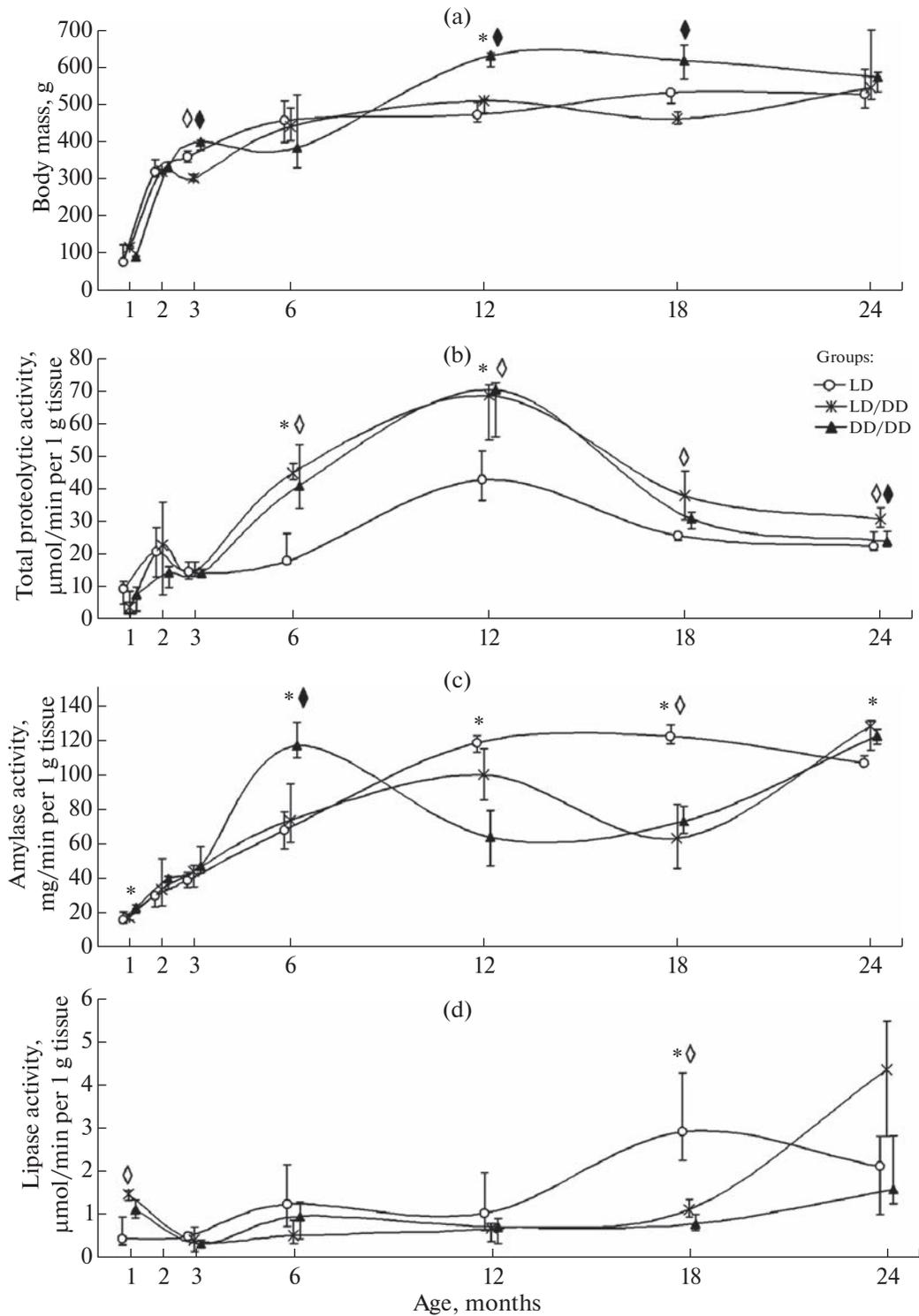


Рис. 1. Возрастная динамика изученных показателей у самцов крыс при различных световых режимах. (a) – Изменение массы тела, (b) – общей протеолитической активности, (c) – активности амилазы, (d) – активности липазы в поджелудочной железе. LD, LD/DD и DD/DD – группы животных; \diamond – различия достоверны между животными LD и LD/DD ($p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом по Манна–Уитни, поправка FDR), * – различия достоверны между животными LD и DD/DD ($p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом по Манна–Уитни, поправка FDR), \blacklozenge – различия достоверны между животными LD/DD и DD/DD ($p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом по Манна–Уитни, поправка FDR); в каждой группе $n = 4$.

но уже к 12 мес она снизилась на 40% и была ниже, чем у животных в LD ($H = 9.707, p < 0.05$) (рис. 1с). В 18 мес как активность амилазы (рис. 1с), так и активность липазы (рис. 1d) были ниже у DD/DD по сравнению с контрольными значениями ($p < 0.05$). Отмечены следующие различия между группами LD/DD и DD/DD: активность протеаз была выше у крыс в группе LD/DD, чем в DD/DD (возраст 24 мес, $p < 0.05$) (рис. 1b); активность амилазы в 6-месячном возрасте была ниже ($p < 0.05$) у LD/DD-животных по сравнению с DD/DD ($p < 0.05$) (рис. 1с).

Корреляции

В стандартном регулярно чередующемся освещении выявлены положительные корреляции между активностями ферментов (протеазы, амилаза и липаза) и массой тела животных ($p < 0.05$) (табл. 2). Световая депривация нарушала эти корреляционные связи, так, в режиме LD/DD не обнаружено корреляции между активностью липазы и массой тела, а в DD/DD – не было корреляций между активностью амилазы и массой тела, а также между активностью липазы и массой тела (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На становление пищеварительной функции могут оказывать влияние различные факторы (голод, изменение температуры и др.) [14–16]. К таковым также стоит отнести нестандартные световые режимы, например, постоянное освещение и постоянная темнота [1, 7]. В настоящем эксперименте длительное содержание крыс в условиях световой депривации приводило к нарушению возрастной динамики массы тела животных, кормо- и водопотребления, а также активности пищеварительных ферментов в поджелудочной железе. Однако эти изменения в ответ на специфический световой режим различались в зависимости от того, на каком этапе онтогенеза начиналось его воздействие. Так, содержание крыс в LD/DD режиме привело к снижению массы тела в возрасте 3 и 18 мес и потребления корма и воды в 12 мес по сравнению с LD. При этом у животных в режиме DD/DD в возрасте 12 и 18 мес масса тела была максимальна, а потребление корма и воды было минимально среди исследованных групп (рис. 1а, табл. 1). Результаты нашего исследования частично согласуются с ранее полученными данными – в условиях DD (животные содержались в режиме с 25-дневного возраста) у самцов крыс наблюдались увеличение фазы прогрессивного роста и сниженное количество потребляемого корма по сравнению с контролем [7]. Необходимо отметить, что точно так же,

Таблица 2. Корреляции (r) и уровни значимости (p) между исследуемыми показателями у крыс в разных условиях освещения

Параметры корреляции		Коэффициент Спирмена	
		r	p
Общая протеолитическая активность – масса тела	LD	0.50	0.0332*
	LD/DD	0.66	0.0051*
	DD/DD	0.63	0.0095*
Активность амилазы – масса тела	LD	0.88	0.0002*
	LD/DD	0.87	0.0002*
	DD/DD	0.36	0.1398
Активность липазы – масса тела	LD	0.57	0.0152*
	LD/DD	0.14	0.5563
	DD/DD	0.13	0.6063

* Корреляции достоверны при $p < 0.05$.

как и в нашем эксперименте, в возрасте 3 мес LD/DD-крысы имели минимальную массу тела среди всех исследуемых групп [7].

В результате проведенного нами исследования у крыс во всех световых режимах обнаружены схожие возрастные изменения активности протеаз в поджелудочной железе: до 12 мес протеолитическая активность увеличивалась, что соответствует окончанию фазы стабильного роста и связано с необходимостью в пластическом материале, а затем наблюдалось постепенное ее снижение (рис. 1b). В условиях световой депривации выявлена более высокая активность протеаз (LD/DD – 6, 12, 18, 24 и DD/DD – 6 и 12 мес) по сравнению с контролем. Онтогенетические изменения активности амилазы у крыс в условиях длительной световой депривации с момента рождения (LD/DD) были сходны с группой LD. Достоверные различия между указанными группами в активности фермента отмечались только в возрасте 18 мес, в LD/DD она была ниже (рис. 1с). Значительные нарушения возрастной динамики изменения амилазы выявлены в условиях DD/DD – у 6- и 24-месячных крыс этой группы активность фермента была выше, а у 12- и 18-месячных ниже, чем у контрольных животных тех же возрастов (рис. 1с). Изменение большинства показателей указывает на значительные метаболические перестройки у крыс, находившихся в темноте с момента внутриутробного развития (DD/DD), что подтверждают результаты корреляционного анализа – в DD/DD режиме

часть корреляционных связей отсутствовала (табл. 2). Увеличение массы тела при уменьшении потребления пищи может являться результатом нарушения обмена углеводов. В исследовании Kang и соавт. [17] было обнаружено, что при содержании крыс в режиме DD (120 дней) наблюдаются снижение уровня инсулина и увеличение содержания глюкозы в крови по сравнению с LD. В условиях гипергликемии печень начинает активно синтезировать жирные кислоты и триглицериды, параллельно активируется липогенез в жировой ткани, что приводит к увеличению массы тела.

Обмен липидов, как и многие процессы, протекающие в организме, координируется циркадными часами, синхронизирующими функцию адипоцитов, которые, в свою очередь, способствуют липолизу в течение биологической ночи и липогенезу в течение биологического дня, таким образом, поддерживается баланс между окислением липидов и углеводов и накоплением глюкозы [18]. Нарушение работы этих часов может приводить к изменениям экспрессии ферментов, участвующих в метаболизме липидов, а также оказывать негативное воздействие на гомеостаз жирных кислот и регуляцию абсорбции липидов в течение суток [19, 20]. В нашем эксперименте возрастные изменения липолитической активности в поджелудочной железе у животных во всех экспериментальных группах носили схожий характер. Тем не менее у крыс, содержавшихся в темноте независимо от момента начала ее воздействия, активность липазы в 18 мес была достоверно ниже, чем у животных того же возраста в режиме LD (рис. 1d). Необходимо отметить, что у взрослых грызунов длительная световая депривация оказывает влияние только на период и амплитуду при сохранении ритмичности колебаний экспрессии часовых генов и генов метаболизма липидов [1, 20].

Согласно данным литературы, эффекты влияния DD на незрелую циркадную систему грызунов обширны [1]. Большинство исследований по данной тематике посвящено изучению развития структур головного мозга и физиологии поведения [21–24]. Доказано, что воздействие DD как во время эмбрионального развития, так и с момента рождения приводит к снижению нейрогенеза и числа нейронов, ответственных за связь между осцилляторами СХЯ, с последующей десинхронизацией ритмов синтеза ряда гормонов (нейропептиды и кортикостерон), развитием депрессивно-подобного поведения и снижением пространственной памяти [1, 3, 21, 22]. В результате оценки психоэмоционального состояния крыс из нашего эксперимента [25] выявлено, что световая депривация (группы LD/DD и DD/DD) вызывала увеличение

уровня тревожности по сравнению с контрольными животными, при этом крысы, матери которых содержались в условиях темноты в период беременности (группа DD/DD), чувствовали себя комфортнее, и уровень их тревожности был ниже, чем у крыс в LD/DD условиях освещения. Об этом свидетельствуют более низкие значения количества реакций фризинга и актов дефекаций у крыс в DD/DD группе по сравнению с LD/DD. Вероятно, отмеченные эффекты DD/DD на поведение крыс связаны с более длительным воздействием темноты и развитием компенсаторных реакций [25]. Опираясь на эти данные, можно предположить, что крысы в LD/DD условиях были более стрессочувствительны. Ранее показано, что воздействие DD на мышью (C57BL/6J) на ранних этапах постнатального онтогенеза (10 дней) приводило к повышению экспрессии глюкокортикоидного рецептора в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, что, в свою очередь, вызывало рост уровня активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [26], которая является ключевым регулятором стрессовой реакции. Авторы предполагают, что световые условия, которым мышья подвергается в течение первых трех постнатальных недель (критических), оказывают долгосрочное влияние на циркадные ритмы гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [24, 26], так как у мышей, выращенных в DD режиме (до 21 дня, потом переместили в режим LD), наблюдались повышенная концентрация кортикостерона в плазме и высокий уровень тревожности на более поздних этапах онтогенеза. Схожие данные были получены на взрослых крысах — содержание животных в условиях DD приводило к росту уровня кортикостерона в крови [3]. Длительное воздействие глюкокортикоидов вызывает различные метаболические нарушения обмена веществ [27]. Так, например, острые психогенные или системные стрессоры приводят к быстрому снижению потребления пищи и последующему истощению запасов питательных веществ у крыс [28, 29]. При этом животные теряют массу тела за счет использования питательных веществ не из жировой ткани, а из других органов [29]. Метаболически у этих крыс нарушена регуляция обмена углеводов, что является ранним признаком резистентности к инсулину [27]. Возможно, именно поэтому в нашем исследовании мы обнаружили различия между группами LD/DD и DD/DD по массе тела и потреблению корма (рис. 1, табл. 1).

Таким образом, содержание крыс в условиях световой депривации как в период эмбрионального развития, так и с момента рождения приводило к изменению изученных показателей. У крыс в

LD/DD режиме отмечены более низкие значения массы тела (возраст 3, 18 мес), потребления корма и воды (12 мес), активности амилазы и липазы (18 мес) и более высокая активность протеаз после окончания стадии стабильного роста (12, 18 и 24 мес) по сравнению с контрольными животными. В DD/DD условиях у животных выявлены минимальные значения потребления корма и воды и увеличенная масса тела в возрасте 12 и 18 мес, а также максимальная активность амилазы (1 и 6 мес) и более высокая общая протеолитическая активность в период стабильного роста (6 и 12 мес) по сравнению с LD. Полученные результаты свидетельствуют о значительных метаболических перестройках у животных в условиях световой депривации и дополняют имеющиеся сведения о том, что нарушение циркадного ритма секреции мелатонина в период беременности и в раннем постнатальном онтогенезе может привести к негативным последствиям и проявиться на более поздних сроках развития [9, 10].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводились в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н). Все процедуры на животных были одобрены независимым Комитетом по биоэтике Института биологии Карельского научного центра РАН (протокол № 10 от 03 октября 2016 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра РАН (FMEN-2022-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.А.Х., В.А.И.), сбор данных (А.В.М., Е.А.Х., Е.П.А., С.Н.К.), обработка данных (А.В.М., Е.П.А., Е.А.Х.), написание и редактирование манускрипта (Е.П.А., А.В.М., В.А.И., Е.А.Х., С.Н.К.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН за помощь в проведении эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *González MMC* (2018) Dim Light at Night and Constant Darkness: Two Frequently Used Lighting Conditions That Jeopardize the Health and Well-being of Laboratory Rodents. *Front Neurol* 9: 609. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00609>
2. *Sergina S, Ilyukha V, Uzenbaeva L, Khizhkin E, Antonova E* (2016) Morphologic changes in the pineal gland of rats exposed to continuous darkness. *Biol Rhythm Res* 47 (5): 691–701. <https://doi.org/10.1080/09291016.2016.1183842>
3. *Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Escobar C* (2013) Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res* 252: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.028>
4. *Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA* (2014) Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update* 20: 293–307. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt054>
5. *Borjigin J, Zhang LS, Calinescu AA* (2012) Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol* 349 (1): 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.009>
6. *Wurtman RJ, Axelrod J, Fischer JE* (1964) Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Effect of Light Mediated by the Sympathetic Nervous System. *Science* 143 (3612): 1328–1329. <https://doi.org/10.1126/science.143.3612.1328>
7. *Анисимов ВН, Виноградова ИА, Букалев АВ, Попович ИГ, Забежинский МА, Панченко АВ, Тындык МЛ, Юрова МН* (2014) Световой десинхроноз и риск злокачественных новообразований у лабораторных животных: состояние проблем. *Вопр онкол* 60 (2): 15–27. [Anisimov VN, Vinogradova IA, Bukalev AV, Popovich IG, Zabezhinskii MA, Panchenko AV, Tyndyk ML, Iurova MN (2014) Light-induced disruption of the circadian clock and risk of malignant tumors in laboratory animals: state of the problem. *Vopr Onkol* 60 (2): 15–27. (In Russ)].
8. *Astiz M, Oster H* (2021) Feto-Maternal Crosstalk in the Development of the Circadian Clock System. *Front Neurosci* 14: 631687. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.631687>
9. *Mendez N, Halabi D, Salazar-Petres ER, Vergara K, Corvalan F, Richter HG, Bastidas C, Bascur P, Ehrenfeld P, Seron-Ferre M, Torres-Farfan C* (2022) Maternal melatonin treatment rescues endocrine, inflammatory, and transcriptional deregulation in the adult rat female offspring from gestational chronodisruption. *Front Neurosci* 16: 1039977. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1039977>

10. *Torres-Farfan C, Mendez N, Ehrenfeld P, Seron-Ferre M* (2020) In utero circadian changes; facing light pollution. *Curr Opin Physiol* 13: 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.11.005>
11. *Tan DX, Xu B, Zhou X, Reiter RJ* (2018) Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland. *Molecules* 23 (2): 301. <https://doi.org/10.3390/molecules23020301>
12. *Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ* (2014) Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res* 56 (4): 371–381. <https://doi.org/10.1111/jpi.12137>
13. *Antonova EP, Belkin VV, Ilyukha VA, Khizhkin EA, Kalinina SN* (2022) Seasonal Changes in Body Mass and Activity of Digestive Enzymes in *Eptesicus nilssonii* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) during hibernation. *J Evol Biochem Phys* 58: 1055–1064. <https://doi.org/10.1134/S002209302204010X>
14. *Никитина АА, Филаретова ЛП, Егорова ВВ, Тимофеева НМ* (1994) Активность пищеварительных ферментов в пищеварительных и непищеварительных органах при стрессорных воздействиях. *Физиол журнал им ИМ Сеченова* 5: 67–74. [*Nikitina AA, Filaretova LP, Egorova VV, Timofeeva NM* (1994) Activity of digestive enzymes in the digestive and non-digestive organs under stress effects. *Russ J Physiol* 5: 67–74. (In Russ)].
15. *Toyoda A, Iio W, Matsukawa N, Tsukahara T* (2015) Influence of Chronic Social Defeat Stress on Digestive System Functioning in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 61 (3): 280–284. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.280>
16. *Громова ЛВ, Савочкина ЕВ, Алексеева АС, Дмитриева ЮВ, Груздков АА* (2020) Мембранный гидролиз углеводов и всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс при хроническом иммобилизационном стрессе. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106 (11): 1421–1435. [*Gromova LV, Savochkina EV, Aleksseva AS, Dmitrieva YV, Gruzdkov AA* (2020) Membrane hydrolysis of carbohydrates and glucose absorption in the rat small intestine under chronic immobilization stress. *Russ J Physiol* 106 (11): 1421–1435. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813920100040>
17. *Kang XZ, Jia LN, Zhang X, Li YM, Chen Y, Shen XY, Wu YC* (2016) Long-Term Continuous Light Exposure Affects Body Weight and Blood Glucose Associated with Inflammation in Female Rats. *J Biosci Med* 4: 11–24. <https://doi.org/10.4236/jbm.2016.49002>
18. *Morris CJ, Yang JN, Garcia JI, Myers S, Bozzi I, Wang W, Buxton OM, Shea SA, Scheer FA* (2015) Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (17): E2225–2234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418955112>
19. *Hussain MM, Pan X* (2015) Circadian regulators of intestinal lipid absorption. *J Lipid Res* 56 (4): 761–770. <https://doi.org/10.1194/jlr.R051573>
20. *Li H, Zhang S, Zhang W, Chen S, Rabearivony A, Shi Y, Liu J, Corton CJ, Liu C* (2020) Endogenous circadian time genes expressions in the liver of mice under constant darkness. *BMC Genomics* 21 (1): 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6639-4>
21. *Jameie SB, Mousavi M, Farhadi M, Mehraein F, Ababzadeh Soleimani M, Kerdari M, Jalilpouraghdam M* (2016) Effects of total light deprivation on hippocampal neurogenesis and memory of adult rats: a sexual dimorphic study. *Thrita* 5: e36420. <https://doi.org/10.5812/thrita.36420>
22. *Cambras T, Lopez L, Arias JL, Diez-Noguera A* (2005) Quantitative changes in neuronal and glial cells in the suprachiasmatic nucleus as a function of the lighting conditions during weaning. *Brain Res Dev Brain Res* 157: 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.02.014>
23. *Bedont JL, Blackshaw S* (2015) Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Front Syst Neurosci* 9: 74. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00074>
24. *Coleman G, Gigg J, Canal MM* (2016) Postnatal light alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and induces a depressive-like phenotype in adult mice. *Eur J Neurosci* 44 (10): 2807–2817. <https://doi.org/10.1111/ejn.13388>
25. *Хижкин ЕА, Гулявина АВ, Илюха ВА, Виноградова ИА, Морозов АВ, Брулер ЕС* (2018) Возрастные изменения поведения и тревожно-фобических реакций крыс при воздействии световой депривации и лузиндола. *Труды Карельск научн центра РАН*. 12: 110–124. [*Hizhkin EA, Gulyavina AV, Ilyukha VA, Vinogradova IA, Morozov AV, Bruler ES* (2018) Age-related changes in the behavior and phobic anxiety reactions in rats under exposure to light deprivation and luzindole. *Transact. KarRC RAS* 12: 110–124. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17076/eb932>
26. *Coleman G, Canal MM* (2017) Postnatal light effects on pup stress axis development are independent of maternal behavior. *Front Neurosci* 11: 46. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00046>
27. *Patterson ZR, Abizaid A* (2013) Stress induced obesity: lessons from rodent models of stress. *Front Neurosci* 7: 130. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00130>
28. *Black PH* (2006) The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. *Med Hypotheses* 67: 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.04.008>
29. *Depke M, Fusch G, Domanska G, Geffers R, Volker U, Schuett C, Kiank C* (2008) Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology* 149: 2714–2723. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0038>

LONG-TERM LIGHT DEPRIVATION AFFECTS DIGESTIVE FUNCTION IN RATS DURING ONTOGENY

E. P. Antonova^{a,#}, A. V. Morozov^a, V. A. Plyukha^a,
E. A. Khizhkin^{a,b}, and S. N. Kalinina^{a,b}

^a*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia*

^b*Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia*

[#]*e-mail: antonova88ep@mail.ru*

The effects of light deprivation on age-related changes in body weight, food and water intake, as well as the activity of digestive enzymes in pancreatic tissues of male rats was studied. Animals were divided into three groups: the first was in standard light conditions (12 h light/12 h dark, control, LD), the second was kept under conditions of long-term light deprivation from the moment of birth (LD/DD), and the third – from the prenatal period (DD/DD). Prolonged keeping of rats under conditions of light deprivation led to disruption of the age-associated dynamics of the studied parameters, at the same time, the detected changes in response to a specific light condition differed depending on the stage of ontogenesis at which its exposure began. Thus, body mass (age 3 and 18 months) and food and water intake (12 months), amylase and lipase activities (18 months) were lower, and protease activities after the end of the stable growth stage (12, 18 and 24 months) were higher in LD/DD-rats than in LD-rats. Significant changes in the studied parameters were observed under DD/DD conditions in 12-month-old and 18-month-old rats – body mass was the largest, and food and water intake were the lowest compared to LD and LD/DD. In addition, the maximum amylase activity (1 and 6 months) among the studied groups and the higher values of total proteolytic activity during the period of stable growth (6 and 12 months) were found in DD/DD-rats compared to controls. Thus, our results indicate that light deprivation disrupts the ontogenetic development program of the digestive system of mammals.

Keywords: ontogenesis, body mass, total proteolytic activity, amylase, lipase, light deprivation

СОДЕРЖАНИЕ РЕТИНОЛА, α -ТОКОФЕРОЛА И ГЛУТАТИОНА В ОРГАНАХ КАБАНА (*SUS SCROFA* L.), ОБИТАЮЩЕГО НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ

© 2023 г. И. А. Зайцева^{1,2,*}, И. В. Байшникова¹, Д. В. Панченко¹, С. Н. Калинина^{1,2},
Т. Н. Ильина¹, Е. П. Антонова¹

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

²Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

*e-mail: ira.irmita@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 25.04.2023 г.

Фенотипическая пластичность и устойчивость к климатическим условиям позволили кабану (*Sus scrofa* L.) расширить свой исторический ареал, отодвинув его северную границу. В процессах адаптации животных к обитанию на периферии ареала в условиях севера большое значение имеет обеспеченность витаминами А и Е, которые являются природными антиоксидантами, а также выполняют в организме ряд других биологических функций и необходимы для роста, размножения и поддержания иммунитета. Цель данного исследования состояла в изучении содержания ретинола, α -токоферола, и низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона (GSH) в печени, почках, сердце, скелетной мышце, легких и селезенке кабанов ($n = 65$) в возрасте от 0.5 года до 8 лет, обитающих на северо-западе России. Полученные результаты указывают на то, что исследованные животные практически не отличались по обеспеченности ретинолом от кабанов, обитающих в центре и на юге Европы, но характеризовались более низким уровнем α -токоферола в изученных органах, что связано, вероятно, с ограниченностью кормовых ресурсов и суровыми климатическими условиями в холодный период года на севере. Уровни витаминов и GSH в большинстве органов и тканей были сопоставимы у секолетков и взрослых животных. С возрастом наблюдалось накопление ретинола и α -токоферола в печени и почках, а также α -токоферола в сердце кабанов, что характерно и для других видов млекопитающих. Повышение уровня GSH было зафиксировано в легких у животных в возрасте старше 5 лет. Выявленный витаминный статус, который сформировался у кабана в условиях северо-запада России, и особенности возрастной динамики исследуемых показателей могут являться одним из свидетельств успешной адаптации этого вида к обитанию на северной периферии ареала, что подтверждается ростом его численности.

Ключевые слова: кабан, ретинол, α -токоферол, глутатион, витаминный статус, периферия ареала

DOI: 10.31857/S0044452923030105, **EDN:** YICWRG

ВВЕДЕНИЕ

Дикий кабан (*Sus scrofa* L.) является важным звеном в цепях взаимодействия природных объектов, его роль в биоценозах носит разносторонний характер. На северо-западе России этот вид появился в середине прошлого столетия, и на сегодняшний день его численность в Республике Карелия составляет около 1.5 тыс. особей [1, 2]. Существование кабана на данной территории лимитируют нивальный и трофический (крайняя скудость естественных кормов) факторы [1]. Однако фенотипическая пластичность, способность адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды, высокая репродуктивная успешность и устойчивость к климатическим условиям [3, 4] позволяют виду выживать и увеличивать свою численность. Ключевую роль в

поддержании обменных процессов в организме играет питание, поэтому всеядность кабана во многом обеспечивает выживание вида в экстремальных северных условиях. Среди животных, не впадающих в зимнюю спячку, кабан считается одним из наиболее приспособленных к накоплению жировых резервов. Он способен аккумулировать до 20–25% жира, который представляет собой ценнейший запас питательных веществ, а также защищает организм от переохлаждения [5]. Эта способность является, вероятно, одним из факторов, благоприятствующих наблюдаемой экспансии кабана на северо-запад России, которая может быть объяснена многолетними (вековыми) периодически колебаниями ареала и численности вида [2].

В природно-климатических условиях Севера одним из показателей адаптационных резервов ор-

ганизма является обеспеченность жирорастворимыми витаминами А и Е, которые поступают в организм с пищей и играют важную роль во многих биологических процессах [6]. Витамин А доставляется в ткани в виде ретинола и осуществляет свои функции преимущественно посредством двух метаболитов – ретиналя и ретиноевой кислоты [7]. Ретиналь необходим для зрения, участвует в синтезе пигмента родопсина. Ретиноевая кислота – наиболее активная форма витамина А – регулирует экспрессию генов и участвует в пролиферации и дифференцировке клеток, процессах роста, развития, размножения, иммунных реакциях [8]. Витамин Е является важнейшим природным антиоксидантом, иммуномодулирующим и противовоспалительным агентом принимает участие в клеточном сигналинге и регуляции транскрипции генов [9]. Основной биологически активной формой этого витамина является α -токоферол. Кроме того, благодаря антиоксидантным свойствам [10, 11], витамины А и Е участвуют в адаптационных реакциях организма, препятствуя чрезмерной активации процессов свободнорадикального окисления, например, при воздействии холода [12]. Важный вклад в функционирование антиоксидантной системы (АОС) вносит восстановленный глутатион (GSH, γ -глутамил-цистеинил-глицин) – самый распространенный тиол живых клеток. Он играет роль в реализации многих клеточных функций, зачастую посредством регуляции редокс-гомеостаза клетки, которая заключается во взаимопревращении восстановленной сульфгидрильной и окисленной дисульфидной форм [13]. Также GSH является ко-фактором антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы, а также участвует в восстановлении α -токоферола и аскорбиновой кислоты [13, 14].

Биохимические маркеры витаминного статуса и уровень GSH могут рассматриваться в качестве критерия оценки адаптационной приспособленности к природным и климатическим условиям Севера [6]. Уровни витаминов в тканях животных могут информировать об адекватности или недостаточности их поступления с пищей. На основании этих данных возможно будет дать практические рекомендации, которые могут использоваться при организации управления популяцией того или иного вида. Поскольку кабан является ресурсным видом, внимание исследователей сфокусировано в основном на изучении содержания витамина Е в мышечной ткани как антиоксиданта, улучшающего качество этого продукта [15–19]. В то же время сведения об уровне витаминов А и Е в других органах, в том числе и тех, с которыми связан метаболизм этих нутриентов в организме, в литературе немногочисленны [20]. Ранее нами было проведено пилотное исследование антиоксидантного и витаминного статусов у кабанов, обитающих в одном

из районов Карелии [21]. В данной работе представлены результаты расширенного исследования содержания ретинола (витамин А), α -токоферола (витамин Е), а также GSH в органах и тканях кабанов разного возраста и пола, охватившего три района северо-запада России (Лахденпохский и Сортавальский районы Республики Карелия и Приозерский район Ленинградской области).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический материал был получен от кабанов, добытых в результате легальной охоты, поэтому для исследования не требовалось одобрения биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН. Сроки охоты в Республике Карелия и Ленинградской области были определены в соответствии с Приказом Минприроды России (от 16.11.2010 г. № 512 “Об утверждении Правил охоты”), Указом главы Республики Карелия (от 20.09.2012 г. № 122 “Об определении параметров осуществления охоты в охотничьих угодьях на территории Республики Карелия, за исключением особо охраняемых природных территорий федерального значения”) и Постановлением губернатора Ленинградской области (от 29.12.2012 г. № 145-пг “Об определении видов разрешенной охоты и параметров осуществления охоты на территории Ленинградской области”). Охота проводилась в Карелии с 1 июня по 31 декабря, а в Ленинградской области с 1 июня по 28 (29) февраля. Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

Объект исследования. Исследование проведено на кабанах обоих полов в возрасте от 0.5 до 8 лет, обитающих в Лахденпохском и Сортавальском районах Республики Карелия и Приозерском районе Ленинградской области. Всего исследовано 65 животных, которые были разделены на следующие возрастные группы: 1 – поросята или сеголетки (6–10 мес, $n = 26$), 2 – подсвинки (1 год, $n = 12$), 3 – молодые (2–3 года, $n = 8$), 4 и 5 – взрослые (4 года, $n = 10$ и 5–8 лет, $n = 9$ соответственно). Возраст животных оценивали по прорезыванию зубов, форме и стачиванию клыков, резцов, а также щечных зубов [21]. Кабаны, добытые в Сортавальском районе ($n = 12$), находились на полувольном содержании. Отбор биологического материала (печень, почки, сердце, скелетная мышца, легкие и селезенка) проводили у кабанов, легально добытых в период охоты с августа по февраль 2018–2020 гг. (77% животных были добыты в холодный период с октября по февраль). Образцы тканей для исследования отбирали в течение 2–4 ч после гибели животных, далее замораживали и хранили до проведения анализа при температуре – 80°C.

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

Для определения содержания GSH 50 мг ткани гомогенизировали в 2 мл 0.02 М ЭДТА- Na_2 . После центрифугирования (15 мин при 5000 g) 1 мл супернатанта смешивали с 4 мл дистиллированной воды и 1 мл 50% трихлоруксусной кислоты. Смесь периодически встряхивали в течение 10–15 мин, затем центрифугировали 15 мин при 3000 g. После центрифугирования 1 мл супернатанта смешивали с 2 мл 0.4 М трис-буферного раствора, добавляли 0.1 мл реактива Элмана и встряхивали смесь. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 412$ нм, СФ 2000, Россия) и выражали в мкмоль/г белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [23] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Статистическая обработка данных. Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами статистики в программах MS Excel и Statgraphics Plus 5.0. Для оценки различий между возрастными группами животных использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для оценки влияния факторов “возраст” и “пол” применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Влияние пола на исследуемые показатели изучали в тех возрастных группах, где это было возможно. В связи с тем, что достоверного влияния этого фактора обнаружено не было, данные по самкам и самцам для каждой возрастной группы объединены. Для выявления зависимостей и их характера между изучаемыми показателями

использовали корреляционный анализ. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде бокс-плотов с обозначением медиан, верхнего и нижнего квартилей, а также выпадающих значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание ретинола, α -токоферола и GSH в органах и тканях кабанов разного возраста представлено на рис. 1–3. Самое высокое содержание ретинола у исследованных кабанов обнаружено в печени, в остальных органах его уровень был значительно ниже (рис. 1). Дисперсионный анализ выявил влияние возраста на уровень ретинола в печени ($F_{(4,58)} = 4.52$, $\eta^2 = 22.75\%$, $p < 0.01$): у кабанов 3-й и 5-й возрастных групп этот показатель был достоверно выше, чем у сеголетков ($p < 0.05$). Кроме того, в почках у 2–3-летних кабанов уровень витамина был выше, чем у подсвинков, а в возрасте 5–8 лет этот показатель существенно снижился, по сравнению с особями 2–3-х лет ($p < 0.05$).

Уровень α -токоферола в органах и тканях кабанов в исследованные возрастные периоды различался незначительно (рис. 2). Более высокие значения наблюдались в печени, за исключением животных старшей возрастной группы, у которых самое значительное содержание витамина было зафиксировано в селезенке. Дисперсионный анализ выявил влияние возраста на уровень α -токоферола в сердце ($F_{(4,57)} = 3.50$, $df = 4$, $\eta^2 = 19.58\%$, $p < 0.05$): у животных 4 лет и старше этот показатель был значительно выше, чем у сеголетков ($p < 0.05$). Кроме того, в печени и в почках содержание α -токоферола у 4-летних животных было выше, чем у кабанов первого года жизни ($p < 0.05$).

Наиболее высокий уровень GSH у кабанов обнаружен в сердце и легких (рис. 3). В большинстве исследованных органов не было отмечено возрастных изменений содержания глутатиона. Дисперсионный анализ выявил влияние возраста на уровень GSH в легких ($F_{(3,17)} = 6.07$, $df = 3$, $\eta^2 = 49.48$, $p < 0.005$): у животных самой старшей возрастной группы этот показатель был значительно выше по сравнению с сеголетками и 4-летними кабанями.

Корреляционный анализ показал наличие взаимокompенсаторных (положительных и отрицательных) связей между исследуемыми показателями (рис. 4). Наибольшее число корреляций наблюдается у кабанов 4–8 лет. Обнаруженные зависимости были преимущественно положительными. Среди отрицательных корреляций обращает на себя внимание связь между содержанием ретинола и α -токоферола в скелетной мышце, которая была выявлена у животных первого года жизни и 4–8 лет.

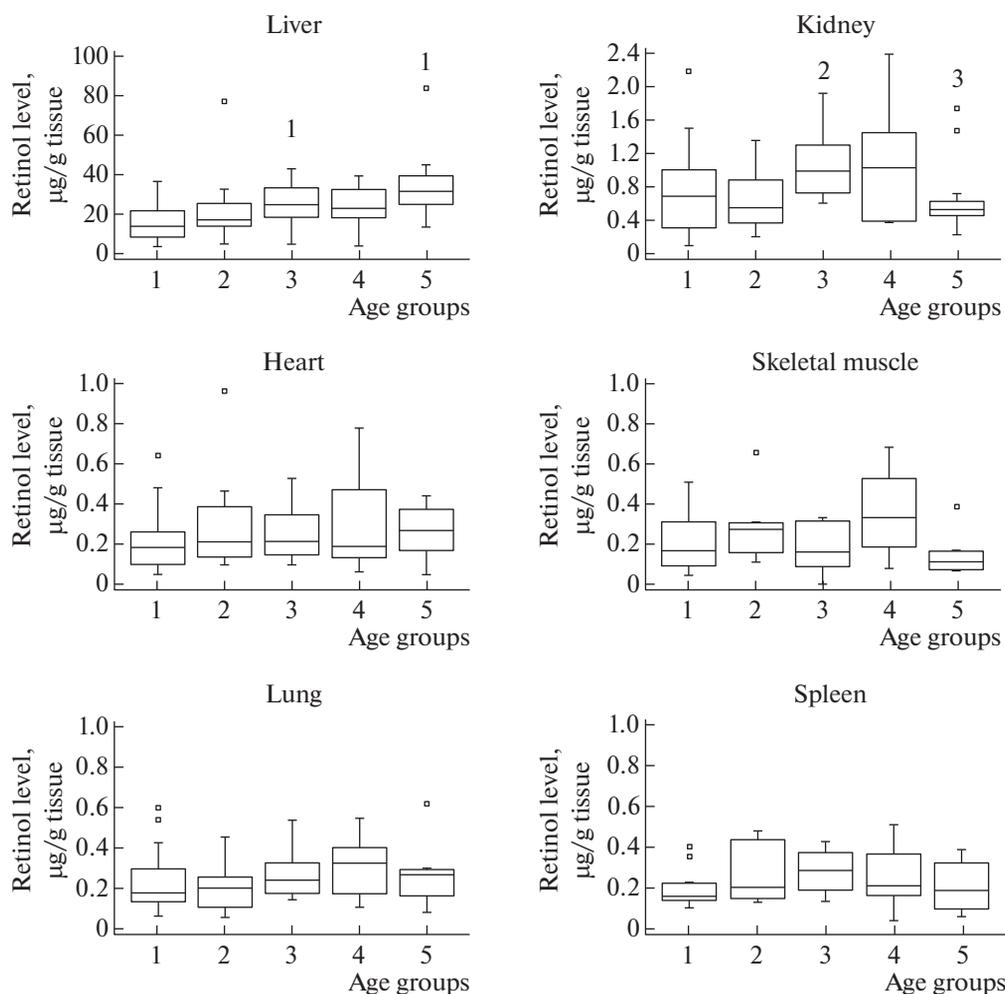


Рис. 1. Содержание ретинола в органах кабанов, обитающих на северо-западе России.

По оси абсцисс – возрастные группы (1–6–10 мес, 2–1 год, 3 – 2–3 года, 4–4 года, 5–5–8 лет); по оси ординат – содержание ретинола, мкг/г ткани. Рисунок: бокс-плоты с обозначением медиан (—), верхнего и нижнего квартилей (┌┐), статистического диапазона, а также выпадающих значений (□). Цифрами над бокс-плотами (1, 2, 3) обозначены достоверные различия по сравнению с соответствующими возрастными группами (U -критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерес к изучению уровня витаминов А и Е в организме животных, обитающих в естественных условиях, связан с важностью этих нутриентов для нормального роста, развития, размножения, поддержания иммунитета, а также их участием в адапционных процессах [8–11]. Особенно значимой их роль становится для видов на северной границе ареала в холодный период года, когда активизируется липидный обмен, с которым тесно связан метаболизм исследуемых витаминов. Суровые климатические условия (низкие температуры, глубокий снег) являются наиболее важным фактором, ограничивающим распространение кабана [24]. Геномными исследованиями установлено, что у северных популяций кабана в основе адаптации к холоду лежат процессы, связанные с термогенезом,

регуляцией дифференцировки жировых клеток и развития жировой ткани [25]. Эта ткань является одним из основных депо витаминов А и Е в организме, хотя эти резервы α -токоферола малодоступны и мобилизуются очень медленно [26]. В то же время имеются данные об участии этих витаминов в регуляции уровня и функционировании жировых запасов [26, 27].

Печень играет основную роль в гомеостазе витамина А: в гепатоцитах ретинол, который образуется из поступающих с кровью ретиноловых эфиров, либо связывается с ретинол-переносящим белком и доставляется в ткани, либо вновь этерифицируется и аккумулируется в липидных каплях звездчатых клеток печени, где у большинства млекопитающих хранится 50–80% всего витамина А в организме [11]. Содержание ретинола в печени исследованных

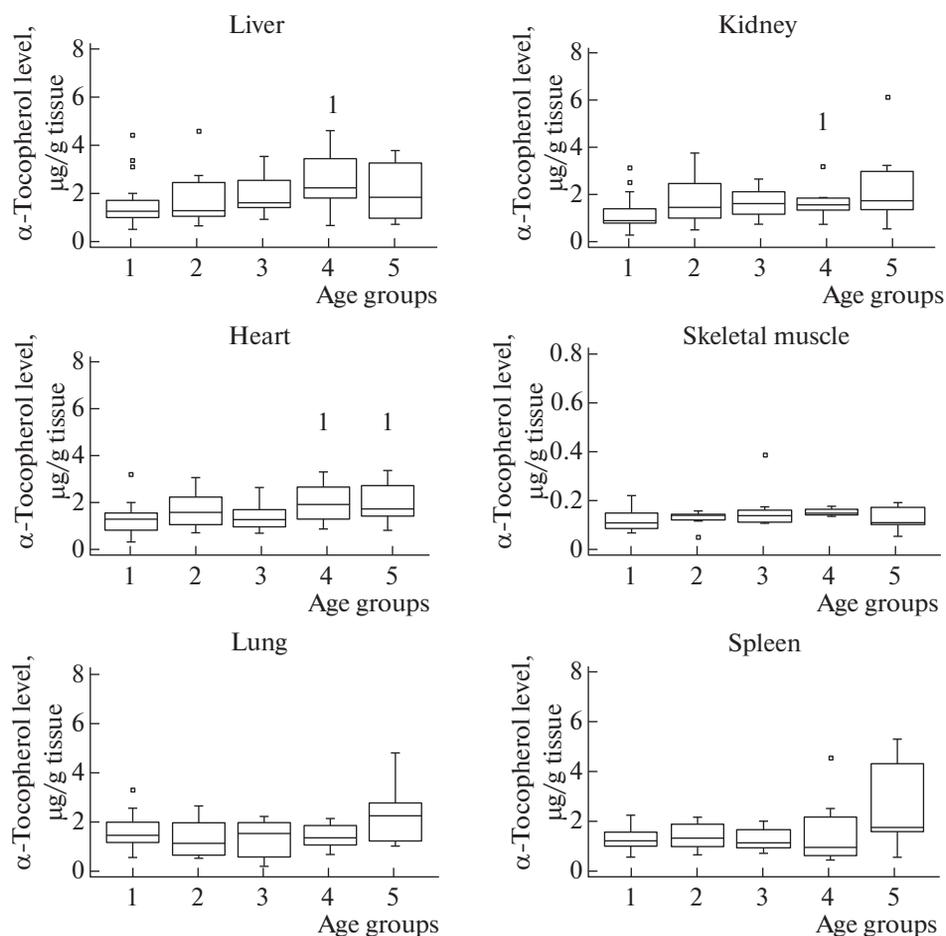


Рис. 2. Содержание α -токоферола в органах кабанов, обитающих на северо-западе России.

По оси абсцисс – возрастные группы (1–6–10 мес, 2–1 год, 3–2–3 года, 4–4 года, 5–5–8 лет); по оси ординат – содержание ретинола, мкг/г ткани. Рисунок: бокс-плоты с обозначением медиан (—), верхнего и нижнего квартилей (□), статистического диапазона, а также выпадающих значений (□). Цифрой над бокс-плотами (1) обозначены достоверные различия по сравнению с соответствующей возрастной группой (U -критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$).

нами кабанов разного возраста составляло в среднем от 15.39 ± 1.66 до 36.43 ± 6.75 мкг/г. Сопоставимый уровень ретинола в печени (27.17 мкг/г) наблюдался у взрослых и более низкий (3.79 мкг/г) у неполовозрелых кабанов, обитающих в Испании [20]. Среди других органов и тканей, где содержание ретинола было значительно ниже, наиболее высокие показатели были отмечены в почках (в среднем 0.63 ± 0.10 – 1.09 ± 0.23 мкг/г), которые играют важную роль в рециркуляции витамина А [28]. В сердечной и скелетной мышцах, легких и селезенке у кабанов разного возраста уровень ретинола в среднем составлял от 0.15 ± 0.04 до 0.39 ± 0.22 мкг/г. В скелетной мышце диких кабанов, обитающих в Европе, содержание от 0.01 до 1.11 мкг/г ретинола [15, 17]. У взрослой домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) регулярное получение сбалансированного рациона обеспечивает более высокий уровень ретинола в печени (115.89 мкг/г), хотя в почках и легких его содержание сравнительно ниже, чем у ис-

следованных нами животных (0.27 и 0.07 мкг/г соответственно) [29].

Установленный нами уровень ретинола у кабанов на северо-западе России был сопоставимым с таковым у животных, обитающих в более мягких климатических условиях, а также у домашних свиней, что может свидетельствовать об адекватном поступлении витамина А с пищей. Это подтверждается также повышением с возрастом содержания ретинола в печени и почках исследованных кабанов. Известно, что витамин А активно используется организмом в период роста и развития, после чего часть этого нутриента накапливается в депонирующих органах [11]. Кабаны растут до 4–7 лет, но с 3-го–4-го года жизни темпы прироста уже незначительны [5]. Существенное снижение уровня ретинола в почках кабанов самой старшей возрастной группы может быть связано со структурными и функциональными изменениями этих органов, которые наблюдаются с возрастом [30].

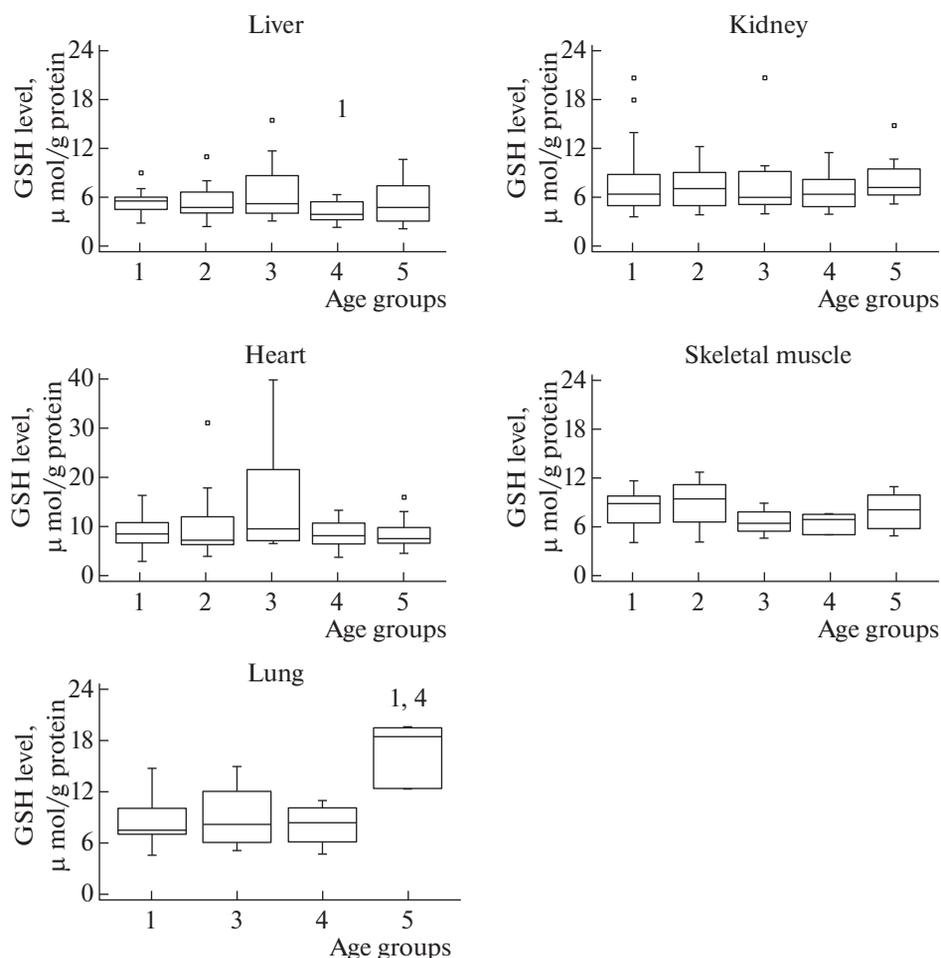


Рис. 3. Содержание GSH в органах кабанов, обитающих на северо-западе России.

По оси абсцисс – возрастные группы (1–6–10 мес, 2–1 год, 3–2–3 года, 4–4 года, 5–5–8 лет); по оси ординат – содержание ретинола, мкг/г ткани. Рисунок: бокс-плоты с обозначением медиан (—), верхнего и нижнего квартилей (▭), статистического диапазона, а также выпадающих значений (□). Цифрами над бокс-плотами (1, 4) обозначены достоверные различия по сравнению с соответствующими возрастными группами (U -критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$).

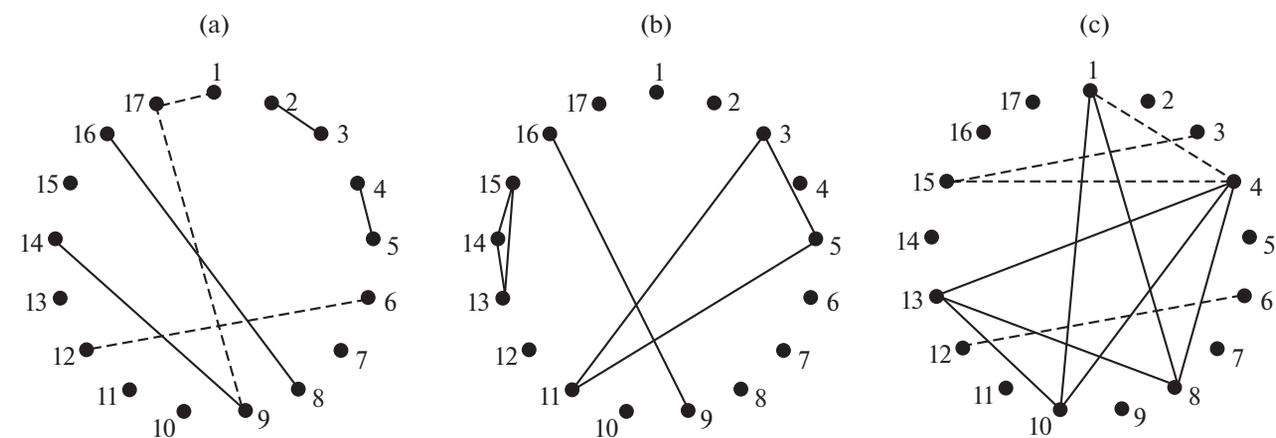


Рис. 4. Корреляционные связи между изученными показателями у кабанов разных возрастных групп.

(а) – кабаны первого года жизни, (б) – кабаны 1–3 лет, (с) – кабаны 4–8 лет; 1–содержание ретинола в печени, 2 – почках, 3 – сердце, 4 – легких, 5 – селезенке, 6 – скелетной мышце, 7 – содержание α -токоферола в печени, 8 – почках, 9 – сердце, 10 – легких, 11 – селезенке, 12 – скелетной мышце, 13 – содержание GSH в печени, 14 – почках, 15 – сердце, 16 – легких, 17 – скелетной мышце; сплошная линия – положительная корреляция, пунктирная линия – отрицательная корреляция ($p < 0.05$).

Содержание α -токоферола в исследованных органах и тканях кабанов разного возраста различалось незначительно. Наиболее высоким этот показатель был в печени (в среднем для животных разных возрастных групп от 1.59 ± 0.18 до 2.53 ± 0.37 мкг/г), что связано с регулирующей ролью органа в метаболизме витамина E [31]. В скелетной мышце содержание α -токоферола в исследованные возрастные периоды составляло в среднем от 1.22 ± 0.09 до 1.76 ± 0.43 мкг/г. В литературе приводятся данные о более значительном уровне α -токоферола у кабанов, обитающих в регионах с теплым климатом: содержание витамина в печени животных в Испании составляло 17.57 мкг/г [32], в скелетной мышце кабанов в Португалии 15.50–19.20 мкг/г [16], тогда как в Германии этот показатель в скелетной мышце несущественно превышал полученные нами значения и составлял 1.20–4.70 мкг/г [15]. У домашней свиньи в мышечной ткани содержалось от 3.25 до 5.31 мкг/г α -токоферола [18, 33].

Основными факторами, определяющими более низкое содержание α -токоферола у кабанов, обитающих на северо-западе России, являются скудные кормовые ресурсы и суровые климатические условия в холодный период года. В исследуемом регионе основным источником витамина E для животных являются зеленые части дикорастущих растений, а также некоторые сельскохозяйственные культуры, тогда как в условиях более мягкого климата у животных есть возможность употреблять превосходящие в питательном отношении плоды дуба, бука, каштана, лещины и различных фруктовых деревьев [34], что позволяет накапливать большее количество витамина. Следует, однако, отметить, что в тех районах, где были добыты исследованные нами кабаны, проводятся мероприятия по подкормке животных в зимний период. Низкое содержание селена в природных объектах (почва, вода, растения) Карелии [35] также может являться фактором, который негативно сказывается на статусе витамина E у исследованных животных. Все антиоксиданты в организме функционируют согласованно, а этот элемент в составе различных селенопротеинов является важнейшим компонентом антиоксидантной системы [36]. Основная стратегия выживания кабана зимой связана со снижением уровня метаболизма, прекращением роста, уменьшением потребления корма, экономным расходом жировых запасов, “гнездостроительством” и “коллективной терморегуляцией” [5]. Однако повышенные энергетические потребности, связанные с низкими температурами, ветром и глубоким снегом [37], способствуют активному расходованию α -токоферола. Кроме того, поскольку для обитающих в естественных условиях животных характерна более высокая двигательная активность, их мышцы содержат большее количество волокон, в которых преобладает аэробный метаболизм [38],

что также повышает интенсивность окислительных процессов и использование α -токоферола.

Поскольку витамин E в биологических мембранах связан с липидами, его уровень в тканях зависит от их количества [39]. С возрастом наблюдается накопление липидов в тканях организма [15, 40], с этим и может быть связано зафиксированное в нашем исследовании увеличение уровня α -токоферола в печени, почках и сердце у кабанов старше 4 лет. Повышение содержания витамина в этих органах в ходе онтогенеза происходило постепенно, поскольку значимые различия у старшей возрастной группы обнаружены только с животными первого года жизни. Отсутствие возрастных изменений уровня α -токоферола в скелетной мышце согласуется с данными Dannenberger и соавт. [15], тогда как Quagesma и соавт. [16] обнаружили более высокое содержание витамина у взрослых кабанов по сравнению с сеголетками, что авторы связывают с различиями в привычках питания и скорости метаболизма у молодых и взрослых животных. Полученные нами результаты также свидетельствуют о большей вариабельности уровня α -токоферола в организме животных старшего возраста, связанные, вероятно, с такими факторами, как доступность и питательная ценность кормовых ресурсов, климатические условия и физиологическое состояние животного.

В процессе адаптации организма к воздействию низких температур значительную роль играет система антиоксидантной защиты [41]. Один из ее важнейших неферментативных компонентов, GSH, участвует в регуляции свободнорадикальных процессов, а также в модуляции синтеза ДНК и иммунной функции. У млекопитающих постоянство этого трипептида в клетках поддерживается следующими механизмами: синтез из простых молекул (*de novo*), транспорт экзогенного GSH через плазматические мембраны и восстановление из окисленной формы [42]. Наиболее интенсивный синтез GSH осуществляется в печени [43]. У кабанов на протяжении исследованных нами периодов онтогенеза статус GSH в органах и тканях практически не менялся, за исключением легких, где у животных самого старшего возраста (5–8 лет) его уровень значительно повысился. В этот же период в легких наблюдалось увеличение содержания α -токоферола, хотя различия с другими возрастными группами не были достоверными. Повышение содержания GSH может происходить как за счет активизации его синтеза при воздействии активных форм кислорода и азота [14], так и благодаря интенсивному поглощению и использованию циркулирующего GSH альвеолярными клетками [44]. Увеличение уровня витамина E в легких в случае необходимости происходит при его мобилизации из других тканей [45]. Легкие непосредственно подвергаются действию кислорода воздуха, а также различных газов, обладающих оксидативным эффектом. Так-

же в тканях легких содержится высокое количество ненасыщенных жирных кислот, которые выступают в качестве субстрата для перекисного окисления липидов [46]. Есть сведения о важной роли легких в процессе адаптации к холоду [47]. Все это может способствовать повышению потребности легких в антиоксидантах у животных старшего возраста, обитающих в северных условиях. Продолжительность жизни кабана в природе редко превышает 10–12 лет, хотя в неволе может достигать 20 лет [5]. Проведенный нами корреляционный анализ выявил увеличение количества связей между изученными показателями у животных 4–8 лет, что может свидетельствовать о повышении функциональной нагрузки на антиоксидантную систему с возрастом.

В нашем исследовании уже на первом году жизни у кабанов содержание ретинола, α -токоферола, а также GSH в большинстве органов и тканей было сопоставимо с таковым у взрослых животных. При рождении содержание исследуемых витаминов в организме млекопитающих довольно низкое [8], а лимитирующим фактором для синтеза GSH является доступность аминокислоты цистеина [48]. Рост и развитие детенышей в большой степени зависят от условий питания, а также уровня зараженности гельминтами, но наиболее интенсивно поросята растут в течение первых месяцев жизни [5]. В этот период у молодняка домашних свиней наблюдаются значительные колебания в уровне токоферола [49]. Животные этого возраста чувствительны к воздействию холода, так как имеют плохую терморегуляцию из-за отсутствия у них бурой жировой ткани (БЖТ). Установлено [50], что около 20 миллионов лет назад в семействе Suidae был нарушен ген разобщающего белка 1 (UCP1), который экспрессируется в митохондриях БЖТ и играет важную роль в термогенезе, разобщая окисление и фосфорилирование. Предполагается, что причиной стало отсутствие или слабый отбор по этому механизму в теплом климате, а дикий кабан — единственный вид свиней, приспособившийся к умеренному климату и выработавший компенсаторные механизмы для адаптации к холоду. Так, среди копытных лишь для этого вида характерно строительство термозащитных “гнезд” для родов. Из-за меньших размеров, ограниченных резервов тела и относительно более высоких метаболических потребностей молодые особи наиболее восприимчивы к суровым условиям [37], на северо-западе России смертность в первые месяцы жизни может составлять от 34 до 70% [2]. При этом важную роль в обеспечении устойчивости организма играет состояние антиоксидантной системы, в том числе обеспеченность витаминами А и Е. Установлено, что у молодняка домашних свиней интенсивность роста после отъема связана с содержанием витамина Е в крови в подсосный период [51]. Возраст исследованных нами сеголетков составлял

около 6–10 мес. Хотя, как уже говорилось, кабаны продолжают расти до 4–7 лет [5], можно предположить, что становление основных систем, с которыми связан метаболизм витаминов А и Е у кабана происходит в течение первых 6 мес жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было определено содержание ретинола, α -токоферола и GSH в органах и тканях кабанов разного возраста, обитающих на северо-западе России. Уровень витамина Е в организме изученных животных несколько ниже, по сравнению с животными, проживающими в регионах с более мягким климатом, что, вероятно, связано с ограниченностью кормовых ресурсов и климатическими условиями в холодный период года. Вместе с тем по обеспеченности ретинолом исследованные животные мало отличались от кабанов, обитающих в Европе. Содержание ретинола, α -токоферола и GSH в большинстве органов и тканей у сеголетков было сопоставимо с таковым у взрослых животных. С возрастом наблюдалось накопление витаминов А и Е в печени и почках, а также витамина Е в сердце кабанов, что характерно и для других видов млекопитающих. Повышение уровня GSH было зафиксировано в легких у животных в возрасте старше 5 лет. Выявленный статус витаминов и GSH, который сформировался у кабана в условиях северо-запада России, и особенности возрастной динамики исследуемых показателей могут являться одним из свидетельств успешной адаптации этого вида к обитанию на северной периферии ареала, что подтверждается ростом его численности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема FMEN-2022-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования (Д.В.П., С.Н.К.), сбор биоматериала (Д.В.П.), проведение лабораторных анализов, обработка данных (И.А.З., И.В.Б., Т.Н.И., Е.П.А.), написание манускрипта (И.А.З., И.В.Б.), редактирование манускрипта (все авторы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панченко ДВ, Данилов ПИ, Тирронен КФ, Паасиваара А, Красовский ЮА (2019) Особенности распределения копытных млекопитающих в пределах карельской части Зеленого пояса Фенноскандии. Труды Карельского научного центра РАН 4: 119–128. [Panchenko DV, Danilov PI, Tirronen KF, Paasivaara A, Krasovsky YuA (2019) Features of ungulates distribution in the Karelian part of the Green Belt of Fennoscandia. Trans Karelian Res Centre RAS 4: 119–128. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17076/them997>
2. Данилов ПИ, Панченко ДВ (2012) Расселение и некоторые особенности экологии кабана за северным пределом его исторического ареала в европейской части России. Экология 1: 48–54. [Danilov PI, Panchenko DV (2012) Settlement and some features of the boar ecology beyond the northern limit of its historical range in the European part of Russia. Ecology 1: 48–54. (In Russ)].
3. Castillo-Contreras R, Mentaberre G, Aguilar XF, Conejero C, Colom-Cadena A, Ráez-Bravo A, González-Crespo C, Espunyes J, Lavín S, López-Olvera JR (2021) Wild boar in the city: Phenotypic responses to urbanization. Sci Total Environ 773: 145593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145593>
4. Żmijewski T, Modzelewska-Kapituła M (2021) The influence of age and sex on carcass characteristics and chemical composition of the longissimus thoracis et lumborum muscle in wild boars (*Sus scrofa*). Arch Anim Breed 1: 199–210. <https://doi.org/10.5194/aab-64-199-2021>
5. Данилкин АА (2002) Свиные (Suidae) М. ГЕОС [Danilkin AA (2002) Pigs (Suidae) M. GEOS. (In Russ)].
6. Корчина ТЯ, Корчин ВИ (2014) Витамины и микроэлементы: особенности северного региона. Ханты-Мансийск. Новости Югры. [Korchina TY, Korchin VI (2014) Vitamins and trace elements: features of the northern region. Khanty-Mansiysk. Ugra news. (In Russ)].
7. Van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Lüscher TF (2004) Age-related changes of vitamin A status. J Cardiovasc Pharmacol 1: 26–30. <https://doi.org/10.1097/00005344-200401000-00005>
8. Debier C, Larondelle Y (2005) Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. Br J Nutr 2: 153–174. <https://doi.org/10.1079/bjn20041308>
9. Azzi A (2018) Many tocopherols, one vitamin E. Mol Aspects Med 61: 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>
10. Brigelius-Flohé R (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. Am J Clin Nutr 4: 703–716. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.4.703>
11. Blomhoff R, Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. J Neurobiol 7: 606–630. <https://doi.org/10.1002/neu.20242>
12. Zhang Y, Zhao Y, Li C, Wang L, Tian F, Jin H (2022) Physiological, Immune Response, Antioxidant Capacity and Lipid Metabolism Changes in Grazing Sheep during the Cold Season. Animals 12: 2332. <https://doi.org/10.3390/ani12182332>
13. Калинина ЕВ, Чернов НН, Новичкова МД (2014) Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. Успехи биологической химии 54: 299–348. [Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD (2014) The role of glutathione, glutathione transferase and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes. Uspehi biologicheskoy himii 54: 299–348. (In Russ)].
14. van Haften RIM, Haenen GRMM, Evelo CTA, Bast A (2003) Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. Drug Metab Rev 35 (2–3): 215–253. <https://doi.org/10.1081/DMR-120024086>
15. Dannenberger D, Nuernberg G, Nuernberg K, Hagemann E (2013) The effects of gender, age and region on macro- and micronutrient contents and fatty acid profiles in the muscles of roe deer and wild boar in Mecklenburg-Western Pomerania (Germany). Meat Sci 1: 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.010>
16. Quaresma MAG, Alves SP, Trigo-Rodrigues I, Pereira-Silva R, Santos N, Lemos JPC, Barreto AS, Bessa RJB (2011) Nutritional evaluation of the lipid fraction of feral wild boar (*Sus scrofa scrofa*) meat. Meat Sci 89: 457–461. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.005>
17. Soriano A, Sánchez-García C (2021) Nutritional composition of game meat from wild species harvested in Europe. Intech Open. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97763>
18. Ortiz A, García-Torres S, González E, De Pedro-Sanz EJ, Gaspar P, Tejerina D. (2020) Quality traits of fresh and dry-cured loin from Iberian x Duroc crossbred pig in the Montanera system according to slaughtering age. Meat Sci 170: 108242. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108242>
19. Lebreton B, Lenoir H, Fonseca A, Riquet J, Mercat MJ. (2021) Finishing season and feeding resources influence the quality of products from extensive-system Gascon pigs. Part 2: muscle traits and sensory quality of dry-cured ham. Animal 15 (8): 100305. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100305>
20. Rodríguez-Estival J, Álvarez-Lloret P, Rodríguez-Navarro AB, Mateo R (2013) Chronic effects of lead (Pb) on bone properties in red deer and wild boar: Relationship with vitamins A and D3. Environ Pollut 174: 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.019>
21. Калинина СН, Панченко ДВ, Баишикова ИВ, Антонова ЕП, Илюха ВА, Шакун ВВ, Зайцева ИА (2020) Антиоксидантный и витаминный статусы кабана *Sus scrofa* L. (Artiodactyla) на периферии ареала (Республика Карелия). Труды Кольского научного центра РАН 11 (2–8 (8)): 83–92. [Kalinina SN, Panchenko DV, Baishnikova IV, Antonova EP, Ilyukha VA, Shakun VV, Zaytseva IA (2020) Antioxidant and vitamin status in wild boar *Sus Scrofa* L. (Artiodactyla) on the range periphery (Republic of Karelia). Transactions Kola Science Centre 11 (2–8 (8)): 83–92. (In Russ)]. <https://doi.org/10.37614/2307-5252.2020.2.8.008>
22. Клевезаль ГА (2007) Принципы и методы определения возраста млекопитающих М. Т-во научных изданий КМК. [Klevezal GA (2007) Principles and methods of age determination of mammals M. KMK Sci Press Ltd. (In Russ)].

23. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randan RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1): 265–275.
24. Markov N, Economov A, Hjeljord O, Rolandsen CM, Bergqvist G, Danilov P, Dolinin V, Kambalin V, Kondratov A, Krasnoshapka N, Kunnasranta M, Mamontov V, Panchenko D, Senchik A (2022) The wild boar *Sus scrofa* in northern Eurasia: a review of range expansion history, current distribution, factors affecting the northern distributional limit, and management strategies. *Mammal Rev* 52 (4): 519–537.
<https://doi.org/10.1111/mam.12301>
25. Chen J, Jakovlić J, Zhong J, Jia Y, Thi TNT, Sablin M, Xia S, Yang H, Šprem N, Yang G, Jianlin H (2022) Whole-Genome Sequencing Reveals Positive Selection on Genes and Variants underlying the Climatic Adaptation of Cold-region Wild Boar. *Authorea*.
<https://doi.org/10.22541/au.165942186.69235808/v1>
26. Landrier JF, Marcotorchino J, Tourniaire F (2012) Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology. *Nutrients* 4: 1622–1649.
<https://doi.org/10.3390/nu4111622>
27. Bonet ML, Ribot J, Palou A (2012) Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1821: 177–189.
<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2011.06.001>
28. Raila J, Willnow TE, Schweigert FJ (2005) Megalin-Mediated Reuptake of Retinol in the Kidneys of Mice Is Essential for Vitamin A Homeostasis. *J Nutr* 135: 2512–2516.
<https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2512>
29. Sun T, Surlles RL, Tanumihardjo SA (2008) Vitamin A concentrations in piglet extrahepatic tissues respond differently ten days after vitamin A treatment. *J Nutr* 138: 1101–1106.
<https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1101>
30. O'Sullivan ED, Hughes J, Ferenbach DA (2017) Renal aging: causes and consequences. *J Am Soc Nephrol* 28: 407–420.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2015121308>
31. Traber MG (2007) Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr* 27: 347–362.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093819>
32. Rodríguez-Estival J, Taggart MA, Mateo R (2011) Alterations in vitamin A and E levels in liver and testis of wild ungulates from a lead mining area. *Arch Environ Contam Toxicol* 60: 361–371.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.010>
33. Niculita P, Popa EM, Ghidurus M, Turtoi M (2007) Effect of vitamin E in swine diet on animal growth performance and meat quality parameters. *Polish J Food Nutr Sci* 57 (1): 125–130.
34. Кульпин АА (2008) Особенности биотопического распределения и питания кабана (*Sus Scrofa* L.) на севере европейской части России. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского 2: 82–86. [Kulpin AA (2008) Peculiarities of biotopic distribution and feeding of wild boar (*Sus Scrofa* L.) in the north of the European part of Russia. *Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod* 2: 82–86. (In Russ)].
35. Вапиров ВВ, Чаженгина ЕА (2019) Селеновый статус природных объектов Республики Карелия. Экологическая геология: теория, практика и региональные проблемы. Мат-лы VI Международной научно-практической конференции 16–19. [Вапиров ВВ, Чаженгина ЕА (2019) Selenium status of environmental sites the Republic of Karelia. *Ecological geology: theory, practice and regional problems. Materials of the VI International Scientific and Practical Conference* 16–19. (In Russ)].
36. Surai PF (2003) Selenium-vitamin E interactions: does 1+1 equal more than 2? In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. Proc. of Alltech's 19th Annual Symposium (Lyons TP and Jacques KA, eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK, 59–76.
37. Parker KL, Barboza PS, Gillingham MP (2009) Nutrition integrates environmental responses of ungulates. *Funct Ecol* 23: 57–69.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01528.x>
38. Babicz M, Kasprzyk A (2019) Comparative analysis of the mineral composition in the meat of wild boar and domestic pig. *Ital J Anim Sci* 18 (1): 1013–1020.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1610337>
39. Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M (2015) Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *Br J Nutr* 114 (8): 1113–1122.
<https://doi.org/10.1017/S000711451500272X>
40. Zhao L, Zou X, Feng Z, Luo C, Liu J, Li H, Chang L, Wang H, Li Y, Long J, Gao F, Liu J (2014) Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats. *Exp Gerontol* 56: 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.02.001>
41. Kaushik S, Kaur J (2003) Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 333 (1): 69–77.
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00171-2)
42. Смирнов ЛП, Суховская ИВ (2014) Роль глутатиона в функционировании систем антиоксидантной защиты и биотрансформации (обзор). Уч запис Петрозаводск гос универ 6: 34–40. [Smirnov LP, Sukhovskaya IV (2014) Glutathione role in antioxidant protection and in functioning of biotransformation system (review). *Proceed Petrozavodsk State Univ* 6: 34–40. (In Russ)].
43. Kulinsky VI, Kolesnichenko LS (2009) The glutathione system. I. Synthesis, transport, glutathione transferases, glutathione peroxidases. *Biochem (Moscow) Supplement Series B: Biomed Chem* 3(2): 129–144.
<https://doi.org/10.1134/s1990750809020036>
44. Esposito L, Tafuri S, Cocchia N, Fasanelli R, Piscopo N, Lamagna B, Eguren V, Amici A, Iorio EL, Ciani F (2021) Assessment of living conditions in wild boars by analysis of oxidative stress markers. *J Appl Anim Welf Sci* 1: 64–71.
<https://doi.org/10.1080/10888705.2020.1790365>
45. Elsayed NM (2001) Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition* 17: 828–834.
[https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00646-3](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00646-3)
46. Kolleck I, Sinha P, Rüstow B (2002) Vitamin E as an Antioxidant of the Lung Mechanisms of Vitamin E Delivery to Alveolar Type II Cells. *Am J Respir Crit Med* 166(12): S62–S66.
<https://doi.org/10.1164/rccm.2206019>

47. Yudin NS, Larkin DM, Ignatieva EV (2017) A compendium and functional characterization of mammalian genes involved in adaptation to Arctic or Antarctic environments. *BMC Genetics* 18: 33–43. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0580-9>
48. Rasch I, Görs S, Tuchscherer A, Viergutz T, Metges C, Kuhla B (2020) Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by DL-2-Hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Reduces Fractional Glutathione Synthesis in Weaned Piglets. *J Nutr* 150 (4): 722–729. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz272>
49. Moreira I, Mahan DC (2002) Effect of dietary levels of vitamin E (all-rac- α -tocopheryl acetate) with and without added fat on weanling pig performance and tissue α -tocopherol concentration. *J Anim Sci* 80: 663–669. <https://doi.org/10.2527/2002.803663x>
50. Berg F, Gustafson U, Andersson L (2006) The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genet* 2 (8): e129. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020129>
51. Buchet A, Belloc C, Leblanc-Maridor M, Merlot E (2017) Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PLoS ONE* 12 (5): e0178487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178487>

THE CONTENT OF RETINOL, α -TOCOPHEROL AND GLUTATHIONE IN THE TISSUES OF WILD BOAR (*SUS SCROFA* L.), INHABITING THE NORTHWEST OF RUSSIA

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

^a*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia*

^b*Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia*

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

Phenotypic plasticity and resistance to climatic conditions allowed the wild boar (*Sus scrofa* L.) to expand its historical range, pushing its Northern border. In the processes of adaptation of animals to living on the periphery of the range in the conditions of the North, the status of vitamins A and E, which are natural antioxidants, and also perform a number of other biological functions in the body and are necessary for growth, reproduction and maintenance of immunity, is of great importance. The purpose of this study was to investigate the content of retinol, α -tocopherol, and the low-molecular-weight antioxidant glutathione (GSH) in the liver, kidney, heart, skeletal muscle, lung and spleen of wild boars ($n = 65$) aged 0.5 to 8 years, living in the Northwest of Russia. The results obtained indicate that the studied animals practically did not differ from the wild boars living in the centre and south of Europe in terms of retinol availability, but were characterized by a lower level of α -tocopherol in the studied tissues, which is probably due to the limited food resources and harsh climatic conditions in the cold season in the North. The levels of vitamins and GSH in most tissues were comparable in piglets and adult animals. There was an accumulation of retinol and α -tocopherol in the liver and kidney, as well as α -tocopherol in the heart of wild boars with age, which is typical for other mammalian species. An increase in the level of GSH was found in the lung of animals over 5 years of age. The revealed vitamin status, which was formed in the wild boar in the conditions of the Northwest of Russia, and the peculiarities of the age dynamics of the studied indicators, may be one of the evidences of the successful adaptation of this species to inhabit in the Northern periphery of the range, which is confirmed by the growth of its population.

Keywords: wild boar, retinol, α -tocopherol, glutathione, vitamin status, antioxidant, periphery of the range